



Universidad de Oviedo

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

Programa de Doctorado de Química Física y Analítica

**ADAPTACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE
CARBONO A EQUIPOS GC-IRMS COMO SISTEMA
GENÉRICO DE CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS SIN LA NECESIDAD DE PATRONES
ESPECÍFICOS**

TESIS DOCTORAL

LAURA ALONSO SOBRADO

OVIEDO, 2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
ADAPTACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE CARBONO A EQUIPOS DE GC-IRMS COMO SISTEMA GENÉRICO DE CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS SIN LA NECESIDAD DE PATRONES ESPECÍFICOS.	APPLICATION OF ONLINE CARBON ISOTOPE DILUTION TO GC-IRMS INSTRUMENTATION AS A GENERIC QUANTIFICATION SYSTEM OF ORGANIC COMPOUNDS WITHOUT THE NEED FOR SPECIFIC STANDARDS.
2.- Autor	
Nombre:	DNI/Pasaporte/NIE:
LAURA ALONSO SOBRADO	-D
Programa de Doctorado: QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA	
Órgano responsable: UNIVERSIDAD DE OVIEDO	

RESUMEN (en español)

La Dilución Isotópica en línea de Carbono con Espectrometría de Masas se puede definir como el primer detector universal y genérico para cromatografía de gases. La conversión cuantitativa del eluyente cromatográfico a CO₂ y la adición de la misma especie enriquecida en ¹³C como trazador permiten alcanzar el equilibrio isotópico requerido antes de la entrada en la fuente de ionización. De esta manera, se mide una única especie en el espectrómetro de masas y por tanto, se garantiza una respuesta independiente del compuesto sin importar la fuente de ionización utilizada. La ionización independiente del compuesto permite la cuantificación genérica de los analitos a través de la detección de carbono, elemento presente en todo compuesto orgánico, sin la necesidad de estándares específicos ni calibración. Para el desarrollo de la metodología se empleó un instrumento comercial GC-MS de tipo cuadrupolo, sobre el que se realizaron tres modificaciones: (i) una interfase de combustión para la conversión cuantitativa de los analitos a CO₂, (ii) un sistema para la adición de un flujo constante de trazador, y (iii) una válvula de 6 vías. Esta instrumentación permitió la validación de la metodología mediante el análisis de diferentes familias de compuestos orgánicos simples (n-alcanos, BTEX, y ésteres) y su aplicación a muestras reales.

La extensión de la metodología a un mayor número de compuestos orgánicos permitirá definir el detector desarrollado como el primer detector *verdaderamente* genérico y universal para cromatografía de gases. Sin embargo, las características instrumentales del prototipo original desarrollado no fueron lo suficientemente adecuadas para la cuantificación de compuestos orgánicos con determinadas propiedades físico químicas.



En este contexto, la presente Tesis Doctoral se centró en la búsqueda de la instrumentación adecuada que permitiera ampliar el campo de aplicación de la Dilución Isotópica en línea de Carbono a compuestos orgánicos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura, cuyo comportamiento no había sido estudiado hasta ese momento. La instrumentación GC-IRMS, ampliamente utilizada para las medidas de alta precisión de las pequeñas variaciones existentes en las abundancias naturales de los isótopos estables de elementos ligeros, dispone de las características instrumentales adecuadas para la extensión de la metodología de la Dilución Isotópica en línea de Carbono. Sólo fueron necesarias dos sencillas modificaciones para hacer posible la aplicación de la metodología: (i) un sistema para la introducción del flujo de trazador, y (ii) una configuración en la amplificación del detector que permita la medida de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ tras la adición del trazador enriquecido. Además se demostró que el empleo de un inyector de Temperatura Programada permitía la transmisión cuantitativa sin discriminación de todos los compuestos con un amplísimo intervalo de temperatura de ebullición (218 – 525°C). Se evaluaron las características analíticas de la metodología, y se demostró que la respuesta instrumental es independiente de la especie, sin importar ni el punto de ebullición ni la presencia de heteroátomos. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad a muestras reales mediante el análisis de los FAMEs saturados e insaturados presentes en muestras de biodiesel, tanto patrones certificados como muestras reales. Se comparó la respuesta genérica del detector con la de detector más universal y establecido para compuestos orgánicos en GC, el detector de ionización de llama (FID), tanto de forma directa (como se emplea en la Norma Europea correspondiente) como con corrección del Número de Carbonos Equivalente (ECN). Se encontró que sólo la metodología propuesta es realmente genérica y no requiere patrones internos de naturaleza y número de Carbonos similar.

Las modificaciones instrumentales realizadas sobre la instrumentación GC-IRMS para la aplicación de la IDMS en línea de carbono no repercuten en el funcionamiento del equipo para realizar el análisis isotópico específico del compuesto (CSIA), característico de esta instrumentación. Por ello fue posible determinar las pequeñas variaciones en las abundancias isotópicas naturales de cada FAME individual presente en las muestras de biodiesel a través del cálculo de los deltas de carbono con la exactitud y precisión adecuadas. Dicha información, junto con el perfil cuantitativo exacto y preciso de los FAMEs presentes obtenido por la dilución isotópica en línea de C, pudo ser aplicado para estudios de discriminación por el origen en muestras de biodiesel.



RESUMEN (en Inglés)

Online carbon isotope dilution mass spectrometry can be defined as the first universal and generic detector for gas chromatography. Quantitative conversion of the chromatographic eluent into CO₂ and the addition of the same species enriched in ¹³C as a tracer lead to the isotopic equilibrium before the ionization step. In this way, only one species is measured by the mass spectrometer and therefore, a compound-independent response is guaranteed regardless the ionization source employed. Compound-independent ionization together with the on line isotope dilution concept open the door to the generic quantification of the analytes via carbon detection (element present in every organic compound), without the need for specific standards or calibration. A commercial quadrupole GC-MS instrument was used for the development of the methodology, and three modifications were considered: (i) a combustion interface for the quantitative conversion of the analytes into CO₂, (ii) a system for the continuous addition of the tracer, and (iii) a 6-ways valve. The methodology was validated by analyzing different organic compounds (n-alkanes, BTEX and esters) and by its application to real samples.

The application of the methodology to a greater number of organic compounds will help establishing the developed approach as the first detector really generic and universal for gas chromatography. However, the instrumental capabilities of the original prototype developed were not sufficiently appropriate for the quantification of organic compounds with certain physicochemical properties. In this context, the main aim of this PhD was focused on the search for the appropriate instrumentation that allowed the application of online carbon isotope dilution to the quantification of high boiling point and heteroatom-containing organic compounds. GC-IRMS instrumentation, widely used for highly precise measurements of natural isotopic variations in light elements, offers the appropriate instrumental features for the extension of the online carbon isotope dilution methodology. Only two simple modifications were considered: (i) a system for the introduction of the tracer, and (ii) a new configuration in the detector that allowed the ¹²C/¹³C isotope ratio measurement without the regular amplification after the addition of the enriched tracer. It was also confirmed that the use of a Programmable Temperature Vaporizer injector (PTV) allowed the quantitative transmission of the compounds with a wide range of boiling points (218 – 525°C) without discrimination. The analytical characteristics of the methodology were assessed and the compound-independent instrumental response was demonstrated, regardless the boiling point or the presence of heteroatoms in the structure.

The applicability of the methodology to real samples was evaluated with the analysis of saturated and unsaturated FAMES present in biodiesel, both certified materials and real samples. The generic response of the detector was compared to the response of the flame ionization detector (FID), the most universal and established detector for organic



compounds in GC, in a direct way (with the corresponding European Standard) and via correction of the Equivalent Carbon Number (ECN). It was found that the proposed methodology was the only one really generic that did not require internal standards of similar nature and carbon number.

The modifications performed on the instrument did not produce a long-term and difficult to remove contamination at $m/z = 45$ that could interfere with the use of the GC-combustion-IRMS instrument in its standard configuration for compound-specific isotope analysis (CSIA). In this way, it was possible to determine accurately and precisely the carbon isotope ratios (deltas) for every single FAME present in the biodiesel samples. This information, together with the accurate quantitative FAME profiles obtained using the on line IDMS approach, were used for biodiesel origin discrimination studies.

Índice

I	Introducción	1
I.1	ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS	4
I.1.1	Descubrimiento de los isótopos y evolución de la Espectrometría de Masas	4
I.1.2	Composición isotópica de los elementos.....	5
I.2	EL ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA	9
I.2.1	Concepto del Análisis por Dilución Isotópica (ID).	9
I.2.2	Ventajas del análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas	9
I.2.3	Diferentes tipos de IDMS	10
I.2.3.1	IDMS Orgánica	11
I.2.3.1.1	Ecuaciones de la Dilución Isotópica orgánica	12
I.2.3.1.2	Procedimiento analítico general.....	14
I.2.3.1.3	Instrumentación	16
I.2.3.1.4	Aplicaciones IDMS en análisis orgánico.....	16
I.2.3.2	IDMS Inorgánica.....	17
I.2.3.2.1	Ecuaciones de la Dilución Isotópica inorgánica	17
I.2.3.2.2	Procedimiento analítico general.....	20
I.2.3.2.3	Instrumentación	21
I.2.3.2.4	Aplicaciones IDMS en análisis inorgánico	22
I.3	DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA	23
I.3.1	Concepto de la Dilución Isotópica en línea	24
I.3.2	Ecuaciones de la Dilución Isotópica en línea	25
I.3.3	Cromatograma de flujo molar	26
I.3.4	Calibración del flujo molar de trazador	27
I.3.5	Instrumentación	30
I.3.6	Ventajas y limitaciones de la Dilución isotópica en línea	33
I.3.7	Aplicaciones de la Dilución Isotópica en línea	34
I.4	DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE CARBONO	35
I.4.1	Concepto de la Dilución Isotópica en línea de carbono.....	35
I.4.2	Ecuaciones de la Dilución Isotópica en línea de carbono	36
I.4.3	Configuración GC-Combustión-MS.....	38
I.4.3.1	Cuantificación de mezclas de compuestos orgánicos de la misma naturaleza 38	
I.4.3.2	Cuantificación de mezclas de compuestos orgánicos de diferente naturaleza 40	

Índice

I.4.3.3	Aplicación a muestras reales: cuantificación de los compuestos mayoritarios de un combustible diésel	42
I.4.3.4	Recuperación cuantitativa de la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME)	43
I.4.3.5	Ventajas y limitaciones de la IDMS en línea de carbono en GC	45
II	Objetivos	47
III	Experimental	51
III.1	INSTRUMENTACIÓN	53
III.1.1	Cromatógrafo de Gases - Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (GC-IRMS)	53
III.1.2	Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas (GC-MS)	54
III.1.3	Cromatógrafo de gases – Detector de Ionización de Llama (GC-FID)	55
III.1.4	Sistema de adición del flujo de trazador ¹³ CO ₂	55
III.1.5	Condiciones Cromatográficas	55
III.1.5.1	Estudio de compuestos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura (Capítulo 1).	55
III.1.5.2	Estudio de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAMES) (Capítulo 2)	57
III.2	PROCEDIMIENTOS	58
III.2.1	Cuantificación mediante GC-IRMS y Dilución Isotópica en línea de carbono	58
III.2.2	Cuantificación mediante GC-Combustión-IRMS	61
III.2.3	Cuantificación mediante GC-FID	62
III.2.4	Determinación de deltas de carbono mediante GC-IRMS	63
III.2.5	Síntesis del dióxido de carbono enriquecido empleado como trazador	64
III.3	MATERIALES Y REACTIVOS	64
III.3.1	Materiales	64
III.3.2	Patrones	65
III.3.3	Muestras	66
III.3.4	Reactivos generales	66
IV	Resultados y Discusión	67
IV.1	CAPÍTULO 1	69
	Modificación de un Cromatógrafo de Gases- Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (GC-IRMS) para la aplicación de la Dilución Isotópica en Línea de Carbono	69

IV.1.1	PROTOTIPO INSTRUMENTAL GC-COMBUSTIÓN-(Q)-MS PARA LA APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA.....	70
IV.1.1.1	Procedimiento experimental GC-combustión-(Q) MS con Dilución Isotópica en línea de carbono.....	73
IV.1.1.2	Limitaciones instrumentales del prototipo GC-C-(Q)-MS para el desarrollo de aplicaciones mediante Dilución Isotópica en línea de carbono	73
IV.1.1.2.1	Inyector	74
IV.1.1.2.2	Horno de combustión.....	75
IV.1.1.2.3	Válvula de dos posiciones y seis vías.....	76
IV.1.1.2.4	Fuente de ionización	77
IV.1.1.2.5	Analizador de masas y Detección	78
IV.1.1.3	Conclusiones	78
IV.1.2	CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (GC-IRMS)	79
IV.1.2.1	Procedimiento general para la medida de alta precisión de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mediante GC-IRMS	81
IV.1.2.2	Sistemas de introducción de muestra.....	84
IV.1.2.3	Cromatógrafo de gases	85
IV.1.2.3.1	Resolución	86
IV.1.2.3.2	Efectos isotópicos cromatográficos.....	87
IV.1.2.4	Interfase de combustión	88
IV.1.2.4.1	Reactor de combustión	88
IV.1.2.4.2	Eliminación de los productos de combustión interferentes	89
IV.1.2.4.3	Eliminación del disolvente.....	90
IV.1.2.4.4	Amortiguador de presión	91
IV.1.2.5	Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas	91
IV.1.2.6	Idoneidad de la instrumentación GC-IRMS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono	93
IV.1.3	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LA INSTRUMENTACIÓN GC-COMBUSTIÓN-IRMS EMPLEADA.....	95
IV.1.3.1	Sistema de introducción de muestra	95
IV.1.3.1.1	Inyector split/splitless en modo splitless	96
IV.1.3.1.2	Inyector PTV en modo splitless	97
IV.1.3.2	Interfase de combustión	99
IV.1.3.2.1	Reactor de combustión	99
IV.1.3.2.2	Eliminación del agua de los productos de combustión	101
IV.1.3.2.3	Eliminación del disolvente.....	102
IV.1.3.2.4	Amortiguador de presión	102

Índice

IV.1.3.3	Espectrómetro de masas	104
IV.1.4	COMPARACIÓN INSTRUMENTAL	104
IV.1.5	MODIFICACIÓN INSTRUMENTAL PARA LA APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA	107
IV.1.5.1	Introducción del flujo del trazador isotópico	107
IV.1.5.2	Configuración ¹³ CO ₂	108
IV.1.6	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	111
IV.1.6.1	Ensanchamiento de los picos cromatográficos	111
IV.1.6.2	Precisión de la relación isotópica	113
IV.1.6.3	Sensibilidad y límites de detección.....	113
IV.1.6.4	Conclusiones.....	114
IV.1.7	ANALITOS DE INTERÉS	117
IV.1.8	APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA A COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ALTO PESO MOLECULAR: HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	118
IV.1.8.1	Identificación	118
IV.1.8.2	Evaluación del inyector: efectos de discriminación.....	119
IV.1.8.3	Evaluación de la Dilución Isotópica en línea de carbono para la cuantificación de compuestos puramente orgánicos de alto peso molecular sin estándares específicos 123	
IV.1.9	APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA A COMPUESTOS CON HETEROÁTOMOS EN SU ESTRUCTURA.....	129
IV.1.9.1	Bifenilos Policlorados	130
IV.1.9.2	Benzotiofenos.....	132
IV.2	CAPÍTULO 2.....	135
IV.2.1	DETECTORES UNIVERSALES PARA COMPUESTOS ORGÁNICOS EN GC. ESTUDIO DE LA CALIBRACIÓN INDEPENDIENTE DEL COMPUESTO.....	137
IV.2.1.1	Factor de respuesta y calibración independiente del compuesto.	137
IV.2.1.2	Detector de ionización de llama (FID)	139
IV.2.1.2.1	Estimación de los factores de respuesta para la detección FID: calibración independiente del compuesto.....	141
IV.2.1.2.2	Métodos quimiométricos para la estimación de los factores de respuesta sin estándares específicos mediante GC-FID.....	145
IV.2.1.3	Espectrómetro de Masas con fuente de ionización electrónica (EI-MS).....	146
IV.2.1.3.1	Fuente de ionización electrónica	147
IV.2.1.3.2	Capacidad del detector EI-MS para la aplicación de la calibración independiente del compuesto.....	148
IV.2.1.4	Detector de Emisión Atómica (AED).....	150
IV.2.1.4.1	Calibración independiente del compuesto en GC-AED.....	151
IV.2.1.5	Comparación crítica.....	152

IV.2.2	DETERMINACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS EN BIODIESEL: NECESIDAD DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS.....	155
IV.2.2.1	Biodiesel: marco global y normativa vigente	155
IV.2.2.2	Importancia de la determinación de FAMES en biodiesel	158
IV.2.2.2.1	Determinación del origen del biodiesel.....	158
IV.2.2.2.2	Determinación de las propiedades físico-químicas.....	164
IV.2.2.3	Determinación de FAMES en biodiesel B100	169
IV.2.2.3.1	Normativa vigente: EN 14103	169
IV.2.3	EVALUACIÓN DE LA NORMA EN-14103 EN LA DETERMINACIÓN DE LOS FAMES INDIVIDUALES DE UN BIODIESEL USANDO GC-FID	175
IV.2.3.1	Determinación de los FAMES individuales de una mezcla estándar	175
IV.2.3.1.1	Evaluación del Número de Carbonos Efectivo para la determinación por GC-FID de los FAMES individuales en una mezcla estándar	178
IV.2.3.2	Determinación por GC-FID de los FAMES individuales presentes en un biodiesel de soja B100 certificado	180
IV.2.4	APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE CARBONO A LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS	185
IV.2.4.1	Determinación de los FAMES individuales de una mezcla estándar	185
IV.2.4.2	Evaluación de la respuesta del inyector para la mezcla estándar de FAMES C8:0-C24:0	189
IV.2.4.3	Características analíticas de la instrumentación GC-IRMS para la cuantificación de los FAMES individuales de un biodiesel	191
IV.2.4.3.1	Linealidad	191
IV.2.4.3.2	Resolución Cromatográfica	192
IV.2.4.3.3	Límites de detección.....	192
IV.2.4.4	Determinación de los FAMES individuales presentes en un biodiesel B100 certificado.....	193
IV.2.4.5	Evaluación de patrones internos alternativos para GC-IRMS	195
IV.3	CAPÍTULO III	201
IV.3.1	DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO ABSOLUTO PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BIODIESEL (TAREA 2)	202
IV.3.1.1	Cuantificación de los principales FAMES constituyentes en muestras reales de biodiesel	203
IV.3.1.2	Caracterización química: determinación del contenido total de ésteres y del éster metílico del ácido linolénico.....	210
IV.3.1.3	Caracterización “física” de un biodiesel a partir de la cuantificación de sus principales FAMES constituyentes.....	211
IV.3.1.3.1	Índice de iodo	212

Índice

IV.3.1.3.2	Número de cetanos.....	213
IV.3.1.3.3	Viscosidad cinemática.....	214
IV.3.2	DISCRIMINACIÓN DEL BIODIESEL POR SU ORIGEN (TAREA 3)	215
IV.3.2.1	El Análisis Cuantitativo como factor discriminante	216
IV.3.2.2	Análisis Isotópico Específico del Compuesto como factor discriminante	220
IV.3.2.2.1	Elección del estándar de referencia para el cálculo de $\delta^{13}\text{C}$	222
IV.3.2.2.2	Determinación del $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMEs en muestras reales de biodiesel	223
IV.3.2.3	Combinación de la IDMS en línea de carbono con CSIA para la discriminación del biodiesel por su origen.....	226
V	Conclusiones.....	229
VI	Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral	235
VI.1	. Publicación científica 1	237
VI.2	Publicación científica 2	237
VII	Anexo	239
VII.1	Anexo 1	240
VIII	Bibliografía	251

Índice de Figuras

Figura 1. Principales contribuciones al desarrollo de la Espectrometría de Masas.	8
Figura 2. Tipos de IDMS.....	11
Figura 3. Procedimiento general para la cuantificación de compuestos orgánicos mediante IDMS orgánica para una muestra de composición isotópica natural y un trazador con n isótopos marcados, donde a y b representan los isótopos de interés para la medida de la relación isotópica.	15
Figura 4. Procedimiento general para una muestra de composición isotópica natural y un trazador certificado mediante IDMS inorgánica para un elemento biisotópico (a y b).....	20
Figura 5. Procedimiento empleado para la obtención del cromatograma de flujo molar a partir del cromatograma de intensidades y la aplicación de la ecuación de la Dilución Isotópica en línea.	27
Figura 6. Posibles configuraciones para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea: a) en continuo, b) por inyección en flujo, c) en un sistema cromatográfico HPLC, y d) en un sistema cromatográfico GC.....	32
Figura 7. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla sintética de n-alcanos utilizada para la validación del procedimiento de la dilución isotópica en línea de carbono en GC. El tetradecano fue el patrón interno empleado [67].....	39
Figura 8. Cromatograma de flujo másico para la mezcla de BTEX, ésteres y alcanos empleada para demostrar el carácter genérico del procedimiento IDMS en línea de carbono. El n-tetradecano fue el patrón interno empleado. La identidad de los picos cromatográficos se dan en la Tabla 1. [71]	41
Figura 9. Cromatograma de flujo másico para una muestra de diésel obtenido mediante Gc-Combustión-MS con Dilución Isotópica en línea de carbono. El patrón interno fue el burirato de hexilo. [67]	43

Índice

Figura 10. Esquema del equipo comercial GC-Combustión-IRMS para la medida de alta precisión de las relaciones isotópicas de carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	53
Figura 11. Procedimiento general de la Dilución Isotópica en línea de carbono en cromatografía de gases.	60
Figura 12. Esquema del primer prototipo instrumental desarrollado GC-Combustión-(Q)MS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono.	71
Figura 13. Diseño Thermo Scientific de los inyectores disponibles en el equipo GC-Combustión-IRMS empleado: a) inyector split/splitless y b) inyector PTV..	97
Figura 14. Procedimiento general del inyector PTV en modo splitless.	99
Figura 15. Reactor de combustión diseñado por Thermo Scientific para el análisis isotópico de carbono.....	101
Figura 16. Modos de trabajo empleados en la instrumentación GC-IRMS: a) Modo Backflusf y b) Modo Directo.	103
Figura 17. Modificación instrumental detallada para la introducción del flujo en línea del trazador a través del divisor de flujos localizado en el interior del horno cromatográfico en a) modo backflush y b) modo directo.	108
Figura 18. Cromatogramas tipo para a) el análisis isotópico específico del compuesto (configuración $^{12}\text{CO}_2$) y b) aplicaciones de dilución isotópica de carbono en línea (configuración $^{13}\text{CO}_2$).	109
Figura 19. Representación gráfica de la desviación temporal de los isotopómeros estables del carbono debido al fraccionamiento isotópico durante la separación cromatográfica.....	110
Figura 20. Cromatogramas de intensidad (a y b) y de relación isotópica 44/45 (c y d) obtenidos para el n-tetradecano (8 μg C/g) mediante GC-IRMS (a y c) y GC-Combustión-(Q)-MS empleando un flujo de trazador $^{13}\text{CO}_2$ de 0,5 mL/min. ...	112

Figura 21. Esquema de las mejoras instrumentales propuestas sobre el prototipo original desarrollado para la Dilución Isotópica en línea de carbono en ambas configuraciones disponibles: a) GC-MS y b) GC-Combustión-MS.	116
Figura 22. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por $\mu\text{g C/g}$ inyectado) de los 16 PAHs analizados, dados por orden de elución, durante la optimización de la inyección PTV.	121
Figura 23. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por $\mu\text{g C/g}$ inyectado) de los 16 PAHs analizados, dados por orden de elución, empleando el inyector en modo splitless tanto en modo convencional como PTV. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar para $n=3$	122
Figura 24. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla sintética de PAHs ($8,5 \mu\text{g C/g}$) y n-alcanos ($10 \mu\text{g C/g}$). El patrón interno empleado fue el benzo(b)fluoreno ($8,5 \mu\text{g C/g}$).	125
Figura 25. Comparación de las recuperaciones obtenidas para la mezcla sintética de PAHs y alcanos empleando el benzo(b)fluoreno como patrón interno mediante el procedimiento de Dilución Isotópica en línea y mediante el cálculo de factores de respuesta para m/z 44. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para $n=5$	127
Figura 26. Ampliación del cromatograma de intensidades obtenido para mezcla sintética de PAHs y n-alcanos. Corrección del flujo de trazador en línea sobre los primeros compuestos orgánicos eluidos.	128
Figura 27. Cromatograma de flujo másico para la mezcla estándar de PCBs ($15 \mu\text{g/g}$). El patrón interno utilizado fue el octadecano ($9 \mu\text{g C/g}$).	131
Figura 28. Recuperaciones obtenidas para la mezcla estándar de PCBs (azul) y benzotiofenos (rojo) empleando el octadecano y pentadecano, respectivamente para la obtención de los datos cuantitativos. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para $n=3$	132
Figura 29. Cromatograma de flujo másico para la mezcla de benzotiofenos ($7 \mu\text{g C/g}$). El patrón interno utilizado fue el pentadecano ($17 \mu\text{g C/g}$).	133

Índice

Figura 30. Esquema del detector de ionización de llama.	140
Figura 31. Diagrama de una fuente de ionización electrónica en espectrometría de masas.	147
Figura 32. Esquema del detector de emisión atómica (AED) para GC.....	150
Figura 33. Esquema del proceso de transesterificación normalmente empleado para la obtención de biodiesel.	160
Figura 34. Perfil del biodiesel basado en soja, colza y palma según la composición de sus FAMES mayoritarios.	163
Figura 35. Perfil del biodiesel basado en colza y canola a partir de la composición de sus FAMES mayoritarios.	163
Figura 36. Cromatograma de la mezcla de FAMES constituida por los FAMES pares y saturados C4:0-C24:0 y los FAMES C18 insaturados C18:1, C18:2 y C18:3. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).....	176
Figura 37. Comparación de las recuperaciones, expresadas en %, obtenidas mediante GC-FID, empleando el procedimiento del porcentaje de áreas (barras en azul) y tras su corrección por ECN (barras en gris). Las barras de error se corresponden a la desviación estándar obtenida para n=5.	179
Figura 38. Perfil cromatográfico de los FAMES presentes en el SRM 2772 basado en soja obtenido mediante GC-FID. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).....	181
Figura 39. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla estándar de FAMES (15 µg C/g). El patrón interno empleado fue el heptadecanoato de metilo (10 µg C/g).	187
Figura 40. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por µg C/g inyectado) de los 9 FAMES analizados, dados por orden de elución, empleando inyección splitless e inyección PTV y Dilución Isotópica de Carbono. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar para n=5.....	190

Figura 41. Cromatograma de intensidad obtenido para el hexanoato de metilo (C16:0) mediante GC-IRMS.	193
Figura 42. Perfil cromatográfico de los FAMES presentes en el SRM 2772 a través del cromatograma de flujo másico obtenido mediante GC-combustión-IRMS. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).	194
Figura 43. Perfil cromatográfico de los biodiesel basados en soja (a) biodiesel mejicano SME-mx y (b) biodiesel brasileño SME-br, obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.	205
Figura 44. Perfil cromatográfico de los biodiesel basados en canola (a) biodiesel americano CME-us y (b) biodiesel alemán RME-de, obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.	206
Figura 45. Perfil cromatográfico del biodiesel desconocido UME-es obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono en línea. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.	208
Figura 46. Comparación estadística del test-t de Student de la concentración de FAMES encontrada en las muestras reales de biodiesel. El método EN 14103 GC-FID fue considerado como referencia.	210
Figura 47. Representación gráfica de la correlación entre las concentraciones de los FAMES C18:1 y C18:2 como parámetro para la discriminación del biodiesel por su origen vegetal.	217
Figura 48. Comparación de la concentración de los FAMES mayoritarios del biodiesel desconocido UME-es con los de un biodiesel virtual formado a partir de la mezcla de un biodiesel basado en palma y soja en una proporción 80:20.	218
Figura 49. Análisis de componentes principales realizado a partir de la concentración de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen vegetal y geográfico. Los marcadores circulares representan	

Índice

los datos recogidos en la literatura y los marcadores romboides las muestras analizadas en este estudio.....	219
Figura 50. Cromatograma modelo obtenido mediante GC-IRMS para el cálculo de $\delta^{13}\text{C}$ de los FAMES mayoritarios del biodiesel basado en soja SME-mx.....	221
Figura 51. Huella dactilar de $\delta^{13}\text{C}$ para las cinco muestras de biodiesel analizadas. El $\delta^{13}\text{C}$ del FAME C18:1 fue utilizado como estándar interno de referencia.....	224
Figura 52. Análisis de componentes principales realizado a partir de los $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen vegetal y geográfico.	225
Figura 53. Análisis de componentes principales realizado a partir de la concentración y los $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen vegetal y geográfico.	226

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados cuantitativos de la mezcla de BTEX, ésteres y n-alcanos obtenidos durante la validación de la metodología. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=5. [71].....	42
Tabla 2. Comparación de la recuperación absoluta obtenida para tres tipos diferentes de fibras SPME empleando la Dilución Isotópica en Línea de Carbono. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=3 [71].	44
Tabla 3. Condiciones experimentales GC-IRMS empleadas en el estudio de compuestos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura.	56
Tabla 4. Condiciones experimentales GC-MS para la identificación de PAHs, PCBs y benzotiofenos.	57
Tabla 5. Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación, cuantificación y cálculo de $\delta^{13}C$ de FAMEs mediante GC-combustión-IRMS y GC-FID.	58
Tabla 6. Isotopólogos de la molécula de CO ₂ y contribución de cada uno de ellos a las masas 44, 45 y 46, características de los análisis GC-IRMS.	82
Tabla 7. Amplificación de las copas de Faraday para m/z 44, 45 y 46 en las dos configuraciones de trabajo disponibles.	104
Tabla 8. Resultados cuantitativos para la mezcla sintética de PAHs y n-alcanos mediante la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono y a través de la respuesta genérica del GC-IRMS para m/z 44. Se utilizó el benzo(b)fluoreno como patrón interno genérico. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=5.	126
Tabla 9. Contribución del número de carbonos efectivo empleado para la predicción de los factores de respuesta en GC-FID.	143
Tabla 10. Características analíticas de los detectores universales para compuestos orgánicos en GC cuando se emplea la CIC para el carbono.	154
Tabla 11. Especificaciones para biodiesel de acuerdo a la Norma EN 14214.	157

Índice

Tabla 12. Nombre común, nomenclatura, fórmula molecular y peso molecular de los FAMEs típicamente encontrados en un biodiesel (aparecen resaltados en gris los FAMEs predominantes).....	160
Tabla 13. Contenido de los FAMEs (%m/m) C6:0-C24:1 encontrados en los biocombustibles de origen vegetal más representativos. Resaltados en gris se encuentran los FAMEs recogidos por la norma EN 14103:2003.....	172
Tabla 14. Recuperaciones obtenidas para los compuestos individuales de la mezcla de FAMEs empleando el C17:0 como patrón interno. La incertidumbre está calculada como la desviación estándar para n=5.	177
Tabla 15. Concentraciones certificadas o de referencia para los Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos del SRM 2772. *Valores de referencia.	180
Tabla 16. Comparación de las recuperaciones obtenidas de los FAMEs individuales del SRM 2772 aplicando la norma EN 14103 y corregida por ECN. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar para n=5. *Valor de referencia.....	183
Tabla 17. Comparación de las recuperaciones obtenidas tras la determinación individual de los FAMEs de una mezcla estándar (C4:0-C24:0) mediante GC-IRMS con Dilución Isotópica en línea de carbono y GC-FID, aplicando la norma EN 14103, y aplicando la corrección del ECN. La incertidumbre se da como la desviación estándar para n=5. El patrón interno utilizado fue el FAME C17:0.	189
Tabla 18. Comparación de las recuperaciones cuantitativas obtenidas de los FAMEs individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID sin el empleo del ECN. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno.....	196
Tabla 19. Comparación de las recuperaciones cuantitativas obtenidas de los FAMEs individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID sin el empleo del ECN teniendo en cuenta el porcentaje del FAME C17:0 presente en el biodiesel. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno.	197
Tabla 20. Recuperaciones calculadas de los FAMEs individuales de la mezcla estándar de los FAMEs pares y saturados C4:0-C24:0 y de los FAMEs C18 insaturados obtenidos mediante GC-IRMS examinando diferentes compuestos	

como patrón interno. Las incertidumbres indican las desviaciones estándar para n=5.....	198
Tabla 21. Comparación de las recuperaciones obtenidas para los FAMES individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID empleando patrones internos de diferente naturaleza.....	200
Tabla 22. Concentración de los FAMES individuales, expresada en mg/g, de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparada con la obtenida mediante GC-FID.	209
Tabla 23. Contenido total de los ésteres metílicos y del éster metílico de ácido linolénico, expresado en porcentaje en masa, de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica de carbono en línea (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparada con la obtenida mediante GC-FID.	211
Tabla 24. Índice de iodo de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenido mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparado con el obtenido mediante GC-FID.	212
Tabla 25. Número de cetanos de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparados con los obtenidos mediante GC-FID.....	214
Tabla 26. Viscosidad cinemática de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida por la cuantificación de los FAMES mayoritarios mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparados con los obtenidos mediante GC-FID.....	215
Tabla 27. $\delta^{13}C$ calculado para el estándar de referencia (C11, C15, y C20) y para los pulsos de CO ₂ tomando cada uno de los compuestos certificados como referencia. La incertidumbre asociada se da como la desviación estándar para n=10.....	223

Índice

Tabla 28. $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES de las muestras de biodiesel de origen vegetal, calculados mediante GC-IRMS. La incertidumbre asociada se corresponde con la desviación estándar para $n=5$ 223

I Introducción

Desde 1997 el análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas está considerado un método primario de análisis directamente trazable al Sistema Internacional de unidades [1]. Hoy en día esta metodología se utiliza para la medida de elementos y compuestos orgánicos por la alta calidad metrológica de los resultados que proporciona, teniendo un especial interés en la certificación de patrones y materiales de referencia.

Es una metodología resolutive capaz de dar respuesta a la problemática existente en la cuantificación de manera exacta y precisa de elementos o compuestos orgánicos en muestras de diferente naturaleza. Además, se han desarrollado diversos modos de cuantificación complementarios que permiten la elección de la metodología más adecuada para cada aplicación concreta, proporcionando a la técnica una alta flexibilidad. La Dilución Isotópica emplea un gran número de herramientas matemáticas que requieren un gran esfuerzo inicial para su comprensión completa pero que resultan muy útiles para la obtención de resultados de alta calidad y para simplificar finalmente los tiempos y costes del análisis.

En 2009 surge un nuevo modo de Dilución Isotópica para la cuantificación de compuestos orgánicos a partir de la detección de carbono, que ha supuesto un gran avance para la Química Analítica. Se ha desarrollado un detector genérico y universal que no requiere el uso de estándares específicos ni calibraciones externas. Este nuevo modo de Dilución Isotópica es especialmente útil cuando no se dispone de los estándares de abundancia natural para la cuantificación por calibración o los análogos marcados para la aplicación de la dilución isotópica convencional.

A lo largo de esta introducción se tratará de dar una visión global del análisis por Dilución isotópica con Espectrometría de Masas con el objetivo de mostrar la evolución y el alcance de la metodología. Esto ofrecerá una mejor comprensión de la aparición, desarrollo y aplicabilidad de la ***Dilución Isotópica en Línea de Carbono*** como detector genérico de compuestos orgánicos, metodología en la cual se basa la presente Tesis Doctoral para adaptarla a nuevos equipos y desarrollar nuevas aplicaciones.

I.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La evolución del análisis por Dilución Isotópica ha dependido en gran medida del desarrollo de la Espectrometría de Masas así como de la disponibilidad de los elementos y compuestos enriquecidos isotópicamente. En la

Figura 1 se han recogido de manera esquemática las principales contribuciones al nacimiento y desarrollo de la Espectrometría de Masas así como sus aplicaciones en diferentes campos científicos, con el fin de contextualizar el descubrimiento de los isótopos y la aparición del análisis por Dilución Isotópica empleando la Espectrometría de Masas.

I.1.1 Descubrimiento de los isótopos y evolución de la Espectrometría de Masas

La existencia de los isótopos surgió a finales del siglo XIX en base a la medida de los pesos atómicos de algunos elementos. Los elementos más ligeros presentaban todos ellos pesos atómicos que se correspondían a números enteros, a excepción del cloro (35,5). Este hecho quebrantaba la conocida “regla del número entero” formulada por W. Prout en 1815, la cual postulaba que las masas atómicas de los elementos eran múltiplos de la masa del hidrógeno [2]. Sin embargo, no fue hasta 1927 cuando F. W. Aston explicó la anomalía en el peso atómico del cloro [3][4][5]. Gracias al trabajo desarrollado por J. J. Thomson [6][7][8] y por A. J. Dempster [9], Aston descubrió la existencia de los dos isótopos del cloro a masas 35 y 37 con abundancias relativas de 0,758 y 0,242, respectivamente. Este hecho explicaba el peso atómico observado para el cloro de 35,5 g/mol. En 1925 se conocía la composición isotópica de unos 50 elementos químicos y en 1948 el número aumentó hasta 83, gracias principalmente a los trabajos de Aston y Dempster.

La contribución de A. Nier durante los años 40 en el desarrollo instrumental de nuevos equipos y su repercusión en el campo clínico y geocronológico marcó un antes y un después en la Espectrometría de Masas [10][11][12][13]. La separación de los isótopos de Uranio [14] en plena II Guerra Mundial, junto con el interés por la industria en el análisis de hidrocarburos, estimuló la construcción y producción de nuevos espectrómetros de masas. Así, a partir de los años 50 se desarrollaron y

comercializaron nuevos analizadores y fuentes de ionización que permitieron el análisis de un gran número de moléculas. El desarrollo de la fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) fue un gran avance en análisis inorgánico, convirtiéndose en la técnica más utilizada actualmente en el análisis elemental de trazas y ultratrazas [15]. Por otra parte, la posibilidad del acoplamiento de técnicas de separación cromatográficas a la Espectrometría de Masas provocó un gran aumento en el número de aplicaciones. Actualmente, la Espectrometría de Masas está considerada una técnica totalmente consolidada que se está imponiendo de manera progresiva en los laboratorios de rutina.

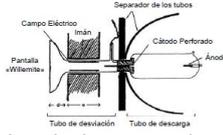
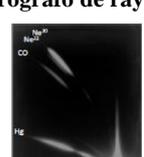
I.1.2 Composición isotópica de los elementos

Las abundancias isotópicas de los elementos son prácticamente constantes en la naturaleza. Sin embargo, existen pequeñas diferencias para algunos elementos debidas fundamentalmente a procesos de decaimiento nuclear o fraccionamiento isotópico. Nier introdujo en 1939 el concepto de la medida de relaciones isotópicas en datación de minerales. Describió que los isótopos de ^{207}Pb , ^{206}Pb y ^{208}Pb eran productos del decaimiento radioactivo del ^{235}U , ^{238}U y ^{232}Th , respectivamente [10] [11], haciendo que la composición isotópica del plomo no sea constante en la naturaleza y dependa de la fuente del mineral. Existen otros elementos, denominados radiogénicos, que proceden de series de desintegración radiactivas y que presentan una variación en su composición isotópica similar a la del plomo. Por otro lado, existen procesos físicos, químicos y biológicos que favorecen el enriquecimiento de un isótopo sobre otro dando lugar a pequeñas variaciones en la composición isotópica de algunos elementos. En 1931 H. Urey observó diferencias en la composición isotópica del hidrógeno al analizar diferentes materiales naturales. Cinco años más tarde, A. Nier estudió la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en diferentes fuentes de carbono, observando una incorporación preferencial de ^{13}C en la formación de algunas rocas [12]. El estudio de la variación de la composición isotópica de los elementos ha sido una herramienta muy útil para el desarrollo de nuevas aplicaciones, así como para la producción de isótopos enriquecidos.

Cuando se aplica el análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas (IDMS), las abundancias de los elementos se consideran constantes debido a que

Introducción

las incertidumbres en la composición isotópica de los elementos proporcionadas por la IUPAC debidas a las variaciones naturales, no son muy significativas y pueden ser ignoradas en la mayoría de los casos.

S. XIX	Goldstein 1886	→ Descubrimiento de los rayos anódicos en tubos de descarga a baja presión
	Wien 1898	→ Estudio de la desviación de los rayos anódicos por campos eléctricos y magnéticos → Descripción de la carga y de la relación carga/masa (e/m) de los rayos anódicos → protones
	Thomson	
S. XX	1906	→ Premio Nobel de Física por el descubrimiento del electrón tras la medida de la relación e/m de los corpúsculos responsables de la formación de los rayos anódicos
	1907-1910	→ Desarrollo del espectrógrafo de masas parabólico con detección fluorescente Aparición de las líneas del hidrógeno y del helio
	Aston 1910	→ Modificación de equipo desarrollado por Thomson con tubos de descarga más grandes y detección fotográfica → espectrógrafo de rayos positivos ↳ Mejora en la resolución y precisión de las trayectorias de los iones ↳ Parábolas con distintas relaciones e/m comenzaron a ser visibles para los distintos gases
		
	1912	→ Primer estudio cuantitativo al sustituir la placa fluorescente por una copa de Faraday ↳ Análisis de una muestra de monóxido de carbono considerado el primer espectro de masas
		
		→ Realización del Primer experimento evidente de la existencia de isótopos con el espectrógrafo de rayos positivos tras el estudio de diferentes gases ↳ Aparición de dos líneas para el Neon, una más intensa a masa 19,9 y otra más débil a masa 22,1 en una proporción 10:1 → mezcla de dos elementos de pesos atómicos diferentes
		
		
		Soddy 1913
	Dempster 1918	→ Construcción del primer espectrógrafo de masas de sector magnético de 180° → Identificación y determinación las abundancias isotópicas de Mg, Li, K y Zn → Introducción de la fuente de ionización electrónica (EI)
	Aston 1919	→ Construcción del primer espectrógrafo de masas para la medida de la composición isotópica de los elementos (basado en el equipo de Dempster)
	1922	→ Premio Nobel de Química por el descubrimiento de un gran número de isótopos no radioactivos
	1927-1937	→ Desarrollo y construcción de sucesivos espectrógrafos de masas con mejoras de resolución y precisión

Determinación de la composición isotópica de la mayoría de los elementos			
Premio Nobel de Química por la separación de deuterio mediante destilaciones repetidas en muestras de hidrógeno líquido	←	Urey 1934	
		Nier	
Medida de relaciones isotópicas de Pb y U para la datación de minerales (geocronología)	←	1936	
Estudio de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en diferentes fuentes de carbono ↳ Asimilación preferencial (fraccionamiento isotópico) de $^{13}\text{CO}_2$ respecto a $^{12}\text{CO}_2$ en la formación de algunas rocas			
Interés por la separación de los isótopos de carbono por su interés en clínica → método de enriquecimiento de ^{13}C mediante difusión térmica	←		
Construcción del primer espectrómetro de masas de sector magnético de 60°	←	1940	Segunda Guerra Mundial (1939-1945)
↳ tubo analizador bajo condiciones de alto vacío ↳ detección electrométrica con amplificación de la señal ↳ Separación de isótopos de uranio (^{235}U) → comienza a desarrollarse el calutrón para la producción de ^{235}U a gran escala			
Se lanza al mercado el primer espectrómetro de masas de sector magnético para el análisis de compuestos orgánicos (gran interés de la industria por el análisis de hidrocarburos)	←	1942	
DESARROLLO y COMERCIALIZACIÓN de nuevos espectrómetros de masas			
ANALIZADORES	Tiempo de vuelo (TOF-MS) y acoplamiento a la cromatografía de gases alta velocidad de barrido/alta transmisión/análisis de grandes moléculas	Años 50	S. XX
	Alta resolución [Resonancia ciclotrónica de iones (ICR-MS) Doble enfoque		
	Sustitución del sector magnético por analizadores tipo Cuadrupolo barridos rápidos/sensibles/buena resolución/menor tiempo de análisis menor tamaño, coste y mantenimiento		
	Trampa iónica alta resolución y sensibilidad/análisis de moléculas de alto peso molecular		
FUENTES DE IONIZACIÓN	Desarrollo del láser y acoplamiento a analizadores TOF para análisis de superficies	Años 60	
	ICR-MS por transformada de Fourier (FTIRC-MS) alta resolución 10^4 - 10^6	Años 70	
	Plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) → Análisis inorgánico análisis elemental a nivel de trazas y ultratrazas	Años 80	
	Análisis de compuestos no volátiles con mínima descomposición ↳ Ionización por Electrospray (ESI-MS) y acoplamiento a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ↳ Ionización por Desorción con Láser Inducida por Matrices (MALDI-MS)		
	Orbitrap (≈ FTIRC con un coste más asequible) alta exactitud de masa y resolución	Años 90	
Aplicación multidisciplinar de la espectrometría de masas geofísica, geoquímica, toxicología, medioambiente, clínica,...		ACTUALIDAD	S. XXI
Consolidación de la técnica e imposición en laboratorios de rutina			

Figura 1. Principales contribuciones al desarrollo de la Espectrometría de Masas.

I.2 EL ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA

I.2.1 Concepto del Análisis por Dilución Isotópica (ID).

El análisis por Dilución Isotópica se basa en la modificación de la composición isotópica de un elemento o compuesto presente en una muestra, mediante la adición de una cantidad conocida de una forma enriquecida o marcada del mismo elemento o compuesto, al que generalmente se denomina trazador [16].

Actualmente, el análisis por Dilución Isotópica más extendido es el que utiliza isótopos estables y se basa en la medida de las abundancias o relaciones isotópicas de la mezcla y el trazador con un espectrómetro de masas para cuantificar elementos o compuestos de manera exacta y precisa. Gracias al desarrollo instrumental ha sido posible el estudio y la optimización de los diferentes factores que afectan a la calidad de la medida de las relaciones isotópicas, de la cual depende la exactitud y precisión de los resultados.

La IDMS con isótopos estables se puede considerar una variación de la ID radioquímica que consiste en medir la disminución en la actividad de un elemento radiactivo al diluirlo con el mismo elemento en su forma no activa. La ID radioquímica fue muy utilizada tras la II Guerra Mundial debido al bajo coste para el enriquecimiento de isótopos, la disponibilidad de elementos y compuestos radiactivos, y por el desarrollo de detectores de radiactividad comerciales. Sin embargo, el hándicap de utilizar una segunda técnica analítica como la gravimetría o volumetría para determinar la cantidad de analito hizo que este tipo de ID no se pudiera utilizar en el análisis de trazas y ultratrazas, ya que la sensibilidad estaba limitada por esta segunda técnica. Actualmente, la ID radioquímica no se utiliza en determinaciones analíticas y su uso está limitado a experimentos *in vivo* e *in vitro* en sistemas biológicos.

I.2.2 Ventajas del análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas

El análisis por Dilución Isotópica proporciona una serie de ventajas únicas con respecto a otras formas de medida que merecen ser nombradas de manera conjunta para comprender su verdadero potencial.

Una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de sustancia no afectará al resultado final ya que la relación isotópica R_m se mantendrá constante durante todo el proceso. Del mismo modo, las posibles transformaciones del analito durante la preparación de la muestra serán igualmente corregidas ya que las propiedades físico-químicas del analito y el trazador son prácticamente las mismas. Del mismo modo, cambios en la sensibilidad instrumental debidos a efectos de matriz o deriva de la señal serán igualmente corregidos y no afectarán al resultado final.

La incertidumbre en la medida de la concentración dependerá únicamente de la incertidumbre de la relación isotópica medida, la cual se puede determinar con alta exactitud y precisión mediante Espectrometría de Masas. Además, dependiendo del tipo de analito, el empleo del análisis por Dilución Isotópica puede proporcionar la cantidad de analito en una muestra sin la necesidad de calibrados metodológicos con el consecuente ahorro de tiempo y dinero.

Por último, el análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas está considerado un método primario relativo de medida por el Comité Consultivo para la Cantidad de Materia (CCQM) [1], ya que permite conocer todas las posibles fuentes de error haciendo que el proceso de medida sea directamente trazable al Sistema Internacional de unidades y proporcionando resultados de alta calidad metrológica.

I.2.3 Diferentes tipos de IDMS

Existen diferentes clasificaciones y modos de trabajo en el análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas. Dependiendo de qué marca isotópica se utilice se puede distinguir entre IDMS orgánica (marca isotópica en ^{13}C , ^2H , ^{15}N y ^{18}O) o inorgánica (marca isotópica en elementos diferentes al C, H, N y O). Según la fuente de ionización puede ser IDMS elemental (TIMS, ICP) o molecular (EI, ESI, etc.). Dependiendo de cuándo se añada el trazador distinguiremos entre IDMS específica (trazador análogo al analito introducido al inicio del análisis) o en línea (trazador genérico que se añade de manera continua).

En la Figura 2 se muestra un esquema de esta clasificación.

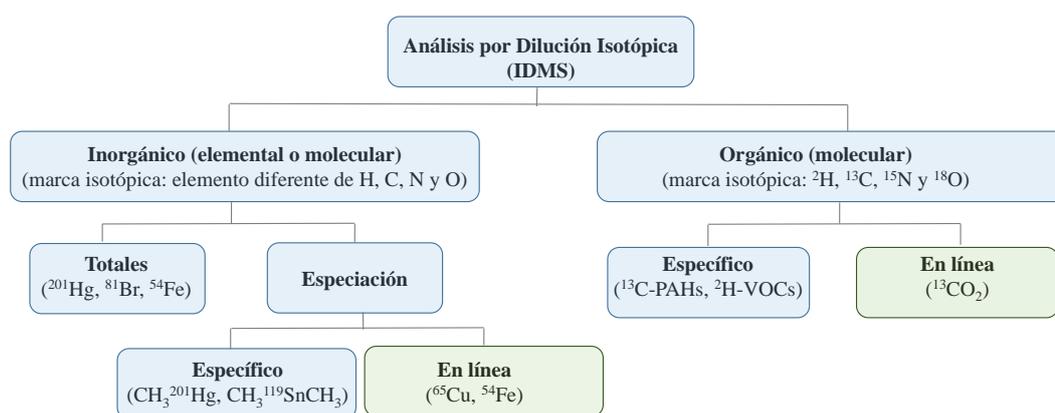


Figura 2. Tipos de IDMS.

La Dilución Isotópica en línea se abordará de manera independiente en los epígrafes I.3 y I.4 de la introducción debido principalmente a su aparición más reciente, al empleo de ecuaciones y procedimientos característicos, y por ser el modo de Dilución Isotópica utilizado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

I.2.3.1 IDMS Orgánica

Las primeras aplicaciones donde se utilizaron isótopos estables enriquecidos para el análisis por dilución isotópica con Espectrometría de Masas se remontan a 1939 y 1940 [17] [18]. Rittenberg y Foster desarrollaron un nuevo método de cuantificación de compuestos orgánicos en mezclas complejas. Emplearon aminoácidos marcados en ^{15}N y ácidos grasos marcados en deuterio para el análisis cuantitativo de hidrolizados de proteínas. La ecuación [1] fue la utilizada por Rittenberg y Foster para la cuantificación y es considerada la ecuación de la dilución isotópica original en análisis orgánico [19]:

$$Y = \left(\frac{C_0}{C - 1} \right) X \quad [1]$$

Donde Y es la cantidad de analito a determinar, X es la cantidad de compuesto marcado añadido, C_0 es el enriquecimiento isotópico del compuesto marcado y C es el enriquecimiento de la fracción aislada de la muestra.

A partir de 1945, los estudios metabólicos comenzaron a desarrollarse con isótopos radioactivos debido al descubrimiento del ^{14}C y su alta disponibilidad después de la II Guerra Mundial. Solamente, se continuó utilizando el ^{15}N y ^{18}O por la falta de isótopos radioactivos para estos elementos. Durante los años 70, la IDMS en análisis orgánico reaparece con gran fuerza debido fundamentalmente a los avances instrumentales realizados, a la creciente comercialización de los espectrómetros de masas y a la mayor disponibilidad de los compuestos marcados isotópicamente. Es también en los años 70 cuando comienza a desarrollarse el fundamento teórico de la IDMS orgánica a partir de las ecuaciones bien establecidas en IDMS inorgánica.

La IDMS orgánica tradicional requiere la adición a la muestra de un compuesto análogo al analito, enriquecido en uno o varios átomos de ^{13}C , ^2H , ^{15}N u ^{18}O . Al igual que en IDMS inorgánica, el principio básico reside en obtener la concentración del analito a partir de la medida de la relación isotópica en la muestra adicionada, la cual debe mantenerse constante a lo largo de todo el procedimiento analítico. Sin embargo, hay ciertas limitaciones en la medida de las distribuciones isotópicas moleculares que no permiten la aplicación de las ecuaciones de la dilución isotópica inorgánica. Este hecho marca una diferencia clara respecto a los procedimientos empleados para análisis inorgánico y obliga habitualmente a la construcción de una gráfica de calibración. En este caso, el trazador isotópico se utiliza como un patrón interno análogo al analito a determinar, siendo ésta la mejor elección para procedimientos de calibración con patrón interno.

I.2.3.1.1 Ecuaciones de la Dilución Isotópica orgánica

En 1976 Pickup y McPherson [20] adaptaron la ecuación de la Dilución Isotópica inorgánica propuesta previamente por Hitenberg [21] haciendo posible el análisis de moléculas orgánicas por Dilución Isotópica bajo los mismos criterios establecidos. El desarrollo de la ecuación comienza considerando el número de moles o moléculas de un compuesto orgánico presente en la muestra N_s y el número de moles o moléculas del mismo compuesto con una o varias posiciones marcadas isotópicamente N_t . Por tanto, el número de moles del compuesto en la mezcla N_m resultante vendrá dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad [2]$$

De la misma manera se pueden establecer balances de masa para los dos isótopos del elemento sobre el que se realiza la marca en la molécula, donde el isótopo a se refiere al isótopo de referencia para el compuesto de abundancia natural y el isótopo b al isótopo de referencia para el trazador:

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad [3] \quad N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad [4]$$

Dividiendo ambas ecuaciones se obtiene la relación isotópica en la mezcla R_m . Teniendo en cuenta las abundancias de los isótopos a y b en la muestra, A_s^a y A_s^b , y en el trazador, A_t^a y A_t^b , la relación isotópica en la muestra se puede expresar de la siguiente manera:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad [5]$$

Hasta este momento el desarrollo de la ecuación para análisis inorgánico y orgánico es exactamente el mismo. Sin embargo, debido al desconocimiento de la composición isotópica del trazador, Pickup y McPherson adaptaron esta ecuación a una gráfica de calibración dividiendo numerador y denominador por el número de moles del trazador:

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} A_s^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} A_s^b + A_t^b} \quad [6]$$

La ecuación [6] es la forma básica de la ecuación de la Dilución Isotópica orgánica. Cuando se evita el solapamiento espectral entre el compuesto natural y el marcado isotópicamente por el empleo de un número suficiente de isótopos marcados, la ecuación [6] adopta un comportamiento lineal. La ausencia de solapamiento espectral indica que la abundancia de la masa b en el compuesto de abundancia natural es cero y que la abundancia de la masa a es igualmente cero en el análogo marcado (trazador). Bajo estas condiciones la ecuación [6] se reduce a la siguiente ecuación:

$$A_s^b = 0, A_t^a = 0 \quad R_m = \frac{A_s^a}{A_t^b} \frac{N_s}{N_t} \quad [7] \quad [7]$$

Representando la relación isotópica medida frente a la relación molar N_s/N_t , para cantidades crecientes de analito de abundancia natural adicionado con la misma cantidad de análogo marcado, se obtiene una recta de calibración de pendiente A_s^a/A_t^b y ordenada en el origen cero. La principal ventaja de este modelo lineal de calibración es que no es necesario conocer la composición isotópica del compuesto natural ni del análogo marcado así como la concentración exacta del trazador siempre que sea constante en los estándares y en las muestras.

La desventaja de usar trazadores con múltiples isótopos enriquecidos (por ejemplo, varios ^{13}C en la molécula) que evitan el solapamiento espectral hace que puedan aparecer efectos isotópicos a lo largo del procedimiento, ya que la diferencia en masa entre analito y trazador pasa a ser apreciable. Para evitar esto, otras aproximaciones de tipo polinómico o hiperbólico han sido desarrolladas utilizando trazadores mínimamente marcados que presentan solapamiento espectral con el analito. Sin embargo, estos modelos no lineales no se han aplicado tan ampliamente como el ajuste lineal [22][23].

I.2.3.1.2 Procedimiento analítico general

El procedimiento analítico general consiste en construir una gráfica de calibrado. Para ello es necesario añadir una cantidad conocida y constante de trazador sobre cantidades crecientes tanto de un estándar del analito de interés de abundancia natural como sobre la muestra. Es importante conocer aproximadamente la cantidad de analito que podría haber en la muestra para añadir la cantidad de trazador óptima que genere el mínimo error en la determinación. En general, en IDMS orgánica una relación analito/trazador de uno se suele considerar óptima. La Figura 3 muestra el procedimiento general seguido para la cuantificación de un compuesto orgánico mediante IDMS cuando no existe solapamiento espectral entre el analito y el trazador, y los efectos isotópicos no están presentes.

Un requisito fundamental en procedimientos de ID es que se alcance el equilibrio isotópico entre el analito y el trazador para que la relación isotópica entre ambos sea constante a lo largo de todo el procedimiento, y no se produzcan desviaciones en la relación isotópica medida.

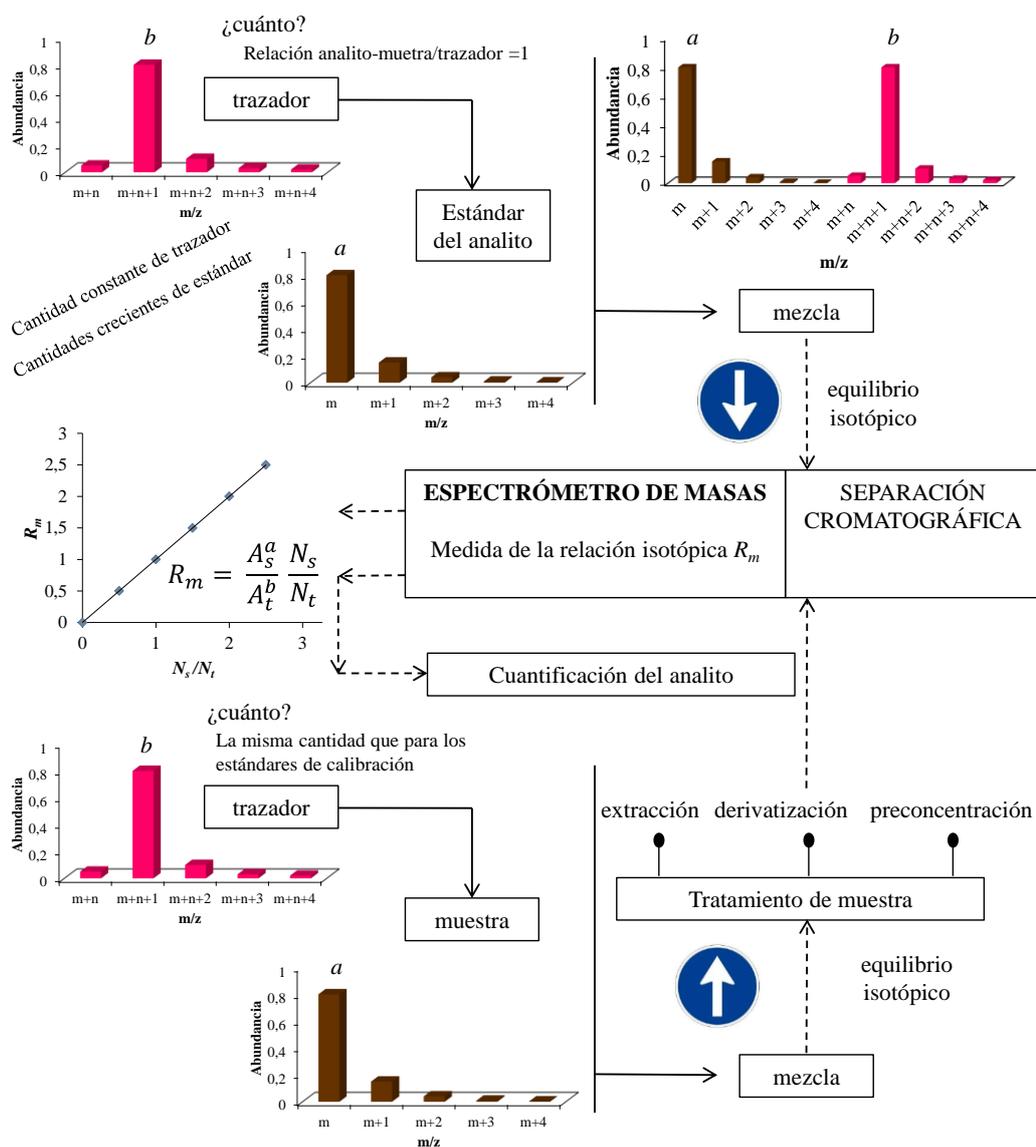


Figura 3. Procedimiento general para la cuantificación de compuestos orgánicos mediante IDMS orgánica para una muestra de composición isotópica natural y un trazador con n isótopos marcados, donde a y b representan los isótopos de interés para la medida de la relación isotópica.

La IDMS orgánica emplea técnicas híbridas en las que una técnica cromatográfica se acopla a una técnica de detección por Espectrometría de Masas con el objetivo de separar el analito del resto de los compuestos orgánicos presentes en la muestra y evitar así posibles interferencias espectrales. Las señales obtenidas a partir de una separación cromatográfica se denominan transitorias y la medida de la relación isotópica en este tipo de señales se realiza a través de la relación de las áreas de pico a las masas seleccionadas para el compuesto natural y el análogo marcado. Representando la relación isotópica medida R_m frente a la fracción molar N_s/N_t se obtiene una recta de pendiente A_s^a/A_t^b y ordenada en el origen cero.

I.2.3.1.3 Instrumentación

Los instrumentos GC-MS y LC-MS son los más habituales en la IDMS orgánica empleando como fuentes de ionización la ionización electrónica (EI) y el electrospray (ESI) respectivamente, y como analizadores el cuadrupolo (Q) y el triple cuadrupolo (QqQ).

Los trazadores que se usan son compuestos análogos al analito pero enriquecidos en ^{13}C , ^2H , ^{15}N u ^{18}O y muestran por lo general el mismo tiempo de retención. Sin embargo, dependiendo del número de átomos enriquecidos con los que se marque la molécula pueden producirse efectos isotópicos que originan la elución a tiempos ligeramente distintos [24]. En estos casos, cambios en la sensibilidad instrumental no podrán ser corregidos provocando un error en la determinación. Este efecto es más pronunciado en la fuente de electrospray que en la fuente de ionización electrónica. La fuente de electrospray, empleada en LC, se ve más afectada por las sustancias presentes en la matriz, las cuales pueden provocar la supresión de la ionización y por lo tanto una disminución específica de la señal. También, los gradientes empleados en cromatografía líquida, tanto de sales como de modificadores orgánicos, afectan a la eficacia del electrospray.

I.2.3.1.4 Aplicaciones IDMS en análisis orgánico

La IDMS orgánica comenzó a cobrar protagonismo en el escenario de la química analítica a partir de los años 70. Debido a la complejidad de la matriz en la que se encuentran inmersas la mayoría de las moléculas orgánicas resultó imprescindible el uso de esta técnica para alcanzar la exactitud y precisión requeridas en el

análisis. En los últimos años se han publicado trabajos en análisis medioambiental [25], toxicológico y clínico [26], y en estudios metabólicos de biomarcadores y biomoléculas [27].

En la actualidad, uno de los principales retos de las ciencias analíticas y bioanalíticas es el análisis cuantitativo de proteínas o proteómica cuantitativa [28] [29]. Esta información es de crucial importancia para el diagnóstico de enfermedades, terapias o el desarrollo de fármacos [30]. En los últimos años se han logrado desarrollar diferentes procedimientos basados en IDMS orgánica empleando aminoácidos, péptidos o proteínas marcados para la determinación exacta de la concentración de las proteínas existentes en diferentes sistemas biológicos [31] [32].

Cabe destacar que en 1975 el NIST (National Institute of Standards and Technology) comenzó a certificar materiales de referencia de interés clínico (glucosa y colesterol) mediante IDMS [33] y hoy en día es la técnica que se emplea para la certificación de materiales de referencia.

I.2.3.2 IDMS Inorgánica.

El fundamento de la Dilución Isotópica en análisis inorgánico para un elemento biisotópico (a y b) consiste en la mezcla del elemento de abundancia natural, donde el isótopo a es el isótopo de mayor abundancia, con el trazador que está altamente enriquecido en el isótopo b , isótopo de menor abundancia en el elemento de abundancia natural. La composición isotópica de la mezcla será intermedia entre la del elemento de abundancia natural y la del trazador y dependerá de la cantidad inicial añadida de muestra y de trazador.

I.2.3.2.1 Ecuaciones de la Dilución Isotópica inorgánica

Dilución isotópica simple

Las primeras ecuaciones para el análisis por Dilución Isotópica inorgánica fueron descritas por R.T. Jamieson y H. Hintenberger en 1956. Propusieron dos alternativas de cálculo, basadas en abundancias y relaciones isotópicas, para obtener directamente y de forma absoluta la concentración de un elemento natural en una muestra dada [21].

La ecuación [8] es la forma más básica de la ecuación de la Dilución Isotópica inorgánica y se obtiene a partir de la realización de operaciones básicas desde la ecuación [5]. Conociendo el número de átomos o moles añadidos en el trazador, N_t , y la composición isotópica de la muestra y el trazador, donde A_s^a y A_s^b son las abundancias para los isótopos a y b del elemento de abundancia natural en la muestra y, A_t^a y A_t^b son las abundancias para los mismos isótopos en el trazador, se puede calcular fácilmente el número de átomos o moles en la muestra, N_s , sólo con la medida de la relación isotópica en el mezcla, R_m .

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad [8]$$

Si se define R_s y R_t como la relación isotópica b/a y a/b para la muestra y el trazador respectivamente, el número de átomos o moles del elemento natural en la muestra viene dado por:

$$N_s = N_t \frac{A_t^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right) \quad [9]$$

Esta ecuación se puede transformar a unidades de concentración (masas de analito/masa total) teniendo en cuenta las masas tomadas de muestra y trazador, m_s y m_t , y los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador, M_s y M_t , respectivamente. Por sustitución, la ecuación final de Dilución Isotópica inorgánica obtenida es:

$$C_s = C_t \frac{m_t M_s A_t^b}{m_s M_t A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right) \quad [10]$$

Todos los parámetros de esta ecuación son conocidos a excepción de la relación isotópica, R_m . Por lo tanto, la concentración inicial del elemento en la muestra, C_s , se determina con la simple medida de R_m por Espectrometría de Masas. Si el analito muestra una composición isotópica natural, los valores de M_s , A_s^a y R_s , se obtienen directamente de las tablas de pesos atómicos y composición isotópica de la IUPAC con sus incertidumbres asociadas. Cuando el trazador altamente enriquecido está certificado en composición isotópica y concentración, los valores de C_t , M_t , A_t^b y R_t , con su incertidumbre asociada también serán conocidos. De

acuerdo con esto, sólo el valor de R_m tendrá que ser determinado experimentalmente ya que los pesos de la muestra y el trazador son medidos al comienzo del procedimiento IDMS.

Como se puede observar, en la ecuación [10] no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Posibles factores como la deriva de la señal o efectos de matriz no influirán en el resultado final, evitando de esta manera la construcción de gráficas de calibración para la cuantificación del analito en la muestra.

Dilución Isotópica doble

En el caso de disponer de un trazador no certificado, se requiere llevar a cabo la certificación tanto de su composición isotópica como de su concentración. La composición isotópica se determina fácilmente con una medida directa por MS, sin embargo la determinación de la concentración supone un experimento más complejo denominado dilución isotópica inversa. La IDMS inversa emplea las mismas ecuaciones que la IDMS simple, pero en este caso se calcula la concentración del trazador a partir de un estándar de abundancia natural de concentración y composición isotópica conocida. Dicho requisito se puede evitar utilizando experimentos de Dilución Isotópica doble. Para ello, el mismo trazador se mezcla por separado con la muestra y con el estándar certificado de abundancia natural y se asume que el analito en la muestra tiene una composición isotópica igual a las del estándar (abundancias naturales). Combinando las ecuaciones de la Dilución Isotópica simple e inversa se eliminan algunos parámetros de la ecuación y se obtiene la ecuación final:

$$C_s = C_n \frac{m_n m_{t1}}{m_s m_{t2}} \left(\frac{1 - R_{m2} R_s}{1 - R_{m1} R_s} \right) \left(\frac{R_{m1} - R_t}{R_{m2} - R_t} \right) \quad [11]$$

R_{m1} y R_{m2} son las relaciones isotópicas medidas en la muestra y el estándar, respectivamente. La concentración del analito en la muestra se puede referir directamente al estándar de abundancia natural. No existe ningún término en la ecuación que haga referencia a la concentración del trazador y por tanto el factor de incertidumbre asociado se elimina, haciendo de la Dilución Isotópica doble un procedimiento que proporciona en general menores incertidumbres que cuando se

emplea dilución isotópica inversa. La principal desventaja es el hecho de ser más laboriosa y por tanto menos aplicable al análisis de rutina. Normalmente, este procedimiento sólo se utiliza para la certificación de materiales de referencia.

I.2.3.2.2 Procedimiento analítico general

El procedimiento analítico dependerá de si el analito en la muestra tiene una composición isotópica natural y de si el trazador utilizado está certificado en composición isotópica y concentración. En la Figura 4 está representado el procedimiento general considerando una composición isotópica natural para el analito y empleando un trazador de composición isotópica y concentración conocidas.

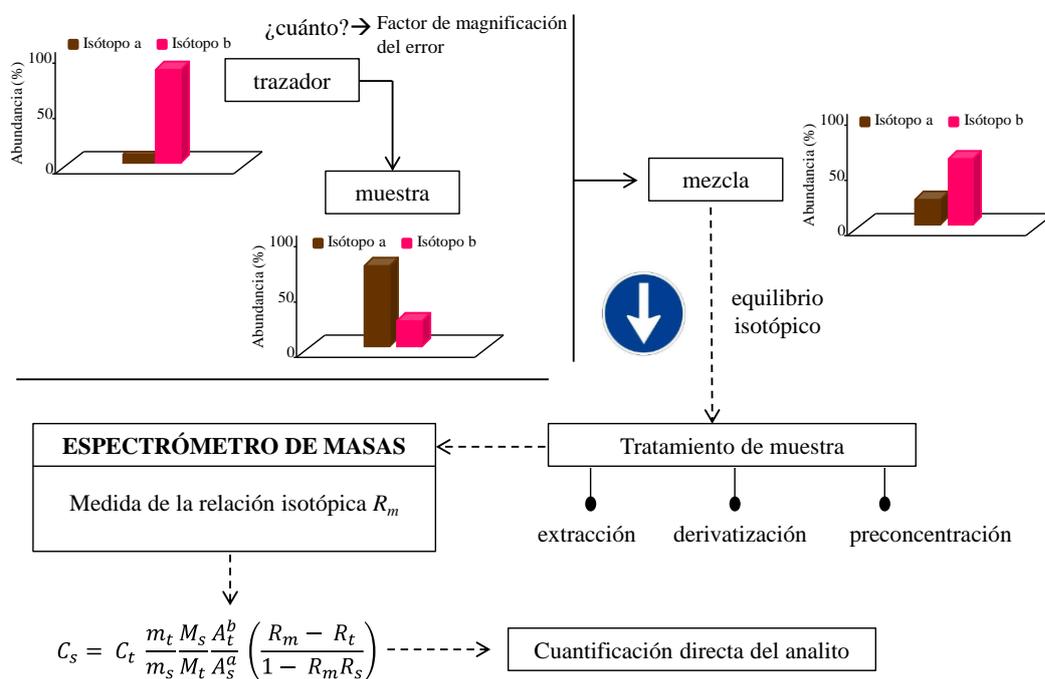


Figura 4. Procedimiento general para una muestra de composición isotópica natural y un trazador certificado mediante IDMS inorgánica para un elemento biisotópico (a y b).

Una cantidad conocida de trazador enriquecido isotópicamente se adiciona a la muestra en disolución. Es importante tener una estimación de la cantidad de

analito que puede haber en la muestra para añadir la cantidad de trazador óptima que genere el mínimo error en la determinación. Esta cantidad se puede calcular de forma teórica a través del factor de magnificación del error [34]. Tras la mezcla, es importante que se produzca una perfecta homogeneización entre el analito y el trazador hasta alcanzar el equilibrio isotópico completo. De esta manera, se podrán corregir posibles pérdidas de la muestra o recuperaciones incompletas durante el procedimiento analítico sin que se vea afectada la exactitud en el resultado final.

Una vez separada una alícuota de la muestra adicionada se mide la relación isotópica de los iones seleccionados a y b por Espectrometría de Masas. Es necesario comprobar la exactitud de la relación isotópica medida utilizando un material de referencia isotópico adecuado. A partir de la relación isotópica medida se puede determinar con exactitud la cantidad de analito en la muestra.

I.2.3.2.3 Instrumentación

La IDMS inorgánica, al igual que la orgánica, hace uso de diferentes tipos de fuentes de ionización y de analizadores de masas dependiendo del tipo de información que se requiera.

La introducción de la fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS) a finales de los años 80 supuso un gran avance en la determinación exacta y precisa de trazas y ultratrazas metálicas empleando el análisis por Dilución Isotópica. Esta fuente de ionización es sencilla, versátil, multielemental, altamente sensible para la mayoría de los elementos de la tabla periódica, permite el acoplamiento de técnicas cromatográficas, y no necesita una gran preparación de muestra. Por ello, el ICP es la fuente de ionización elemental más utilizada en el análisis por Dilución Isotópica inorgánica. El analizador de masas tipo cuadrupolo ha sido el más utilizado en ICP-MS. Ofrece una resolución de una unidad de masa, tiene buena sensibilidad y realiza barridos rápidos. Sin embargo, otros analizadores como el analizador de doble enfoque con sector magnético o instrumentos multicolector también han sido empleados en IDMS inorgánica por su resolución ajustable, la eliminación de interferencias poliatómicas y su mayor precisión en la medida.

Fuentes de ionización moleculares como la ionización electrónica y el electrospray acopladas a técnicas cromatográficas también han sido empleadas en el análisis de Dilución Isotópica inorgánica.

I.2.3.2.4 Aplicaciones IDMS en análisis inorgánico

Existen diferentes campos de aplicación de la dilución isotópica elemental por ICP-MS, pero quizás el más ampliamente estudiado inicialmente, por el carácter multielemental que presenta esta fuente de ionización, haya sido la determinación multielemental de trazas metálicas en diferentes matrices.

Por otro lado y debido a la alta calidad metrológica de los resultados, un importante campo de aplicación de la IDMS en análisis elemental es la preparación de materiales de referencia certificados [35] [36] [37]. Cabe resaltar que en la mayoría de las nuevas aplicaciones para la certificación de materiales de referencia se emplea una simplificación de la dilución isotópica doble denominada método del ajuste exacto [38]. Este método se basa en el ajuste iterativo de la cantidad de muestra y estándar de abundancia natural utilizados en IDMS doble (ecuación [11]), hasta que la relación isotópica medida en la muestra y en el estándar de abundancia natural adicionados con el trazador sea la misma ($R_{m1} = R_{m2}$). De este modo, no es necesario conocer ni la concentración ni la composición isotópica del trazador, obteniendo resultados de altísima precisión y exactitud. Obviamente, este método no está recomendado para análisis de rutina pero es el mejor para la certificación de materiales de referencia [39] [40].

La especiación elemental y más recientemente la proteómica cuantitativa han hecho uso del análisis por Dilución Isotópica con ICP-MS para la cuantificación de moléculas orgánicas de manera exacta y precisa. La especiación elemental se basa en la cuantificación de las diferentes especies en las que se puede encontrar un mismo elemento en una determinada muestra. En este caso, la especie a determinar es una molécula orgánica que contiene en su estructura un elemento detectable por ICP-MS. El trazador será por tanto un análogo de la molécula orgánica marcada en el elemento detectable. Para llevar a cabo estudios de especiación es necesario separar las diferentes especies en las que se encuentra el elemento y por tanto, el acoplamiento de una técnica de separación, normalmente cromatográfica, al ICP-MS [34] [41]. Es importante, en análisis de especiación, la

estabilidad de las diferentes especies químicas durante el tratamiento de la muestra y la posibilidad de interconversión entre las especies. En estos casos, se han desarrollado procedimientos de doble y triple trazador que corrigen la degradación de las especies y su interconversión [42][43] [44]. Por otro lado, uno de los campos de mayor interés analítico en la actualidad en donde la dilución isotópica con ICP-MS está demostrando un gran potencial es en la proteómica cuantitativa.[45]. Al igual que en análisis de especiación, la molécula orgánica a determinar, en este caso la proteína, deberá tener en su estructura un elemento detectable por ICP-MS. El trazador será por tanto un análogo de la proteína, péptido o aminoácido marcado en el elemento detectable, que normalmente será azufre por estar presente en los aminoácidos Cisteína y Metionina.

Como consecuencia del desarrollo de las aplicaciones en el análisis de especiación empleando una técnica de separación en línea con el ICP-MS y de la aparición de numerosas especies de las que no se disponía de patrones o incluso no se conocía su identidad, surge un nuevo modo de dilución isotópica. Este nuevo modo de dilución isotópica se basa en el empleo de un único trazador enriquecido que se mezcla en continuo con la muestra tras una separación cromatográfica y que se conoce como *Dilución Isotópica en Línea*. Esta nueva modalidad ofrece nuevas ventajas al Análisis por Dilución Isotópica, que se podrán aplicar en situaciones concretas y que discutiremos a continuación.

I.3 DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA

Para poder llevar a cabo el análisis por Dilución Isotópica convencional es necesario adquirir o sintetizar el elemento o compuesto enriquecido isotópicamente, específico para cada analito. En ocasiones, los trazadores enriquecidos no se encuentran disponibles comercialmente y la síntesis en el laboratorio resulta tediosa. En estos casos, será imposible realizar la cuantificación del analito mediante análisis por Dilución Isotópica.

Algunos sistemas de detección elemental ofrecen una sensibilidad, para un elemento dado, independiente de la forma química en la que se encuentre. Esto permite emplear un único patrón genérico que contenga el elemento de interés para cuantificar las diferentes especies en las que ese elemento esté presente en la muestra. El ICP, cuando se opera en condiciones determinadas, es una de las

fuentes de ionización que ofrece una respuesta independiente de la forma química del elemento y por ello se han desarrollado aplicaciones basadas en esta capacidad [46] [47]. La mejor elección para ese patrón genérico sería, sin duda, un patrón enriquecido isotópicamente y adicionado de manera constante y continua, ya que de esta manera los posibles efectos de deriva instrumental o efectos de matriz durante la ionización serían corregidos.

I.3.1 Concepto de la Dilución Isotópica en línea

El concepto del análisis por Dilución Isotópica en línea fue descrito por primera vez por Lásztity y col. en 1989 para análisis elemental total [48], pero no fue hasta 1994 cuando Heumann y Rotmann describieron los principios de la Dilución Isotópica en línea para el análisis de especiación de elementos traza [49]. Los autores realizaron una clasificación de la Dilución Isotópica en especiación en función de la especie química en la que se añadía el trazador a la muestra. Definen la Dilución Isotópica elemental, empleada hasta ese momento, como Dilución Isotópica específica (*species-specific isotope dilution*) ya que el trazador es la propia especie a determinar pero enriquecida en uno de los elementos que la conforman. Por otro lado, se refieren a la Dilución Isotópica en línea como Dilución Isotópica inespecífica (*species-unspecific isotope dilution*), la cual emplea un trazador genérico que contiene el elemento que se quiere cuantificar. Como ya se ha comentado, este nuevo modo de Dilución Isotópica nació gracias a la capacidad que posee el ICP-MS de generar una respuesta para un determinado elemento independientemente de la forma química en la que se encuentre. Es aconsejable, antes de aplicar esta metodología, comprobar la respuesta independiente del compuesto con estándares analíticos adecuados [50]. Una vez que esta respuesta independiente está asegurada, la forma química del trazador no afectará a los resultados finales.

La Dilución Isotópica en línea se basa en la mezcla en continuo de la muestra original, que contiene el analito de interés de abundancia isotópica natural, con el trazador, que contiene el mismo elemento pero enriquecido isotópicamente, en un sistema de flujo. La relación isotópica de la mezcla se mide de manera continua en el espectrómetro de masas. El equilibrio isotópico tiene lugar en la fuente de ionización, donde se produce la completa homogeneización entre el elemento natural y el enriquecido. El flujo de trazador se mantiene constante durante todo el

experimento mientras que el flujo de analito en la muestra puede ser constante o variable. Un flujo variable de analito se obtiene habitualmente mediante un sistema de inyección en flujo (FIA) o mediante un sistema cromatográfico y será característico en análisis de especiación elemental.

I.3.2 Ecuaciones de la Dilución Isotópica en línea

Una muestra que contiene una concentración molar del elemento a determinar C_s (mol/kg), eluye de un sistema de inyección en flujo o cromatográfico a un determinado flujo F_s (g/min) y se mezcla en continuo con la disolución de trazador. La disolución de trazador contiene una concentración molar del mismo elemento enriquecido C_t (mol/g) que se adiciona a la muestra a un determinado flujo F_t (g/min). El flujo molar total para el elemento en la mezcla M_m (mol/min) vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$M_m = C_s F_s + C_t F_t = M_s + M_t \quad [12]$$

El flujo molar del elemento en el trazador se mantiene constante en el tiempo, mientras que el flujo molar del elemento natural en la muestra normalmente varía con el tiempo. Por lo tanto, el flujo molar de la mezcla M_m también variará en función del tiempo. Para un elemento con dos isótopos a y b se puede establecer un balance de masas para cada uno de los dos isótopos medidos por Espectrometría de Masas. El flujo molar para cada isótopo se puede expresar como:

$$M_m A_m^a = M_s A_s^a + M_t A_t^a \quad [13] \quad M_m A_m^b = M_s A_s^b + M_t A_t^b \quad [14]$$

En donde A_s^a y A_s^b , A_t^a y A_t^b y A_m^a y A_m^b son las abundancias isotópicas de los isótopos a y b en la muestra, trazador y mezcla, respectivamente. Dividiendo estas dos ecuaciones se obtiene:

$$R_m = \frac{M_s A_s^a + M_t A_t^a}{M_s A_s^b + M_t A_t^b} \quad [15]$$

R_m (A_m^a/A_m^b) es la relación de las abundancias isotópicas en la mezcla. Esta relación variará con el tiempo siempre y cuando el flujo molar de la muestra M_s

también lo haga. Despejando M_s de la ecuación anterior y sustituyendo M_t por $C_t F_t$, se obtiene la ecuación básica para la Dilución Isotópica en línea:

$$M_s = C_t F_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad [16]$$

En esta ecuación la composición isotópica del elemento de abundancia natural y del trazador son conocidas. De manera que conociendo la concentración y el flujo del trazador y midiendo R_m en función del tiempo por Espectrometría de Masas, se puede calcular el flujo molar del elemento de abundancia natural en la muestra.

I.3.3 Cromatograma de flujo molar

Generalmente, la Dilución Isotópica en línea utiliza señales transitorias obtenidas tras el análisis por inyección en flujo o tras una separación cromatográfica. En la Figura 5 está desarrollado el procedimiento general empleado para la cuantificación de un elemento en cada una de las formas químicas en las que se encuentra en una determinada muestra, mediante IDMS en línea.

A partir del cromatograma de intensidades obtenido para los isótopos a y b del elemento a determinar, se calcula la relación de intensidades R_m punto a punto a lo largo del tiempo de adquisición del cromatograma completo. Para ello será necesario disponer de los datos de intensidades para los isótopos a y b respecto al tiempo y dividir el valor de intensidad obtenido para el isótopo a entre el correspondiente valor para el isótopo b . En la Figura 5 también se puede observar la hoja de cálculo modelo para la obtención de los datos cuantitativos.

Una vez obtenida la relación isotópica del elemento en la mezcla para cada punto, se introducen los valores de R_m en la ecuación básica de la Dilución Isotópica en línea. De esta manera se obtiene el valor del flujo molar del elemento (M_s) en la muestra para cada punto. Representando M_s frente al tiempo se obtiene el denominado cromatograma de flujo molar, donde el eje de abscisas tiene unidades de flujo molar (mol/min) mientras que el eje de ordenadas tiene unidades de tiempo (min). La integración de cada pico en el cromatograma de flujo molar proporciona de manera directa la cantidad de elemento natural m_s que ha eluido en ese intervalo:

$$m_s = \int_{t_1}^{t_2} M_s(t) dt = C_t F_t \int_{t_1}^{t_2} \frac{R_m(t) A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m(t) A_s^b} dt \quad [17]$$

Conociendo la fórmula molecular de cada especie en la que está presente el elemento se puede calcular fácilmente la cantidad de compuesto que eluye en cada uno de los picos cromatográficos.

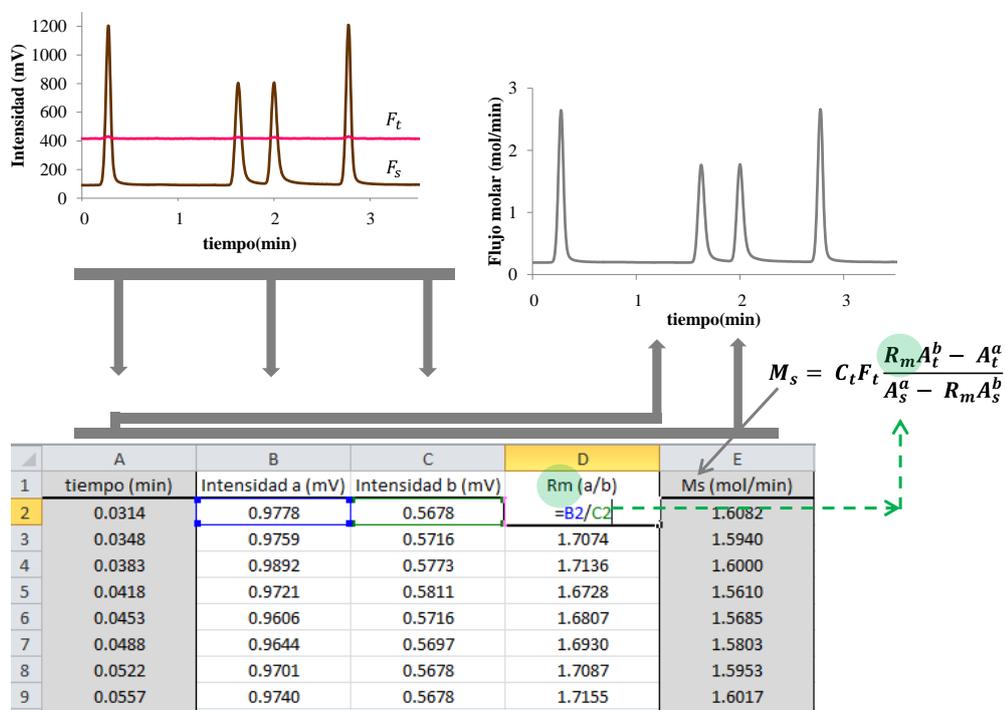


Figura 5. Procedimiento empleado para la obtención del cromatograma de flujo molar a partir del cromatograma de intensidades y la aplicación de la ecuación de la Dilución Isotópica en línea.

I.3.4 Calibración del flujo molar de trazador

Para poder llevar a cabo experimentos de IDMS en línea es necesario conocer el flujo molar del trazador. La exactitud de la determinación de dicho flujo es un requisito fundamental para poder obtener con exactitud la cantidad de analito que eluye con el tiempo.

Normalmente, cuando el trazador está en disolución acuosa se suele adicionar a través de una bomba peristáltica o de jeringa. De esta manera, el flujo de trazador F_t se puede determinar gravimétrica o volumétricamente de manera sencilla. Si además el trazador está certificado en concentración es posible la calibración del flujo molar del trazador de manera exacta y precisa ($M_t = C_t F_t$).

Alternativamente, cuando la concentración o el flujo de trazador no se pueden medir adecuadamente, se puede realizar la calibración directa del flujo molar del trazador usando una estrategia similar a la empleada en determinaciones de Dilución Isotópica doble. En este caso, no se requiere el conocimiento del flujo de trazador ya que se mide un estándar de abundancia natural entre las muestras. Para obtener la ecuación de la Dilución Isotópica doble en línea se toma como punto de partida la ecuación [16]. Multiplicando y dividiendo esta ecuación por la abundancia isotópica del isótopo b en el trazador (A_t^b) y la abundancia isotópica del isótopo a en la muestra (A_s^a), la ecuación [16] se transforma en:

$$M_s = C_t F_t \frac{A_t^b}{A_s^a} x \left(\frac{R_{m1} - R_t}{1 - R_{m1} R_s} \right) \quad [18]$$

Donde R_{m1} es la relación isotópica medida en la mezcla para una muestra desconocida, R_s es la relación b/a de abundancia isotópica natural en la muestra (A_s^b/A_s^a) y R_t se refiere a la relación a/b de la abundancia isotópica en el trazador (A_t^a/A_t^b). Cuando se lleva a cabo un experimento de IDMS en línea inversa utilizando un estándar de abundancia natural, la ecuación anterior se puede expresar como:

$$M_n = C_t F_t \frac{A_t^b}{A_n^a} x \left(\frac{R_{m2} - R_t}{1 - R_{m2} R_s} \right) \quad [19]$$

El subíndice n indica el estándar de abundancia natural y R_{m2} la relación isotópica . experimento de IDMS en línea inversa. La composición isotópica de la muestra es normalmente idéntica a la del estándar de abundancia natural por lo que $R_s = R_n$ y $A_s^a = A_n^a$. Dividiendo ambas ecuaciones y eliminando los términos iguales, se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{M_s}{M_n} = \left(\frac{1 - R_{m2}R_s}{1 - R_{m1}R_s} \right) \times \left(\frac{R_{m1} - R_t}{R_{m2} - R_t} \right) \quad [20]$$

El flujo para el estándar será el mismo que para la muestra de manera que la ecuación anterior se puede transformar en:

$$C_s = C_n \times \left(\frac{1 - R_{m2}R_s}{1 - R_{m1}R_s} \right) \times \left(\frac{R_{m1} - R_t}{R_{m2} - R_t} \right) \quad [21]$$

En este caso, no existe ningún término en la ecuación que haga referencia a la concentración y flujo del trazador. La concentración del analito se puede referir directamente a la concentración del estándar de abundancia natural utilizado para la calibración del trazador (normalmente certificado), tras la medida de las dos relaciones isotópicas R_{m1} y R_{m2} .

El cálculo exacto del flujo molar del trazador es mucho más complejo cuando se emplea un trazador en fase gas. La inyección de un estándar de abundancia natural de concentración conocida es una alternativa para calibrar el flujo de trazador pero la variabilidad en el volumen de inyección, típica en cromatografía de gases, hace que sea una alternativa poco exacta. La mejor solución para la calibración del flujo molar del trazador en cromatografía de gases consiste en la adición de una cantidad exacta de un patrón interno de concentración conocida a las muestras. Este patrón interno no debe coeluir con ninguna de las especies a determinar. Este método fue desarrollado por Heilmann y Heumann en 2008 para la calibración exacta del flujo molar del trazador en GC [51].

Del mismo modo que para m_s , se puede definir una ecuación análoga a la ecuación [17] que permita calcular la cantidad de patrón interno m_{IS} que eluye de la columna cromatográfica:

$$m_{IS} = \int_{t_1}^{t_2} M_{IS}(t) dt = C_t F_t \int_{t_1}^{t_2} \frac{R_m(t)A_t^b - A_t^a}{A_{IS}^a - R_m(t)A_{IS}^b} dt \quad [22]$$

Teniendo en cuenta que la integración entre t_1 y t_2 en el cromatograma de flujo molar da lugar al área de pico de la especie a determinar, dividiendo ambas ecuaciones se obtiene la siguiente relación:

$$m_s = m_{IS} \frac{Area_s}{Area_{IS}} \quad [23]$$

Donde $Area_s$ y $Area_{IS}$ son las áreas de los picos correspondientes a la especie elemental a determinar y al patrón interno, respectivamente. A partir de esta ecuación es posible conocer la cantidad de analito presente en la muestra simplemente a partir del cálculo de las áreas del patrón interno y de la especie de interés y, de la cantidad de patrón interno añadido a la muestra, asumiendo un flujo molar arbitrario para el trazador. Esta estrategia simplifica el análisis por Dilución Isotópica en línea y ofrece una serie de ventajas que mejoran la exactitud de los resultados respecto a otras estrategias de calibración. La principal ventaja es que elimina la mayor fuente de incertidumbre del análisis, la cual se encuentra en la determinación del flujo másico del trazador [52]. Además, corrige las pequeñas variaciones en el volumen inyectado. En el caso de la cromatografía líquida o el análisis por inyección en flujo no será necesario conocer con exactitud el volumen del bucle de inyección cuando se utiliza esta estrategia de calibración.

Para poder hacer uso de la ecuación [23] es necesario que no existan efectos de discriminación entre el patrón interno y los compuestos presentes en la muestra objeto de análisis. Por ejemplo, la etapa de inyección en cromatografía de gases puede dar lugar a efectos de discriminación entre los diferentes compuestos debido al diferente comportamiento que presentan algunos compuestos a las altas temperaturas del inyector. Será necesario por tanto tener un control exhaustivo de todas aquellas etapas que puedan dar lugar a efectos de discriminación entre el patrón interno elegido y los compuestos a determinar. Evidentemente, las abundancias isotópicas deben ser idénticas en el analito presente en la muestra y en el patrón interno.

I.3.5 Instrumentación

Existen diferentes configuraciones para la aplicación del análisis por Dilución Isotópica en línea. Algunas de ellas son sencillas y se pueden implementar en análisis de rutina mientras que otras presentan un diseño más complejo.

En el caso de determinación de la cantidad total de un elemento en una muestra, la configuración más sencilla es la que se muestra en la Figura 6a. Muestra y trazador se bombean continuamente con la ayuda de una sola bomba peristáltica,

mezclándose en una pieza en T antes de la entrada al nebulizador del ICP. En este caso los flujos de muestra y trazador son ambos constantes durante la medida por lo que las relaciones isotópicas medidas también son constantes con el tiempo. Una segunda posibilidad es la inyección de la muestra mediante un sistema de inyección en flujo. Como se puede observar en la Figura 6b, la muestra se inyecta utilizando una válvula de seis vías con un bucle de inyección para introducir un determinado volumen de muestra antes de la mezcla con el trazador. En este caso, se obtienen señales transitorias por lo que las relaciones isotópicas cambian con el tiempo como en el caso de una separación cromatográfica.

En el caso de querer llevar a cabo un análisis de especiación cuantitativo, la IDMS en línea ha de aplicarse a la salida de un sistema cromatográfico. La Figura 6c muestra un esquema de esta configuración para cromatografía líquida donde el flujo de trazador se añade después de la separación cromatográfica. Es por ello que a este modo de dilución isotópica se le conoce también como ***Dilución Isotópica post-columna***. Tras la separación de las especies de interés por HPLC se añade el trazador de manera continua generalmente a través de una bomba peristáltica. La mezcla de ambos flujos tiene lugar en una pieza en T y dicha mezcla se transporta hacia el espectrómetro de masas para la correspondiente medida de la relación isotópica de interés.

Un uso menos común de la Dilución Isotópica post-columna es en combinación con la cromatografía de gases. En la Figura 6d se muestra un esquema de la configuración más apropiada para la aplicación de la Dilución Isotópica post-columna mediante GC-ICP-MS. Una vez separadas las especies por GC se añade el trazador de manera continua a través de la interfase que comunica el GC con el ICP-MS. El flujo de trazador se regula a través de un controlador de flujo másico, que asegura un flujo constante del mismo. Esta configuración es la misma que la utilizada en los equipos GC-ICP-MS comerciales con la diferencia de que ahora el gas de arrastre está dopado con la especie utilizada como trazador para la aplicación de la Dilución Isotópica post-columna. Otra posibilidad para generar un flujo de trazador constante es a través de un tubo de permeación. Sin embargo, esta técnica es extremadamente sensible a variaciones de temperatura y no es muy flexible respecto a la velocidad de sustancia generada.

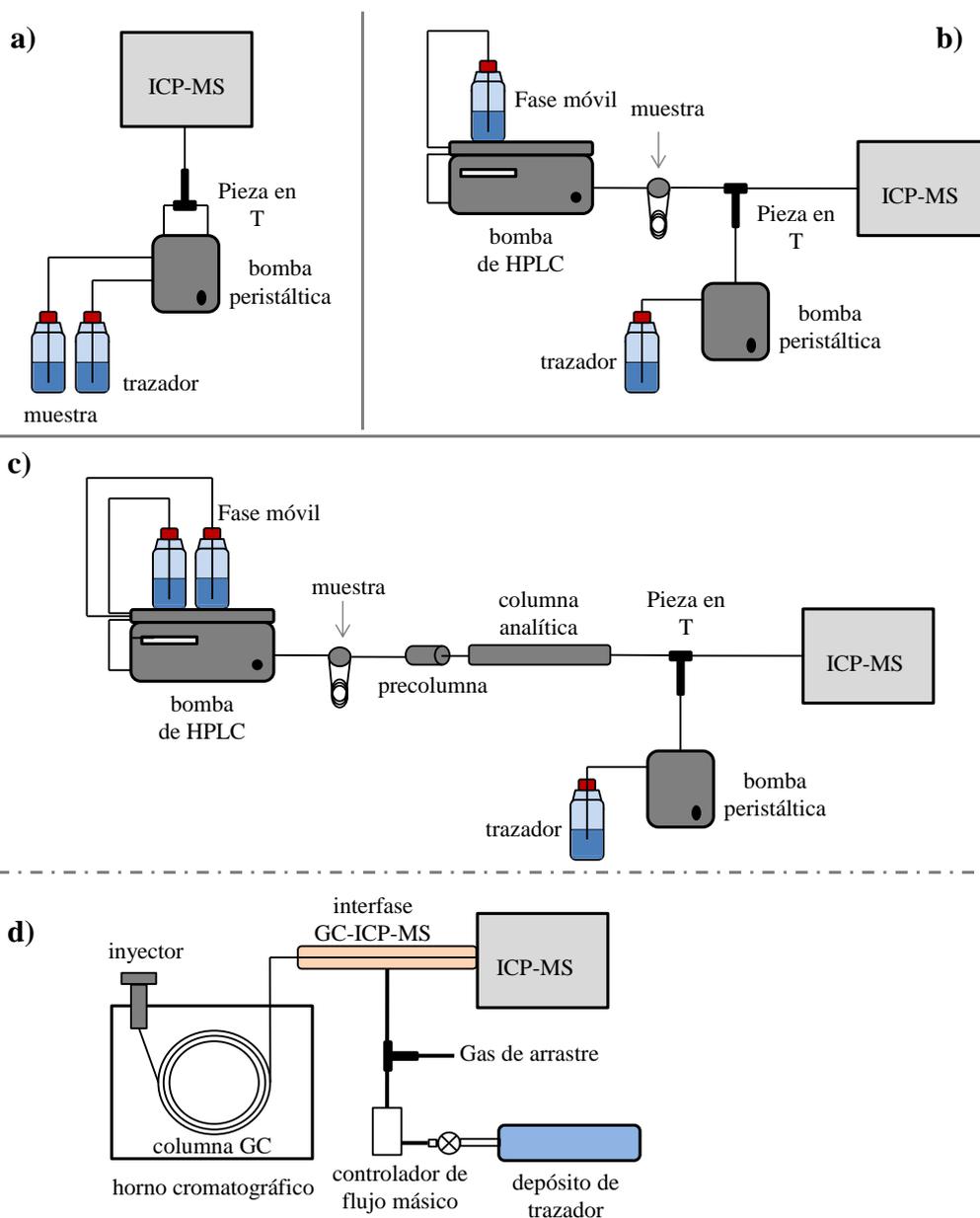


Figura 6. Posibles configuraciones para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea: a) en continuo, b) por inyección en flujo, c) en un sistema cromatográfico HPLC, y d) en un sistema cromatográfico GC.

I.3.6 Ventajas y limitaciones de la Dilución Isotópica en línea

El análisis por Dilución Isotópica en línea presenta una serie de ventajas frente a la Dilución Isotópica convencional que ha permitido su implantación en numerosas aplicaciones. La principal ventaja del análisis por Dilución Isotópica en línea es la posibilidad de cuantificar diferentes especies del mismo elemento sin la necesidad de patrones específicos para cada uno de ellos. Por lo tanto, es útil en la determinación de moléculas para las que no se dispone de estándares analíticos de abundancia natural o isotópicamente marcados, o incluso si no se conoce su identidad.

En segundo lugar, este procedimiento es capaz de proporcionar información cuantitativa, en tiempo real, de la cantidad de un determinado elemento que eluye del sistema cromatográfico. Esto se debe a que las unidades del área bajo el pico en el cromatograma de flujo molar se pueden expresar como moles del elemento. Es por ello que puede considerarse como un detector cuantitativo genérico para separaciones cromatográficas. Cualquier posible fuente de inestabilidad en la señal, por una deriva instrumental o efectos de matriz, es corregido, incluso cuando se llevan a cabo separaciones en gradiente.

Por último, dado que proporciona la cantidad absoluta del elemento eluido, es una herramienta excelente para hacer estudios de recuperación en las diferentes etapas de la preparación de la muestra, como la extracción o pre-concentración e incluso evaluar la recuperación cromatográfica.

A pesar de las ventajas que presenta, tiene una clara limitación respecto a la Dilución Isotópica convencional. La pérdida de sustancia o las recuperaciones incompletas del compuesto durante la etapa de preparación de la muestra en procesos de preconcentración, dilución, derivatización, o degradación de las especies antes del equilibrio isotópico no serán corregidas. Podrán ser evaluadas cuando se emplean patrones como se ha comentado arriba, pero no se podrán corregir. Como consecuencia, el análisis por dilución isotópica en línea no será directamente trazable al Sistema Internacional de Unidades. Por ello, las aplicaciones IDMS en línea se están desarrollando sólo cuando se puede realizar un análisis directo de la muestra o se emplean procedimientos de corrección de recuperación adecuados. Además, para una validación adecuada de los resultados

es necesario que los analitos tengan una recuperación cuantitativa de la columna cromatográfica. Para ello se realizan estudios de comparación entre el área calculada para todo el cromatograma mediante IDMS en línea y la obtenida mediante análisis total, sin el uso de la columna cromatográfica en otra alícuota de la muestra.

I.3.7 Aplicaciones de la Dilución Isotópica en línea

Las primeras aplicaciones de la IDMS en línea se desarrollaron para la determinación de elementos traza mediante el análisis por inyección en flujo utilizando diferentes configuraciones [53] [54]. Además, debido al carácter multielemental que presenta el ICP-MS y la posibilidad de automatización, es posible llevar a cabo el análisis multielemental de elementos traza cuando la disolución del trazador contiene múltiples trazadores [55].

La especiación elemental para la determinación de elementos traza ha sido, sin duda alguna, el campo de aplicación donde la Dilución Isotópica en línea ha tenido su mayor expansión [56] [57] [58] [59]. Rottmann y Heumann fueron los pioneros en la aplicación de la IDMS post-columna para el estudio de las interacciones metálicas con sustancias húmicas en la materia orgánica disuelta presente en aguas de río [60]. Como consecuencia de estos estudios, desarrollaron un procedimiento para la determinación simultánea de metales pesados y carbono orgánico disuelto (DOC) [61]. La novedad de esta aplicación concreta fue la determinación de carbono mediante dilución isotópica post-columna HPLC-ICP-MS. Esta fue la primera y última vez que se aplicó esta metodología para la cuantificación de carbono mediante ICP-MS. Probablemente porque la detección de C por ICP-MS está muy impedida ya que el potencial de ionización del carbono es altamente elevado y dificulta su ionización en el plasma. Además, el ICP trabaja a presión atmosférica y presenta un elevado fondo para este elemento en particular.

Su aplicación en equipos HPLC-ICP-MS ha permitido la cuantificación directa de proteínas a partir de la cuantificación del elemento detectable por ICP-MS presente en cada proteína particular, sin la necesidad de estándares de proteína o péptido específicos, por lo que se ha considerado una alternativa interesante a las metodologías generalmente empleadas en proteómica cuantitativa [62] [63]. La

IDMS en línea también presenta un especial interés en la industria farmacéutica por el estudio cuantitativo de los metabolitos de un sintetizado activo en fase experimental. En estos casos, los estándares específicos de los metabolitos formados durante la síntesis del fármaco no estarán disponibles por lo que la cuantificación no será posible. La IDMS en línea resuelve este hándicap [64] [65].

Su aplicación también ha sido realizada, aunque en menor medida, en equipos GC-ICP-MS. La primera aplicación se realizó para la determinación de compuestos de azufre en productos derivados del petróleo [51]. La IDMS en línea permite cuantificar un gran número de compuestos sin la necesidad de patrones específicos para cada uno de ellos. Para este propósito se sintetizó dimetilsulfuro enriquecido en ^{34}S para su uso como trazador post-columna. Esta configuración GC-ICP-MS también fue aplicada en la determinación de mercurio y metilmercurio en muestras biológicas en las que se empleó un trazador de ^{200}Hg en estado gaseoso [66].

Existen algunos elementos, principales constituyentes de la materia orgánica, como el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, que el ICP-MS no es capaz de detectar de manera sensible y que por lo tanto no se pueden analizar. Tan sólo será posible la aplicación de esta metodología para la cuantificación de moléculas orgánicas cuando éstas posean algún elemento detectable por ICP-MS. Por lo tanto, existe una brecha en el análisis por Dilución Isotópica en línea para la cuantificación absoluta de compuestos puramente orgánicos. Con el objetivo de cerrar esta brecha existente entre el concepto de la IDMS en línea y el análisis de compuestos orgánicos aparece en 2009 *la Dilución Isotópica en línea de carbono*, técnica en la cual se basa la presente Tesis Doctoral y que será descrita en detalle en el siguiente apartado.

I.4 DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE CARBONO

I.4.1 Concepto de la Dilución Isotópica en línea de carbono

El análisis por Dilución Isotópica en línea de carbono con Espectrometría de Masas fue descrito por primera vez por Cueto Díaz y col. en 2009 [67] como el primer detector universal y genérico para compuestos orgánicos en cromatografía de gases. Posteriormente, los mismos autores extendieron esta nueva

aproximación a la cuantificación de compuestos orgánicos en fase líquida tras la inyección de la muestra en un sistema de inyección en flujo [68], para más tarde aplicarla a la cromatografía líquida [69] [70]. Este nuevo concepto de Dilución Isotópica permite la cuantificación exacta de cualquier compuesto orgánico sin la necesidad de patrones específicos ni gráficas de calibración, y cierra la brecha existente en el análisis por Dilución Isotópica en línea para compuestos que contienen elementos no detectables por ICP-MS.

Así como el análisis por Dilución Isotópica en línea se basa en la respuesta independiente del ICP-MS donde el equilibrio isotópico entre los compuestos de abundancia natural y el trazador tiene lugar en la fuente de ionización donde todo se atomiza, la Dilución Isotópica en línea de carbono necesita una conversión de todos los compuestos orgánicos separados por cromatografía en una sola especie antes de su entrada en el espectrómetro de masas. De esta manera, la ionización independiente del compuesto es posible sin importar cuál sea la fuente de ionización utilizada. En todas las configuraciones empleadas para la aplicación de la IDMS en línea de carbono, la especie química común en la que se transforman los compuestos orgánicos es el CO₂. La adición en línea de la misma especie enriquecida en ¹³C asegura el equilibrio isotópico requerido entre estos compuestos y el trazador de carbono enriquecido (¹³CO₂) antes de la entrada a la fuente de ionización. La fuente de ionización seleccionada fue la ionización electrónica ya que la ionización se lleva a cabo bajo alto vacío alcanzando una sensibilidad mucho más alta para el CO₂ (carbono) y una menor señal de fondo.

Reacciones de combustión y oxidación en línea, normalmente empleadas en el Análisis Independiente Específico del Compuesto con Espectrometría de Masas (CSIA-MS) convierten todos los compuestos orgánicos que eluyen del sistema cromatográfico en CO₂. La adición de trazadores de carbono-13 en combinación con reactores de combustión e interfases de oxidación será la estrategia seguida para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono.

I.4.2 Ecuaciones de la Dilución Isotópica en línea de carbono

La Dilución Isotópica en línea de carbono es una variante de la Dilución isotópica en línea y por lo tanto, las ecuaciones empleadas para la cuantificación de los analitos no difieren. Las principales diferencias respecto a la Dilución Isotópica en

línea convencional son: cuándo tiene lugar el equilibrio isotópico, cuál es el elemento detectable y el tipo de fuente de ionización empleado. Estas diferencias no afectan al procedimiento de cuantificación. Por lo tanto, la ecuación básica de la Dilución Isotópica en línea de carbono se puede expresar de la siguiente forma:

$$M_s = C_s f_s d_s = C_t f_t d_t \frac{AW_s}{AW_t} \frac{A_t^{13}}{A_s^{12}} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right) \quad [24]$$

En donde M_s se refiere al flujo másico del analito de abundancia natural (ng C/min); C_s y C_t , F_s y F_t , y d_s y d_t a la concentración (ng C/g), flujo (mL/min), y densidad (g/mL) del analito y trazador, respectivamente; AW_s y AW_t al peso atómico del carbono de abundancia natural y el marcado isotópicamente; A_s^{12} y A_t^{13} a la abundancia del ^{12}C en los analitos de abundancia natural y a la abundancia del ^{13}C en el trazador; R_s R_m a la relación $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en los analitos de abundancia natural en la muestra y en la mezcla; y R_t a la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el trazador. Cabe destacar que en procedimientos de dilución isotópica en línea de carbono la ecuación básica se expresa generalmente en función del flujo másico (gramo de carbono por unidad de tiempo) en lugar de un flujo molar (mol por unidad de tiempo) y por lo tanto, aparece en la ecuación el término de la densidad.

La estrategia para el cálculo exacto del flujo másico del trazador en cualquiera de las configuraciones estudiadas (GC, HPLC o FIA) fue la adición de una cantidad exacta de un patrón interno de concentración conocida a las muestras, como se ha explicado ya en apartados anteriores. Esto fue posible gracias a la alta estabilidad que presentó el flujo de trazador durante su adición al sistema. Por lo tanto, fue posible la cuantificación de los analitos simplemente a partir del cálculo de las áreas de patrón interno y del compuesto de interés, y de la concentración del patrón interno añadido a las muestras, empleando la ecuación [23]. Esta estrategia asume un flujo másico arbitrario para el trazador por lo que todos los parámetros de la ecuación [24] son conocidos excepto R_m , la cual se obtiene experimentalmente. Una vez obtenida la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en la mezcla para cada punto, los valores de R_m se introducen en la ecuación básica de la Dilución Isotópica en línea de carbono (ecuación [24]), obteniendo el valor de flujo másico de la mezcla para cada punto. Representando M_s frente al tiempo se obtiene el cromatograma de flujo másico, donde la integración de los analitos de

interés y del patrón interno proporciona de manera directa la cantidad de analito que eluye en cada pico cromatográfico a través de la ecuación [23]. Finalmente, conociendo la fórmula molecular de los compuestos de interés es posible calcular la concentración del compuesto eluido.

Las principales ventajas de la elección de esta estrategia de calibración para el flujo másico del trazador en procedimientos de IDMS en línea de carbono son: (i) elimina la mayor fuente de incertidumbre del análisis, la cual se encuentra en la determinación del flujo másico del trazador, (ii) reduce la complejidad relativamente alta de los cálculos, (iii) corrige las variaciones en el volumen inyectado en GC, y (iv) evita el conocimiento del flujo y concentración exacta del trazador, así como el volumen del loop de inyección en FIA y HPLC.

La relación $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ se da como la relación medida $^{12}\text{CO}_2^+ / ^{13}\text{CO}_2^+$ (44/45) ya que la influencia de la composición isotópica del oxígeno natural es despreciable.

I.4.3 Configuración GC-Combustión-MS

Debido a que se trata de una técnica relativamente joven el número de aplicaciones es limitado, por lo que en los próximos puntos se describirán las aplicaciones publicadas para la determinación de compuestos orgánicos mediante GC-Combustión-MS.

I.4.3.1 Cuantificación de mezclas de compuestos orgánicos de la misma naturaleza

En primer lugar, para la validación de la metodología propuesta se llevó a cabo la cuantificación de una mezcla de compuestos orgánicos sencillos formados únicamente por átomos de C e H [67]. La mezcla de compuestos orgánicos elegida fue una disolución estándar de los n-alcanos C9-C20, cubriendo un amplio rango tanto de puntos de ebullición (128-343 °C) como de número de carbonos en su estructura. El patrón interno seleccionado fue uno de los compuestos de la mezcla, el n-tetradecano, por lo que su única diferencia con los analitos reside tan sólo en el número de carbonos. Así se llevó a cabo la corrección simultánea del flujo másico de trazador y del volumen inyectado. En la Figura 7a se muestra el cromatograma de intensidades para m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2^+$) y m/z 45 ($^{13}\text{CO}_2^+$) tras la combustión del eluyente cromatográfico y la adición del trazador isotópico.

Como se puede observar se detecta una señal constante a m/z 45 que se corresponde con el flujo del trazador enriquecido $^{13}\text{CO}_2$, y una señal a m/z 44 que da lugar al perfil cromatográfico de los compuestos de abundancia natural eluidos del GC y transformados en CO_2 (mayoritariamente $^{12}\text{CO}_2$ debido al 98,9 % de abundancia del ^{12}C respecto al 1,1 % de ^{13}C) por su paso a través de la interfase de combustión. La aplicación de la ecuación de la Dilución Isotópica en línea de carbono (ecuación [24]) da como resultado el cromatograma de flujo másico que está representado en la Figura 7b.

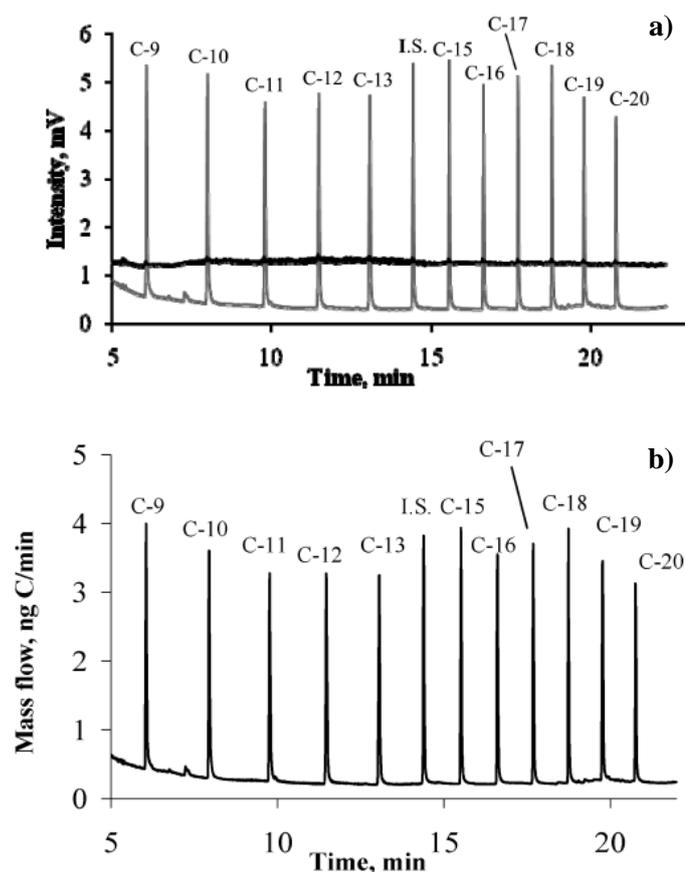


Figura 7. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla sintética de *n*-alcanos utilizada para la validación del procedimiento de la dilución isotópica en línea de carbono en GC. El tetradecano fue el patrón interno empleado [67].

La integración de los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos de la mezcla y al patrón interno en el cromatograma de flujo másico permite la cuantificación de los analitos de manera directa. Los resultados obtenidos mostraron una excelente precisión < 4% RSD y exactitud, con errores relativos variando en el intervalo de (-7)-(+5)%. Estos resultados demostraron una conversión cuantitativa de todos los n-alcános en CO₂ en el reactor de combustión independientemente de la longitud de la cadena.

I.4.3.2 Cuantificación de mezclas de compuestos orgánicos de diferente naturaleza

Para evaluar la aplicabilidad de la metodología a compuestos orgánicos más complejos se seleccionó una mezcla de compuestos que contenía compuestos insaturados de bajo punto de ebullición (tolueno, etilbenceno, y m,p,o-xilenos), compuestos saturados (C11, C13, C15) y compuestos funcionalizados (butirato y hexanoato de butilo) [71]. El patrón interno elegido fue de nuevo el n-tetradecano. El cromatograma de flujo másico y los resultados cuantitativos obtenidos se muestran en la Figura 8 y en la Tabla 1, respectivamente. El alto fondo de carbono en la parte inicial del cromatograma corresponde a la cola del disolvente (n-hexano) procedente del horno de combustión.

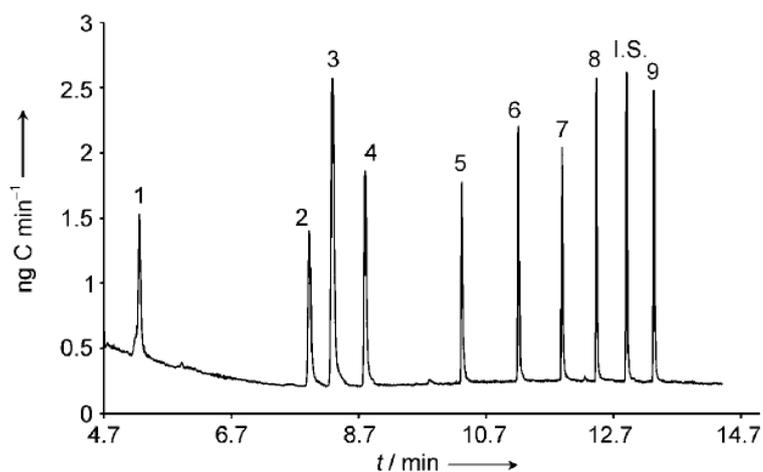


Figura 8. Cromatograma de flujo másico para la mezcla de BTEX, ésteres y alcanos empleada para demostrar el carácter genérico del procedimiento IDMS en línea de carbono. El *n*-tetradecano fue el patrón interno empleado. La identidad de los picos cromatográficos se dan en la Tabla 1. [71]

La recuperación obtenida para todos los compuestos orgánicos analizados (93-106%) estuvo en consonancia con los valores teóricos y confirma el carácter universal del procedimiento descrito. Este estudio demostró una transmisión prácticamente cuantitativa durante la etapa de inyección en el rango de puntos de ebullición estudiado y una conversión cuantitativa de los analitos orgánicos sencillos en el reactor de combustión independientemente de su estructura.

Tabla 1. Resultados cuantitativos de la mezcla de BTEX, ésteres y n-alcanos obtenidos durante la validación de la metodología. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=5. [71]

Pico	Compuesto	Recuperación (%)
1	tolueno	93 ± 5
2	etilbenceno	97 ± 5
3	o,p-xileno	101 ± 6
4	m-xileno	101 ± 5
5	butirato de butilo	105 ± 5
6	undecano	106 ± 6
7	butanoato de hexilo	100 ± 4
8	tridecano	104 ± 4
9	pentadecano	98 ± 4

I.4.3.3 Aplicación a muestras reales: cuantificación de los compuestos mayoritarios de un combustible diésel

En la Figura 9 se muestra el cromatograma de flujo másico obtenido para un diésel tras una simple dilución con n-hexano. A pesar del gran número de compuestos quemados en el reactor de combustión, el cromatograma no mostró colas ni degradación. En este caso el compuesto seleccionado como patrón interno fue el butanoato de hexilo, ya que el n-tetradecano estaba presente en la muestra. Debido a la respuesta independiente de la especie se puede seleccionar el patrón interno apropiado para cada aplicación particular.

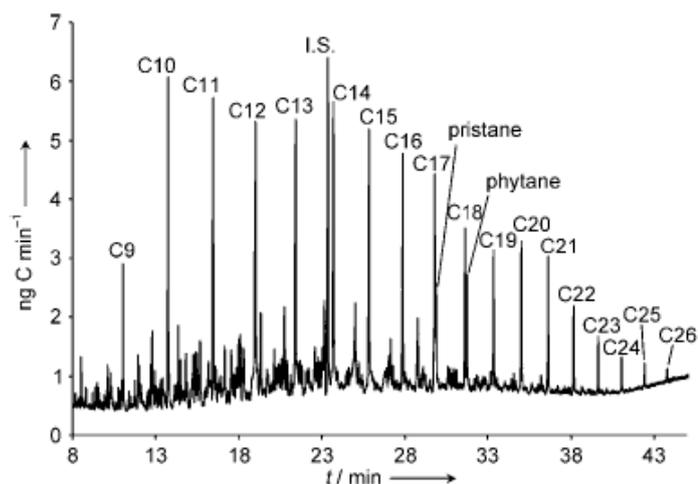


Figura 9. Cromatograma de flujo másico para una muestra de diésel obtenido mediante Gc-Combustión-MS con Dilución Isotópica en línea de carbono. El patrón interno fue el burirato de hexilo. [67]

La complejidad de la muestra obligó a llevar a cabo un análisis complementario GC-MS para la identificación de los compuestos más abundantes y comprobar su pureza de pico. Gracias al diseño del prototipo desarrollado fue posible la realización de este análisis complementario en el propio equipo. Los principales compuestos detectados y cuantificados fueron los n-alcenos C9-C26, aunque también se pudieron cuantificar algunos isoprenoides acíclicos, típicamente utilizados en diagnósticos de derrames petrolíferos.

I.4.3.4 Recuperación cuantitativa de la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME)

La cuantificación independiente del compuesto permitió la determinación de los rendimientos de extracción absolutos de la microextracción en fase sólida en diferentes tipos de fibras. Este proceso no es fácil de determinar empleando otro tipo de detectores para GC. La determinación de los rendimientos de extracción se suele llevar a cabo mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas empleando SPME con las obtenidas de la inyección directa de las disoluciones estándar, asumiendo que las eficacias de la transmisión en el inyector son las

mismas para ambas inyecciones. Sin embargo, ambos tipos de introducción de muestra están afectados por diferentes variables y se pueden producir importantes errores en la determinación.

Para evaluar la aplicabilidad del prototipo instrumental en estudios fundamentales de SPME se seleccionaron tres recubrimientos de fibra diferentes comúnmente empleados en análisis de BTEX (PDMS, PDMS/DVB, y CAR/PDMS/DVB). En la Tabla 2 se muestra la cantidad total de carbono en la disolución de trabajo para cada compuesto y la recuperación absoluta para las tres fibras utilizadas.

Tabla 2. Comparación de la recuperación absoluta obtenida para tres tipos diferentes de fibras SPME empleando la Dilución Isotópica en Línea de Carbono. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=3 [71].

Compuesto	añadido (ng)	Recuperación absoluta (%)		
		PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS/DVB
Benceno	78,0	1 ± 0,1	19 ± 0,6	35 ± 6
Tolueno	79,5	4 ± 0,3	52 ± 0,3	58 ± 3
Etilbenceno	79,7	8 ± 1	58 ± 0,2	59 ± 3
m,p-xileno	79,7	9 ± 1	60 ± 0,4	66 ± 3
o-xileno	79,5	12 ± 1	71 ± 1	78 ± 2

Tan sólo nueve análisis fueron necesarios (tres réplicas por cada fibra probada) para obtener información de gran valor en estudios fundamentales de SPME. Es importante comentar que esta ocasión fue necesario emplear otra estrategia de calibración para el flujo másico del trazador debido a la diferente afinidad de los compuestos por la fibra. Para la determinación del flujo másico del trazador se

empleó un estándar de abundancia natural y se llevó a cabo un procedimiento de Dilución Isotópica inversa tradicional.

I.4.3.5 Ventajas y limitaciones de la IDMS en línea de carbono en GC

La Dilución Isotópica en línea de carbono permite la detección cuantitativa exacta y verdaderamente universal de los compuestos orgánicos separados por GC sin la necesidad de estándares específicos ni procedimientos de calibración, además de proporcionar información estructural de los compuestos eluidos gracias al diseño del prototipo instrumental desarrollado.

El ahorro en tiempo y dinero es considerable respecto a otras estrategias de cuantificación que hacen uso de estándares específicos y calibrados metodológicos. Los gastos asociados al empleo del $^{13}\text{CO}_2$ marcado isotópicamente para la calibración del instrumento in situ son despreciables, por lo que se puede considerar un procedimiento de cuantificación altamente rentable [72].

El rápido desarrollo de la industria farmacéutica, cosmética, de detergentes, de colorantes y agroquímica, entre otras, ha provocado un gran crecimiento del número de compuestos orgánicos sujetos a análisis y los estándares analíticos certificados no siempre están disponibles. En este sentido, el procedimiento de IDMS en línea de carbono desarrollado permite la cuantificación genérica de aquellos compuestos para los que no se dispone de los estándares adecuados. Una cuantificación exacta mediante GC-FID o GC-MS requiere el uso de disoluciones de calibración para calcular los factores de respuesta relativos, por lo que la cuantificación no sería posible.

Además, la cuantificación independiente del compuesto puede ser una herramienta muy útil para la optimización y evaluación cuantitativa de procesos no cuantitativos como los procedimientos de extracción y preconcentración aplicados antes del análisis cromatográfico.

Por otra parte, como procedimiento de Dilución Isotópica en línea que es, la pérdida de sustancia o las recuperaciones incompletas durante la etapa de preparación de la muestra antes del equilibrio isotópico no serán corregidas y por ello se recomienda la mínima preparación de muestra antes del análisis se si

quiere llevar a cabo una cuantificación exacta. Por lo tanto, la aplicación de esta metodología a muestras mediambientales o clínicas no será posible debido a la gran cantidad de pasos de preparación de muestra que se requieren, a no ser que se empleen los patrones internos metodológicos adecuados. Además, cualquier pérdida, recuperación incompleta o degradación del compuesto que ocurra durante la etapa cromatográfica afectará de manera crítica a los resultados cuantitativos obtenidos. En este contexto hay que tener un especial cuidado en la transferencia de los compuestos durante la etapa de inyección ya que las recuperaciones de la columna son cuantitativas siempre y cuando no tenga lugar la degradación térmica. Por último, un requisito imprescindible para la aplicación de la IDMS en línea de carbono es una separación cromatográfica completa de los compuestos presentes en la muestra para la obtención de resultados cuantitativos exactos. Debido a que la única especie detectada es el CO₂, muestras con matrices complejas darán lugar a cromatogramas con múltiples solapamientos, ya que todo el carbono presente será detectado. De nuevo, ésta representa una limitación para la cuantificación de muestras clínicas o mediambientales debido a la complejidad que presentan.

II Objetivos

La Dilución Isotópica en línea de Carbono permite obtener resultados cuantitativos sin la necesidad de utilizar estándares específicos para cada analito. La conversión cuantitativa del eluyente cromatográfico a CO₂ y la adición de la misma especie enriquecida en ¹³C como trazador permiten alcanzar el equilibrio isotópico requerido antes de la entrada en la fuente de ionización. De esta manera, se mide una única especie en el espectrómetro de masas y por tanto, se garantiza una respuesta independiente del compuesto sin importar la fuente de ionización utilizada.

Su aplicación en cromatografía de gases indica que el prototipo instrumental desarrollado GC-Combustión-MS podría convertirse en el primer detector universal y genérico para esta técnica de separación cromatográfica. Esta instrumentación permitió la validación de la metodología mediante el análisis de diferentes familias de compuestos orgánicos simples (n-alcános, BTEX, y ésteres) y su aplicación a muestras reales. Sin embargo, es necesario la extensión de la metodología a otros compuestos orgánicos de mayor complejidad para la consolidación y aceptación de este nuevo detector, así como una comparación crítica con el detector más universal y establecido para compuestos orgánicos en GC, el detector de ionización de llama.

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo principal planteado en la presente Tesis Doctoral es *la extensión de la metodología de la Dilución Isotópica en línea de carbono a todo tipo de compuestos orgánicos, mediante su adaptación a equipos GC-IRMS y uso de inyectores adecuados, para su implantación como sistema de detección genérico en cromatografía de gases*. Este objetivo principal se desarrolló a través de los siguientes objetivos específicos:

➤ *Modificación de un equipo comercial GC-IRMS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono a compuestos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura*. Tras la evaluación de las características analíticas e instrumentales del prototipo GC-Combustión-MS es necesaria la búsqueda de la instrumentación adecuada que permita la extensión de la metodología a compuestos orgánicos más complejos que necesitan sistemas de inyección más sofisticados (de temperatura programada, PTV) para evitar su discriminación durante esta etapa. Se desarrollarán e implementarán las

modificaciones instrumentales necesarias sobre un equipo GC-IRMS que permitan realizar medidas cuantitativas mediante Dilución Isotópica en línea de carbono utilizando un único patrón genérico para la cuantificación de un gran número de compuestos de diferente naturaleza en un amplio rango de puntos de ebullición, número de átomos de carbono, y con heteroátomos en su estructura.

➤ ***Evaluación de la respuesta independiente del compuesto del detector desarrollado y comparación con el detector de ionización de llama.*** La calibración independiente del compuesto del detector FID para la cuantificación absoluta de compuestos orgánicos empleando un solo patrón interno genérico es ampliamente utilizada en la industria petroquímica y de los biocombustibles. De hecho es la estrategia recogida en la Norma EN 14103 para la cuantificación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) en biodiesel. Con el objetivo de establecer el detector desarrollado como el primer detector verdaderamente genérico y universal para GC, se realizará una comparación de la respuesta de ambos detectores sin utilizar estándares específicos ni calibraciones externas para la cuantificación de los FAMEs en las muestras de biodiesel. Dichos analitos además cubren un amplio intervalo tanto de puntos de ebullición como de número de átomos carbonos en su estructura. Se evaluará el uso de patrones internos genéricos de diferente naturaleza. .

➤ ***Estudios de origen de biodiesel mediante la información dual obtenida por el equipo de GC-IRMS modificado, a través de los perfiles cuantitativos de los FAMEs y de la huella isotópica de C en cada uno de ellos.*** Las modificaciones instrumentales a desarrollar en el equipo de GC-IRMS para permitir la aplicación de Dilución Isotópica en línea de carbono no afectarán a su capacidad para medir relaciones isotópicas de C de forma exacta y precisa. Por tanto, se evaluará el uso combinado tanto de los perfiles cuantitativos de FAMEs obtenidos mediante Dilución Isotópica en línea como de la huella isotópica de C ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) en cada uno de ellos como posible metodología que permita estudiar el origen y posibles adulteraciones de muestras de biodiesel.

III Experimental

III.1 INSTRUMENTACIÓN

III.1.1 Cromatógrafo de Gases - Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (GC-IRMS)

El equipo comercial GC-IRMS de la compañía Thermo Scientific (Bremen, Alemania) consta de cuatro unidades instrumentales. El esquema de este equipo se ilustra en la Figura 10.

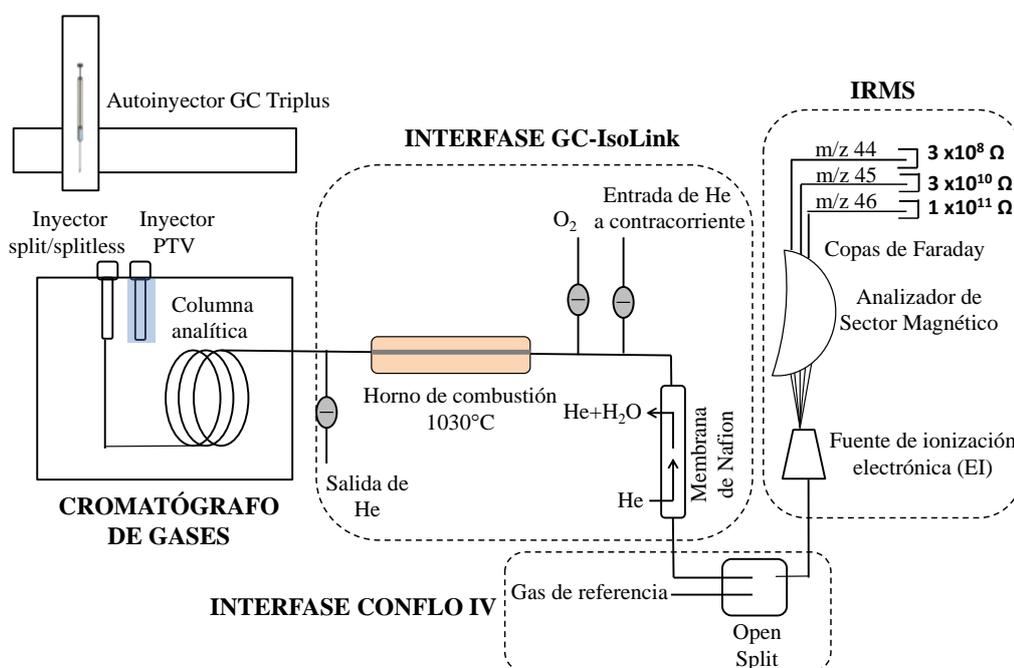


Figura 10. Esquema del equipo comercial GC-Combustión-IRMS para la medida de alta precisión de las relaciones isotópicas de carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

El **Cromatógrafo de Gases Trace GC Ultra** está equipado con el autoinyector GC Triplus, un inyector convencional split/splitless, y un inyector de vaporización con temperatura programable (PTV).

Antes de la entrada del eluyente cromatográfico al espectrómetro de masas, el equipo dispone de la **Interfase GC-IsoLink**. Esta interfase consta de cuatro partes bien diferenciadas: i) un reactor de Cu/Ni/Pt introducido en un horno de alta temperatura (1030°C) que proporciona la combustión cuantitativa de los analitos a

CO₂; ii) un sistema de dos válvulas de apertura y cierre simultáneas que permite la entrada de un flujo de helio a contracorriente para evitar el paso del disolvente al reactor de combustión; iii) una válvula que permite la entrada de oxígeno para la oxidación del reactor; y, iv) un sistema de eliminación del agua de los gases de combustión, consistente en una membrana semipermeable de Nafion.

La *Interfase universal Conflo IV*, situada entre la membrana de Nafion y el IRMS, permite la entrada del flujo de la muestra en las mismas condiciones de presión que el gas de referencia utilizado para proporcionar la medidas de alta precisión características de esta instrumentación.

Por último, el *Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas Delta V Advantage* consta de una fuente de ionización electrónica, un analizador de masas de tipo sector magnético, y tres copas de Faraday utilizadas para la detección simultánea a las masas de interés: 44, 45 y 46. La amplificación de cada una de las copas está optimizada para que todas ellas den lugar a una señal de la misma intensidad para las tres masas medidas. La energía de ionización aplicada en la fuente fue de 124 eV. El procesador de datos utilizado fue Isodat 2.0.

Este equipo se empleó tanto para la medida de deltas de carbono mediante el análisis isotópico específico del compuesto (CSIA) como para la aplicación del procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono tras una serie de modificaciones instrumentales. Para ello fue necesario la introducción de un flujo continuo del trazador isotópico ¹³CO₂ y la modificación de la amplificación de la señal para m/z 45. Las características de la instrumentación junto con las modificaciones instrumentales se abordarán en detalle a lo largo del capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral.

III.1.2 Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas (GC-MS)

El equipo GC-MS consta de un *Cromatógrafo de Gases modelo Agilent 6890N*, equipado con un inyector split/splitless, y un *Espectrómetro de Masas de tipo cuadrupolo 5975B*, equipado con una fuente de ionización electrónica. La energía de ionización aplicada en la fuente fue de 70 eV. El MS trabajó en modo full scan en un rango m/z 500-600 amu para la identificación de todos los compuestos orgánicos estudiados. La identificación se realizó por comparación empleando la base de datos de la librería de espectros de masa Wiley 235. El tiempo de

integración fue de 100 ms. Las temperaturas de la línea de transferencia, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 280, 230 y 150°C, respectivamente.

III.1.3 Cromatógrafo de gases – Detector de Ionización de llama (GC-FID)

El equipo GC-FID consta de un Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer, modelo Clarus 400 (Shelton, CT, USA), equipado con un inyector split/splitless, y un detector de ionización de llama. El procesador de datos utilizado fue Clarus versión 400 6.3.1.054.

III.1.4 Sistema de adición del flujo de trazador $^{13}\text{CO}_2$

El sistema utilizado para adicionar el flujo gaseoso del trazador enriquecido fue el mismo que el utilizado en el prototipo instrumental inicial [67]. Este sistema consiste en un cilindro de acero inoxidable de 3,8 L de capacidad (HOKE, Spartanburg, USA) equipado con un manómetro, válvulas de regulación y cierre y una T con septum para la introducción del trazador. Para obtener un flujo constante se acopló un controlador de flujo másico (Bronkhorst Hi-tech, Ruurlo, Holanda) capaz de regular flujos de 0,1 a 5 mL/min con una precisión de $\pm 0,2\%$.

III.1.5 Condiciones Cromatográficas

III.1.5.1 Estudio de compuestos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura (Capítulo 1).

La separación de los compuestos se realizó con una columna DB-XLB de 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Los inyectores split/splitless y PTV trabajaron ambos en el modo de inyección sin división de flujo (splitless). El volumen de muestra inyectado en el GC fue de 1-2 μL . Se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 1 mL/min para todas las muestras y condiciones. Los materiales y dimensiones del liner dependieron del inyector utilizado. Para el inyector split/splitless se utilizaron liners de vidrio de 3 mm de diámetro interno, mientras que para el inyector PTV los liners utilizados fueron de acero con un diámetro interno de 1-2 mm, ambos de la casa comercial Thermo Scientific (Bremen, Alemania). El liner utilizado en el inyector split/splitless del equipo GC-MS fue suministrado por Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Las condiciones experimentales utilizadas a lo largo de todo el estudio están

Experimental

detalladas en las Tabla 3 y Tabla 4. Tales condiciones están referidas a la instrumentación IRMS y MS, respectivamente.

Tabla 3. Condiciones experimentales GC-IRMS empleadas en el estudio de compuestos de alto punto de ebullición y con heteroátomos en su estructura.

Parámetros	Inyección		Cuantificación		
	PAHs		PAHs + alcanos	PCBs	Benzo-tiofenos
Modo de inyección	Splitless	PTV slss	PTV slss	PTV slss	PTV slss
Temperatura del inyector	310 °C	55 °C	40 °C	55 °C	55 °C
		(0, 3min)	(0,1 min)	(0,1 min)	(0,3 min)
		10 °C/s	10 °C/s	10 °C/s	10 °C/s
		310 °C	310 °C	280 °C	310 °C
Velocidad de inyección	50 µL/s	(20 min)	(20 min)	(15 min)	(20 min)
		30 µL/s	30 µL/s	30 µL/s	30 µL/s
Tiempo de splitless	0,8 min	0,8 min	0,8 min	0,8 min	0,8 min
Relación de split	1:20	1:50	1:50	1:50	1:50
Programa de temperatura del horno	50°C	50 °C	40 °C	80 °C	50 °C
		(1 min)	(1,5min)	(2 min)	(1,5 min)
		4°C/min	4°C/min	8 °C/min	20°C/min
		325 °C	325 °C	60 °C	180°C
		(20 min)	(20 min)	125 °C	(5 min)
				(3 min)	5°C/min
				(3 min)	280°C
				4 °C/min	(3 min)
		325 °C			
		(8 min)			

Tabla 4. Condiciones experimentales GC-MS para la identificación de PAHs, PCBs y benzotiofenos.

Parámetros	PAHs	PCBs	Benzotiofenos
Modo de trabajo	Slss	Slss	Slss
Temperatura del inyector	310 °C	280 °C	310 °C
Velocidad de inyección	Manual	Manual	Manual
Tiempo de splitless	0,8 min	0,8 min	0,8 min
Relación de split	1:20	1:20	1:20
		80 °C (1,5 min)	
Programa de temperatura del horno	50 °C (1 min)	20°C/min	50 °C (5 min)
	4 °C/min	180°C (5 min)	15°C/min
	325 °C (20 min)	5°C/min	280°C (5 min)
		280°C (3 min)	

III.1.5.2 Estudio de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAMES) (Capítulo 2)

La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna BD-EN 14103 de 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), recomendada por la Norma europea EN 14103 para la determinación de FAMES en biodiesel. La cuantificación se llevó a cabo tanto por GC-IRMS con Dilución Isotópica en línea de carbono como por GC-FID. La determinación de los deltas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) se realizó mediante GC-combustión-IRMS tabajando con la configuración original del equipo. Los inyectores split/splitless y PTV trabajaron ambos en el modo de inyección sin división de flujo (splitless). El volumen de muestra inyectado en el GC fue de 1 μL .

Las condiciones experimentales utilizadas a lo largo de todo el estudio están detalladas en las Tabla 5. Tales condiciones están referidas a la instrumentación GC-IRMS y GC-FID. Para el cálculo de los deltas de carbono fue necesario modificar ligeramente el tiempo isotérmico inicial del horno debido a la introducción de pulsos de CO_2 durante el análisis cromatográfico. El tiempo isotérmico inicial del inyector en esta ocasión fue de 3 minutos.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación, cuantificación y cálculo de $\delta^{13}C$ de FAMES mediante GC-combustión-IRMS y GC-FID.

Parámetros	GC-combustion-IRMS	GC-FID
Modo de inyección	PTV splitless	split/splitless
Temperatura del inyector	55 °C (0,10 min) 10 °C/s 280 °C (25 min)	280 °C
Velocidad de inyección	30 μ L/s	30 μ L/s
Tiempo de splitless	0,8 min	0,8 min
Relación de split	1:50	1:20
Gas portador	helium	helium
Flujo de gas portador	1 mL/min	1,5 mL/min
Temperatura FID	---	250°C
Flujo de H ₂	---	50 mL/min
Flujo de aire	---	450 mL/min
Programa de temperatura del horno cromatográfico	50 °C (1 min) 15 °C/min 250 °C (10 min)	60 °C (2 min) 10 °C/min 200 °C (0,1 min) 5 °C/min 240 °C (12 min)

III.2 PROCEDIMIENTOS

III.2.1 Cuantificación mediante GC-IRMS y Dilución Isotópica en línea de carbono

Tal y como se ha explicado en el introducción, la Dilución Isotópica en línea de carbono se basa en la transformación cuantitativa de los compuestos orgánicos a CO₂ para la posterior adición del trazador isotópico de la misma especie enriquecido en carbono-13, en un sistema de flujo. Tras alcanzar el equilibrio

isotópico, la relación isotópica en la mezcla, $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, se mide de manera continua en el espectrómetro de masas. En este caso, la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, se determina como la relación 44/45 correspondiente al CO_2 de abundancia natural y al CO_2 enriquecido en carbono-13. El flujo del trazador se mantiene constante durante todo el experimento mientras que el flujo del analito es variable debido al empleo de un sistema cromatográfico. En la Figura 11 está desarrollado el procedimiento general empleado para la cuantificación de los compuestos orgánicos presentes en una muestra mediante Dilución Isotópica en línea de carbono tras su separación por cromatografía de gases.

A partir del cromatograma de intensidades obtenido para las dos masas de interés, m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2$) y m/z 45 ($^{13}\text{CO}_2$), se calcula la relación de intensidades punto a punto a lo largo del tiempo de adquisición del cromatograma completo. Para ello, es necesario disponer de los datos de intensidades para ambas masas respecto al tiempo. Una vez obtenida la relación isotópica $R_m(44/45)$ para cada punto, se introducen estos valores en la ecuación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, tal y como se explicó en la Introducción (Ecuación [24]):

$$M_s = C_s d_s f_s = C_t d_t f_t \frac{AW_s}{AW_t} \frac{A_t^{13}}{A_s^{12}} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right)$$

De esta manera, se obtiene el valor del flujo másico de la muestra, M_s , expresado en ng C/min , para cada punto del cromatograma. Representando M_s frente al tiempo se obtiene el denominado cromatograma de flujo másico, donde el eje de abscisas tiene unidades de flujo másico (ng C/min) mientras que el eje de ordenadas tiene unidades de tiempo. La integración del cromatograma de flujo másico proporciona de manera directa la cantidad de carbono natural que eluye en cada pico cromatográfico. Conociendo la fórmula molecular de cada compuesto orgánico presente en la muestra se puede calcular fácilmente la cantidad de compuesto que eluye en cada uno de los picos cromatográficos.

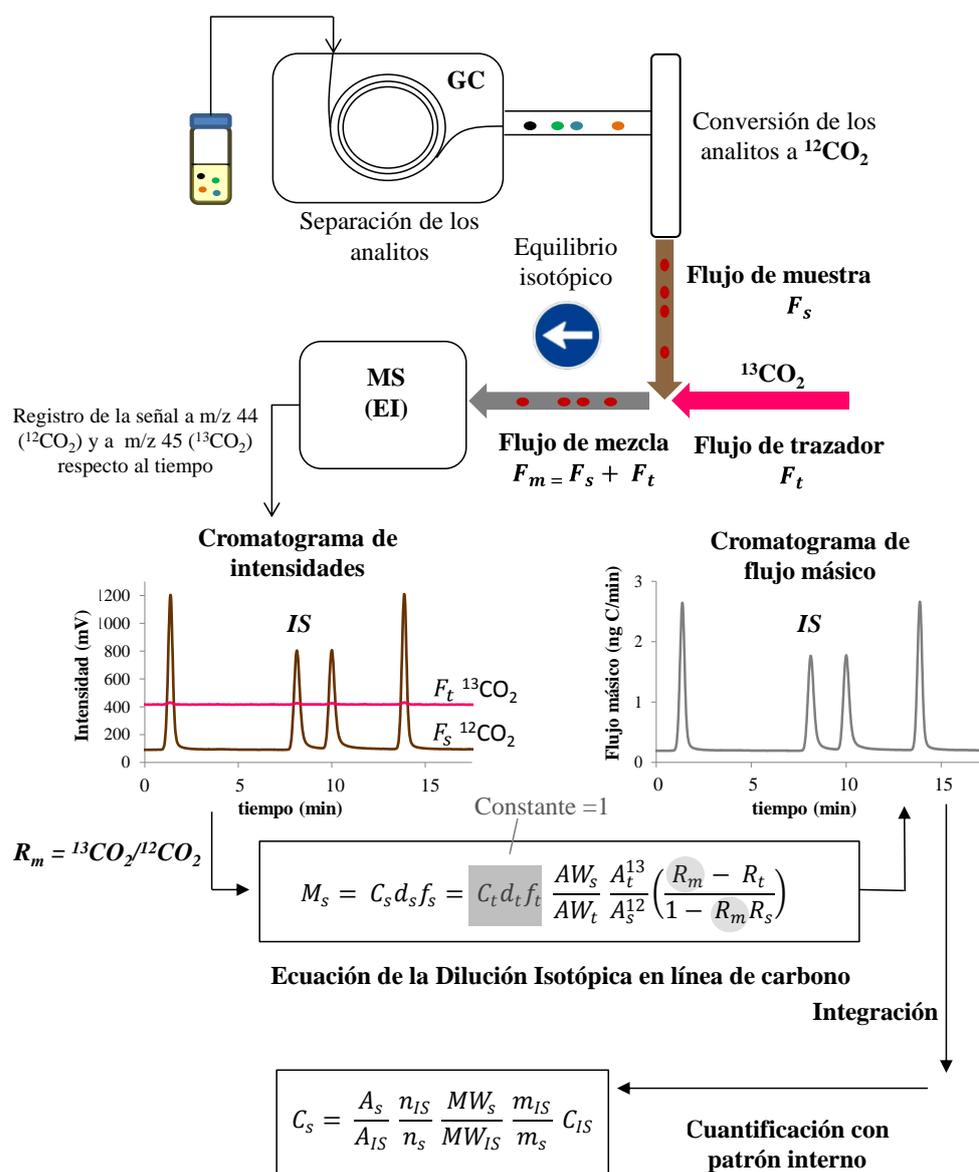


Figura 11. Procedimiento general de la Dilución Isotópica en línea de carbono en cromatografía de gases.

Debido a la complejidad que presenta la determinación exacta y precisa del flujo másico del trazador adicionado en fase gaseosa, se empleó en todos los casos un patrón interno de concentración conocida para asignar las concentraciones de los

analitos. De esta manera, la ecuación de la Dilución Isotópica en línea de carbono se reduce a esta sencilla expresión (Ecuación [23]):

$$C_s = C_{IS} \frac{\text{Área}_s}{\text{Área}_{IS}}$$

Donde Área_s y Área_{IS} son las áreas de los picos correspondientes al compuesto a determinar y al patrón interno, respectivamente, en el cromatograma de flujo másico, y C_{IS} es la concentración en carbono del patrón interno utilizado. Finalmente, la concentración del analito en la muestra C_s ($\mu\text{g/g}$) se calcula a partir de la Ecuación [25]:

$$C_s = \frac{A_s}{A_{IS}} \frac{n_{IS}}{n_s} \frac{MW_s}{MW_{IS}} C_{IS} \quad [25]$$

Como se puede observar en la ecuación [25], para el cálculo de la concentración del analito en la muestra es necesario conocer la fórmula molecular tanto del analito como del patrón interno empleado. n_s , n_{IS} , MW_s y MW_{IS} , se corresponden con el número de átomos de carbono y los pesos moleculares del analito y patrón interno, respectivamente, mientras que C_{IS} se refiere a la concentración del patrón interno utilizado ($\mu\text{g/g}$).

De esta manera, el cálculo de concentraciones se simplifica significativamente, ya que la cantidad de carbono que eluye en un determinado pico se determina a partir de la relación de áreas entre el pico de interés y el patrón interno, sin necesidad de conocer con exactitud el flujo másico de trazador.

III.2.2 Cuantificación mediante GC-Combustión-IRMS

Con el objetivo de estudiar la respuesta genérica del detector se procedió a la cuantificación de los analitos, tan sólo empleando el cromatograma de intensidades para m/z 44, sin el uso del trazador enriquecido, y respecto a un patrón interno de concentración y fórmula molecular conocida. La ecuación empleada para tal fin fue la misma que para el procedimiento de dilución isotópica de carbono en línea (ecuación [25]). La única diferencia reside en el cromatograma donde tiene lugar la integración de los picos cromatográficos. En esta ocasión, la integración se realizó sobre el cromatograma de intensidades para

m/z 44, mientras que en procedimientos de IDMS en línea de carbono, esta integración tiene lugar sobre el cromatograma de flujo másico.

III.2.3 Cuantificación mediante GC-FID

Debido al carácter genérico y universal del detector FID para cromatografía de gases es posible la cuantificación de los compuestos de una mezcla sin la necesidad de estándares específicos. Las dos estrategias de calibración para la cuantificación independiente del compuesto mediante GC-FID son el método del porcentaje de área, y el empleo del número de carbonos efectivo (ECN) para predecir los factores de respuesta relativos de los analitos respecto a un patrón interno de referencia. El método del porcentaje de área se suele emplear cuando los compuestos a determinar pertenecen a una misma familia estructural con un número cercano de átomos de carbono. En este caso, la elección de un patrón interno adecuado puede proporcionar datos cuantitativos de manera directa a través de la Ecuación [26]:

$$c_s = \frac{A_s}{A_{IS}} c_{IS} \quad [26]$$

En donde c_s es el contenido (mg/g) del compuesto analizado; A_s y A_{IS} son las áreas de los picos correspondientes al analito y al patrón interno, respectivamente; y c_{IS} es el contenido (mg/g) del patrón interno utilizado. Esta ecuación es equivalente a la ecuación [23], utilizada en la cuantificación mediante el procedimiento de Dilución Isotópica en línea de carbono, cambiando únicamente la concentración del compuesto en carbono por la concentración del compuesto.

Para corregir las diferencias encontradas en la respuesta del FID debido a la contribución de los diferentes grupos funcionales o heteroátomos que pueden estar formando parte de la estructura de un compuesto, se utiliza la corrección del ECN para la obtención de los datos cuantitativos. La cuantificación se realiza a través de la Ecuación [27]:

$$C_s = \frac{A_s}{A_{IS}} \frac{ECN_{IS}}{ECN_s} \frac{MW_s}{MW_{IS}} C_{IS} \quad [27]$$

En donde ECN_s , ECN_{IS} , MW_s y MW_{IS} , se corresponden con el número de carbonos efectivo y los pesos moleculares del analito y del patrón interno,

respectivamente. Esta ecuación es muy similar a la ecuación [25] cambiando el número de átomos de carbono en el compuesto por su número de carbonos efectivo.

III.2.4 Determinación de deltas de carbono mediante GC-IRMS

El valor del delta de carbono $\delta^{13}\text{C}$ es la diferencia relativa en la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ entre el analito y el estándar de referencia internacional *Vienna Peede Belemnite* (VPDB) al que se le ha asignado un valor de delta de cero, expresado en tanto por mil.

Los equipos GC-IRMS disponen de una interfase de combustión donde todo el eluyente cromatográfico se transforma en CO_2 . El flujo de CO_2 procedente de la combustión entra en la fuente de ionización electrónica donde se ioniza, para más tarde medir de manera simultánea las señales procedentes de los diferentes isotopólogos formados a las masas 44, 45 y 46. La relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se calcula como la relación de las áreas de pico a m/z 44 y m/z 45 correspondientes a las especies $^{12}\text{CO}_2^+$ y $^{13}\text{CO}_2^+$. La contribución del oxígeno natural a la señal para m/z 45 es significativa (6,5%) por lo que es necesaria su corrección, y por ello la medida de la señal a m/z 46. La determinación del valor del delta es un proceso automático realizado por el software y para su determinación los únicos requisitos necesarios son: (i) una separación cromatográfica a línea de base de los compuestos de interés, (ii) la introducción de un estándar de referencia certificado en delta de carbono respecto al estándar internacional VPDB, y (iii) evitar el solapamiento cromatográfico entre el estándar de referencia y los compuestos presentes en la muestra.

El estándar de referencia se adicionó a la muestra antes del análisis cromatográfico para corregir cualquier proceso de fraccionamiento que pueda tener lugar durante el análisis. Cuando se sigue esta estrategia para la introducción del estándar, éste suele contener al menos dos compuestos certificados en delta. Uno de ellos actuará como referencia y su valor de delta certificado debe introducirse en el procesador de datos Isodat 2.0. De esta manera, el software calcula el valor de delta para todos los compuestos presentes en el cromatograma. El valor calculado para el segundo compuesto certificado, que también está presente en el estándar, debe estar en perfecta concordancia con el valor certificado para obtener valores de delta fiables. Además, se introdujeron pulsos

de CO₂ a lo largo del análisis cromatográfico para comprobar la variación del delta durante el análisis. El CO₂ se introdujo a través de la interfase Conflo IV, cuya principal misión es igualar la presión con la que muestra y CO₂ entran en la fuente de ionización para conseguir la precisión requerida en la determinación. En este caso, el valor de delta de los pulsos de CO₂ sólo fue un indicador de la variación del delta, pero no se utilizó como estándar de referencia.

III.2.5 Síntesis del dióxido de carbono enriquecido empleado como trazador

La síntesis del trazador se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el empleado durante el desarrollo del prototipo instrumental GC-combustión-MS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono [67]. De manera general, se introduce una pequeña cantidad (200 mg) de bicarbonato sódico enriquecido en carbono-13 en un vial de tres bocas previamente purgado con helio para evitar contaminaciones por el CO₂ natural presente en el aire. A continuación, se añaden 500 µL de ácido fosfórico a través de un septum y, tras la reacción ácido-base, se genera el CO₂ enriquecido en ¹³C. Utilizando una jeringa especial para gases, se extraen del matraz 7 mL de la fase gaseosa y se introducen en el depósito para gases, utilizado para almacenar el trazador. Una vez inyectado el trazador, el depósito se presuriza con helio a 5 bar.

III.3 MATERIALES Y REACTIVOS

III.3.1 Materiales

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se utilizó el siguiente material de laboratorio:

- Viales ámbar de vidrio con tapón recubierto de PTFE de 2, 7 y 15 mL (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).
- Viales de vidrio de 2 mL con septum de silicona/PTFE para autoinyector (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).
- Jeringa de vidrio de 10 µL para autoinyector (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).
- Jeringa para gases de 10 mL (Hamilton, Bonaduz, Suiza).

- Pipetas pasteur de vidrio (Deltalab, Barcelona, España).
- Micropipetas de volumen ajustable de 2-20 μL , 20-200 μL y de 100-1000 μL (High Tech Lab, Polonia y Eppendorf, Alemania).
- Capilar de sílice desactivado de 0,25 mm de diámetro interno (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).

III.3.2 Patrones

El bicarbonato sódico enriquecido en ^{13}C al 99% (>98% de pureza) se obtuvo de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

La mezcla estándar de PAHs (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto en diclorometano) y la mezcla estándar de PCBs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto en n-hexano) fueron suministradas por Supelco (Bellefonte, PA, USA). La mezcla estándar de n-alcanos (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto en n-hexano) fue suministrada por Fluka (Seelzy, Alemania).

La mezcla estándar de los FAMES pares y saturados desde el C4:0 hasta el C24:0 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto en n-hexano) fue suministrada por Sigma-Aldrich (St. Louise, USA).

Los patrones individuales de n-alcanos: octadecano y pentadecano, ambos con una pureza $\geq 99,8\%$ fueron proporcionados por Fluka (Seelzy, Alemania). Los patrones individuales 1-benzotiofeno (97% de pureza) y dibenzotiofeno (98% de pureza) fueron obtenidos de Acros (Sprinfield, NJ, USA), y el patrón 3-metilbenzotiofeno (96% de pureza) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louise, USA). El patrón benzo(b)fluoreno fue igualmente suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louise, USA).

Los patrones individuales de los FAMES heptadecanoato de metilo (C17:0, pureza 99%), oleato de metilo (C18:1, pureza 99,7%), linoleato de metilo (C18:2, pureza 99,2%) y linolenato de metilo (C18:3, pureza 99,4%), y los patrones individuales de los n-alcanos tridecano (pureza 99,6%) y heptadecano (pureza 99,7%) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louise, USA).

El material de referencia certificado SRM 2772 de biodiesel B100 basado en soja fue obtenido del NIST (Gaithersburg, MD, USA). El contenido de FAMES se da

como concentración certificada para ocho de los compuestos de la muestra, mientras que el resto se dan como valores de referencia.

El estándar de referencia certificado en deltas de carbono constituido por los n-alcenos C11, C15 y C20 (150 µg/mL de cada compuesto en ciclohexano) se obtuvo de Chiron (Trondheim, Norway). Todos los datos de $\delta^{13}\text{C}$ están expresados respecto al estándar de referencia internacional VPDB.

La estructura química y los acrónimos de los PAHs, PCBs y benzotiofenos utilizados se dan en las tablas Tabla. A. 1, Tabla. A. 2 y Tabla. A. 3 del Anexo 1.

III.3.3 Muestras

Cuatro muestras de biodiesel puro fueron suministradas por el proyecto de investigación europeo JRP-ENG09 “*Metrology for Biofuels*” organizado por el EMRP (*European Metrology Research Programme*): (i) SME-mx, un biodiesel de soja procedente de México, (ii) SME-br, un biodiesel de soja procedente de Brasil, (iii) CME-us, un biodiesel de canola procedente de América, y (iv) RME-de, un biodiesel de colza procedente de Alemania.

Una muestra de biodiesel de origen desconocido fue suministrada por una empresa anónima española productora de biodiesel: UME-es.

III.3.4 Reactivos generales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Todas las disoluciones estándar de trabajo se prepararon por disolución/dilución en n-hexano o diclorometano, ambos descritos para análisis de trazas orgánicas con una pureza > 99,0% (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).

El ácido fosfórico empleado (99% de pureza) para generar el CO₂ enriquecido fue también suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louise, USA).

IV Resultados y Discusión

IV.1 CAPÍTULO 1

Modificación de un Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (GC-IRMS) para la aplicación de la Dilución Isotópica en Línea de Carbono

La Dilución Isotópica en línea de carbono es una metodología relativamente reciente orientada a la búsqueda constante de un detector genérico en cromatografía de gases que permita la cuantificación absoluta de compuestos orgánicos sin la necesidad de estándares específicos para cada compuesto ni la realización de calibrados.

Para su aplicación fue necesario un gran esfuerzo inicial por la labor de desarrollo instrumental y puesta a punto de la metodología. No sólo fue posible la cuantificación absoluta de los compuestos orgánicos estudiados (alcanos, BTEX, ésteres) y su aplicación a muestras reales, sino que además se observó que el método desarrollado constituye una herramienta extraordinariamente útil para el estudio cuantitativo de etapas de preparación de muestra, como lo es la microextracción en fase sólida.

La extensión de la metodología a un mayor número de compuestos orgánicos permitirá definir el detector desarrollado como el primer detector verdaderamente genérico y universal para cromatografía de gases.

A pesar de los grandes logros conseguidos, las características instrumentales del prototipo original desarrollado no fueron lo suficientemente adecuadas para la

cuantificación de compuestos orgánicos con determinadas propiedades físico químicas y dado que se trata de un prototipo, no cuenta con la robustez y automatización necesaria para su aplicación en análisis de rutina. Puesto que las principales limitaciones de la metodología se encuentran en la parte instrumental, el objetivo de este primer capítulo será la búsqueda de la instrumentación adecuada que permita la extensión del rango de compuestos orgánicos aptos para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono por cromatografía de gases.

A continuación se detallará el prototipo desarrollado inicialmente con el fin de mostrar las características que debe ofrecer la instrumentación elegida para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. Además, esta información resultará imprescindible para dar a conocer las principales limitaciones de la instrumentación existente.

IV.1.1 PROTOTIPO INSTRUMENTAL GC-COMBUSTIÓN-(Q)-MS PARA LA APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA

El sistema se instaló sobre un GC-MS comercial consistente en un cromatógrafo de gases con inyector split/splitless y un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo. La Figura 12 muestra un esquema del montaje instrumental desarrollado, mostrando las distintas partes del sistema.

Como se puede apreciar, se realizaron tres modificaciones fundamentales para posibilitar la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. La primera modificación y pieza clave del desarrollo instrumental fue la *interfase de combustión* localizada tras la elución de los compuestos orgánicos del sistema cromatográfico. Esta interfase consta de un tubo cerámico de 40 cm x 3 mm de diámetro externo y 0,5 mm de interno, relleno en su parte central con hilos de cobre y platino. Este tubo alcanza altas temperaturas gracias a una resistencia encargada de calentarlo. La temperatura se reguló por medio de un controlador externo y el conjunto se aisló convenientemente debido a las altas temperaturas empleadas.

La principal función de la interfase de combustión es la oxidación cuantitativa de los compuestos orgánicos a dióxido de carbono. En este paso se consigue una

respuesta instrumental homogénea para los distintos analitos, dado que la única especie química que finalmente se detecta es el CO_2 . La intensidad de la señal para cada analito dependerá por tanto de su concentración y del número de carbonos que posea, pero no de su estructura química, requisito imprescindible para la aplicación de la dilución isotópica en línea con fines cuantitativos.

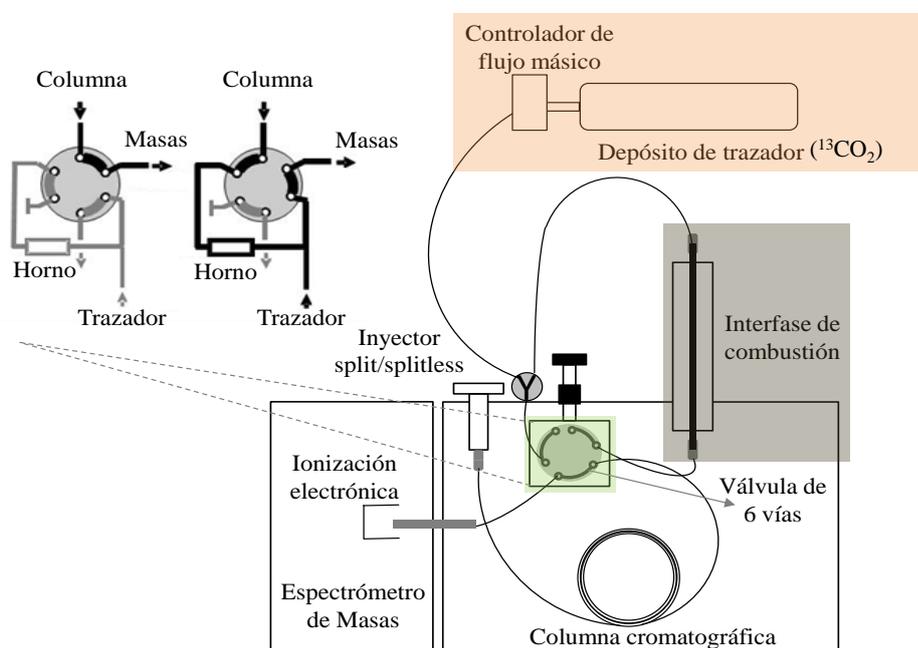


Figura 12. Esquema del primer prototipo instrumental desarrollado GC-Combustión-(Q)MS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono.

Para que la reacción de oxidación tenga lugar, el relleno de cobre del tubo de combustión tiene que ser oxidado previamente a óxido de cobre. Para ello se hizo pasar a través del tubo un flujo de oxígeno de aproximadamente 1 mL/min durante 4 ó 5 horas manteniendo la interfase a una temperatura de 500°C . El óxido de cobre actúa como donador de oxígeno en la reacción de combustión, mientras que el platino actúa como catalizador de la misma. Para una conversión cuantitativa a CO_2 , la interfase tuvo que calentarse a una temperatura óptima. Como consecuencia de la reacción de oxidación, el óxido de cobre se reduce a cobre elemental, por lo que el reactor de combustión tiene que ser reoxidado periódicamente.

Otro de los requisitos imprescindibles para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea es la **adición de un trazador** genérico enriquecido isotópicamente. Como trazador isotópico se empleó CO₂ enriquecido en ¹³C con el fin de obtener una respuesta instrumental homogénea tanto para los diferentes compuestos de interés, transformados ahora en ¹²CO₂, como para el trazador enriquecido, ¹³CO₂. La mezcla del flujo de trazador con el flujo procedente de la cámara de combustión se realizó a través de un conector en Y de acero inoxidable antes de su paso al espectrómetro de masas. De esta manera el equilibrio isotópico entre ambas especies se alcanza antes de la entrada en la fuente de ionización, lo que posibilitó la cuantificación mediante Dilución Isotópica en línea utilizando un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica.

El sistema diseñado para la introducción continua y constante del flujo de trazador, así como la generación del mismo, se ha explicado brevemente en la parte experimental de la presente Tesis Doctoral dado que se empleó el mismo dispositivo para la adición.

La última modificación realizada consistió en la introducción en el sistema de una **válvula manual para gases de dos posiciones y seis vías** fabricada en acero inoxidable y, capaz de trabajar a temperaturas de hasta 350°C. Esta válvula cumple dos funciones principales. Por un lado, la válvula evita que el disolvente de la muestra inyectada llegue a la interfase de combustión. La entrada de gran cantidad de materia orgánica al reactor reduce la vida útil del mismo y dependiendo del disolvente utilizado puede llegar incluso a bloquearlo de manera irreversible. Por otro lado, la válvula permite dirigir el flujo procedente de la columna cromatográfica bien directamente hacia el espectrómetro de masas, actuando como un GC-MS convencional, o bien hacia la interfase de combustión para la cuantificación de los compuestos mediante Dilución Isotópica en línea. Esta modificación ofreció al sistema una gran flexibilidad al no sacrificar la capacidad de elucidación estructural característica de la instrumentación GC-MS. Además el aspecto cualitativo es importante ya que se puede comprobar la pureza del pico cromatográfico.

IV.1.1.1 Procedimiento experimental GC-combustión-(Q) MS con Dilución Isotópica en línea de carbono

Puesto que el procedimiento general de cuantificación mediante dilución isotópica en línea de carbono ya ha sido descrito en la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, en este apartado sólo se hará referencia al procedimiento experimental, desde la inyección de la muestra hasta la medida de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, con el fin de abordar de manera global tanto las modificaciones instrumentales como las consideraciones analíticas tenidas en cuenta para su aplicación.

La inyección de la muestra en el sistema cromatográfico se realizó de manera manual a través de un inyector convencional en caliente split/splitless. La configuración inicial de la válvula de 2 posiciones en el momento de la inyección dirige el flujo procedente de la columna cromatográfica hacia el espectrómetro de masas con el fin de evitar el paso del disolvente hacia el horno de combustión. Tras el tiempo necesario para la eliminación del disolvente, un giro manual de la válvula redirecciona los compuestos eluidos de la columna cromatográfica hacia el horno de combustión donde se transforman cuantitativamente en CO_2 y H_2O . El flujo del trazador enriquecido, $^{13}\text{CO}_2$, suministrado de manera continua y constante, se mezcla con los gases producidos tras la combustión, produciéndose el equilibrio isotópico requerido $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ antes de la entrada al espectrómetro de masas. La molécula de CO_2 se ioniza en la fuente de ionización electrónica formando las especies $^{12}\text{CO}_2^+$ y $^{13}\text{CO}_2^+$, las cuales son detectadas a las masas 44 y 45 a través de la selección de la Monitorización de Iones Seleccionados (SIM). El tiempo de integración fue optimizado para obtener tanto una buena precisión en la medida de la relación, como perfiles de pico bien definidos. La relación medida de estas dos señales a m/z 44 y m/z 45 es prácticamente equivalente a la relación $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, ya que la influencia de la composición isotópica del oxígeno natural en la molécula de CO_2 se consideró despreciable.

IV.1.1.2 Limitaciones instrumentales del prototipo GC-C-(Q)-MS para el desarrollo de aplicaciones mediante Dilución Isotópica en línea de carbono

La principal limitación existente en los procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono está relacionada con la pérdida de sustancia antes del equilibrio

isotópico entre el $^{12}\text{CO}_2$ natural procedente de los compuestos de la muestra y el $^{13}\text{CO}_2$ procedente del trazador enriquecido. Cualquier pérdida de sustancia durante la preparación de muestra o efectos de discriminación durante las diferentes etapas del análisis no serán corregidas por el trazador antes de que el equilibrio isotópico tenga lugar. Esta limitación será tenida en cuenta en cada una de las etapas del análisis GC-Combustión-(Q) MS.

IV.1.1.2.1 Inyector

El equipo GC-MS comercial está equipado con un inyector convencional split/splitless con un diseño especial que mantiene el septum a una temperatura relativamente baja. Este diseño no requiere purga del septum y minimiza la discriminación de los compuestos orgánicos más volátiles en el puerto de inyección. A pesar de que el inyector split/splitless es uno de los inyectores más utilizados en cromatografía de gases por su sencillez, robustez y fácil manejo, es el inyector que da lugar a una mayor discriminación de los compuestos en la etapa de inyección. Tal discriminación afectará a la exactitud de los resultados tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono en muestras constituidas por compuestos con un amplio rango de puntos de ebullición, ya que pérdidas en el inyector no serán corregidas. Para un correcto uso de este inyector split/splitless es necesario llegar a una situación de compromiso, donde la temperatura sea lo suficientemente elevada como para minimizar la pérdida de los compuestos más pesados de la muestra, pero sin provocar la discriminación de los más volátiles. Aun así, cuando la diferencia en los puntos de ebullición de los compuestos es muy amplia, la discriminación será inevitable [73].

Por lo tanto, el inyector split/splitless del prototipo instrumental desarrollado no es el más adecuado para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, ya que evita la extensión de la metodología a ciertas mezclas de compuestos orgánicos.

Por otro lado, la inyección de la muestra se realizó de manera manual. Este tipo de inyección da lugar a una gran variabilidad en el volumen inyectado, ocasionando una baja reproducibilidad de la medida. Los pequeños volúmenes de muestra inyectados en cromatografía de gases (1-2 μL) provocan que pequeñas variaciones en el volumen originen grandes errores en la cuantificación. Sin embargo, el uso

de un patrón interno para la calibración del flujo del trazador enriquecido en procedimientos de Dilución Isotópica en línea corrige la variabilidad en el volumen de muestra inyectado. De esta manera, la única limitación de la inyección manual es la disminución del rendimiento analítico del sistema.

IV.1.1.2.2 Horno de combustión

Como ya se ha comentado, el reactor utilizado para la oxidación de los compuestos orgánicos a CO₂ está formado por un tubo cerámico relleno de hilos de Cu y Pt. Tras la oxidación del reactor, el Cu, transformado en CuO, actúa como donador de oxígeno, y tras el paso de los compuestos orgánicos el cobre recupera su forma original disminuyendo la superficie de oxidación del reactor. Por lo tanto, son necesarios procesos de reoxidación para regenerar su capacidad oxidativa.

La temperatura óptima de trabajo para este tipo de reactores rellenos con hilos de Cu es de 800-850°C. A temperaturas superiores se produce un sangrado continuo de oxígeno perdiendo la capacidad oxidativa más rápidamente. Esta limitación en la temperatura provoca que el reactor no tenga la suficiente eficacia de oxidación para algunos compuestos orgánicos más complejos, dando lugar a procesos de combustión no cuantitativa. Cabe recordar que el reactor de combustión debe asegurar la conversión cuantitativa de los compuestos orgánicos que pasan a su través para poder aplicar procedimientos de Dilución Isotópica en línea, ya que pérdidas de sustancia anteriores al equilibrio isotópico con el trazador no serán corregidas. Por lo tanto, la eficacia oxidativa del reactor utilizado para la combustión es limitante para la cuantificación de compuestos orgánicos complejos mediante procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono.

En cuanto a la parte operacional, el proceso de oxidación y sucesivas reoxidaciones del reactor se realizaron de manera manual. Tras la desconexión de los capilares de la válvula de dos posiciones, que conectan el horno de combustión con el sistema, se hace pasar un flujo de oxígeno de aproximadamente 1 mL/min controlado por un regulador de flujo externo. Este proceso tiene lugar a una temperatura elevada y optimizada de 500°C, durante un tiempo determinado (4 ó 5 horas), para que la oxidación del cobre tenga lugar. Una vez finalizada la oxidación es necesario un paso de eliminación del exceso de oxígeno para evitar su entrada al espectrómetro de masas. Para ello, se conecta el horno al sistema por uno de sus extremos, y se hace pasar un flujo de helio durante un tiempo

determinado. Una vez finalizado el proceso de venteo, se conecta el horno al sistema por ambos extremos.

Este proceso aparentemente sencillo, es necesario realizarlo con precaución. Debido a la implementación de la válvula de 6 vías existe un gran número de capilares de sílice en el interior del horno cromatográfico. Los procesos de calentamiento y enfriamiento del horno aumentan la fragilidad de los capilares y, la manipulación de las conexiones puede resultar estresante para el usuario.

Por otro lado, para la introducción del capilar por el extremo del reactor que se encuentra en el interior del horno cromatográfico, es necesario quemar el recubrimiento polimérico del capilar y evitar así su combustión en el interior del reactor. La sílice fundida al descubierto presenta una gran fragilidad y su introducción en el reactor presenta cierta complejidad.

IV.1.1.2.3 Válvula de dos posiciones y seis vías

La válvula implementada en el sistema permite el cambio en el modo de operación ofreciendo la posibilidad de trabajar tanto en GC-MS convencional como en GC-Combustión-MS, además de evitar el paso del disolvente al horno de combustión durante los primeros minutos del análisis.

Esta válvula presenta dos limitaciones importantes. Por un lado, el cambio manual de la misma obliga al usuario a estar presente en el momento del análisis impidiendo la automatización del sistema. Por otro lado, y de mayor importancia analítica, el gran número de conexiones necesarias en el desarrollo instrumental provoca pequeñas entradas de aire por cada conexión implementada. Esto dio lugar a un fondo relativamente constante y significativo a m/z 44 disminuyendo por tanto la sensibilidad del método. Sin embargo, cabe indicar que esta contribución de aire no afectó ni a la exactitud ni a la precisión de la cuantificación.

Desde el punto de vista operacional, los procesos de calentamiento y enfriamiento del horno cromatográfico sellan las férulas utilizadas en cada una de las conexiones de la válvula. Este proceso de sellado es necesario para evitar la entrada de gran cantidad de aire al sistema, y está recomendado en cromatografía de gases siempre que se utilicen este tipo de conexiones. Sin embargo, en el

prototipo instrumental desarrollado es necesario retirar estas férulas de la válvula para poder realizar los procesos de oxidación y reoxidación del horno de combustión y los cambios de la columna cromatográfica. Estas férulas, además de sellar el capilar para evitar la entrada de aire, se quedan selladas en el orificio de la válvula y su retirada y reemplazamiento resulta ser un proceso arduo, siendo incluso a veces necesario desmontar la válvula para una manipulación más cómoda. Una vez retiradas es necesario comprobar que no exista ninguna partícula de grafito que impida el paso del flujo o produzca el rallado del rotor interno de la válvula que puede conducir posteriormente a fugas e interconexiones entre diferentes posiciones.

IV.1.1.2.4 Fuente de ionización

Los productos de combustión generados tras el paso de los compuestos puramente orgánicos por el reactor son vapor de agua y dióxido de carbono (y otros minoritarios como NOx y SOx en el caso de que los compuestos contengan N y S). Tras la mezcla con el trazador de carbono se produce el equilibrio isotópico entre el $^{12}\text{CO}_2$ natural procedente de los compuestos de la muestra y el $^{13}\text{CO}_2$ procedente del trazador. La mezcla resultante pasa al espectrómetro de masas donde se miden las señales de los iones formados, $^{12}\text{CO}_2^+$ y $^{13}\text{CO}_2^+$, para m/z 44 y m/z 45 respectivamente.

Sin embargo, la presencia de agua en la fuente de ionización da lugar a reacciones de transferencia de protones que generan interferencias isobáricas a m/z 45. El ion $\text{H}^{12}\text{CO}_2^+$, formado por la protonación del ión $^{12}\text{CO}_2^+$, puede interferir en la medida del ión $^{13}\text{CO}_2^+$ durante la elución del pico cromatográfico. Este tipo de interferencias no se consiguieron resolver con el prototipo instrumental desarrollado, pudiendo producir errores por defecto en la cuantificación de los compuestos mediante Dilución Isotópica en línea de carbono. La introducción de un sistema para la eliminación del agua tras alcanzar el equilibrio isotópico podría ser una posible solución para minimizar este efecto.

Ahora bien, es importante resaltar que la influencia de este efecto sobre la exactitud de los resultados tras la aplicación de la Dilución Isotópica de carbono, donde un trazador enriquecido isotópicamente es continuamente añadido, es prácticamente insignificante. Por ello, la introducción de un sistema para la

eliminación del agua no se consideraría una mejora realmente necesaria sobre el prototipo desarrollado.

IV.1.1.2.5 Analizador de masas y Detección

El espectrómetro de masas empleado en el prototipo instrumental desarrollado fue de tipo cuadrupolo. Hoy en día, este tipo de analizador es uno de los más extendidos para análisis de rutina debido a su relativa sencillez, robustez y bajo coste. Además, presenta una gran reproducibilidad, una buena sensibilidad y una alta velocidad de barrido. Sin embargo, debido al carácter secuencial de la medida existen dos factores que hay que tener en cuenta en la medida de relaciones isotópicas cuando se utilizan señales transitorias, como lo son las señales obtenidas por cromatografía. El rápido cambio de la intensidad de la señal durante el pico cromatográfico provoca cierto desfase espectral haciendo que las relaciones isotópicas no sean constantes durante el perfil cromatográfico, lo cual se traduce en una pérdida de exactitud en el resultado final. Este desfase espectral no afecta a la exactitud del resultado final cuando se emplean metodologías de dilución isotópica en línea.

Por otra parte, se ha observado que existe una estrecha relación entre el tiempo de integración y la capacidad de seguir los perfiles de pico de manera exacta. Por lo tanto, es necesario llegar a una situación de compromiso para el tiempo de integración, de manera que se pueda obtener un buen perfil de pico sin observar desviaciones espectrales. Como ya se ha comentado anteriormente, fue necesario optimizar el tiempo de integración para obtener tanto una buena precisión en la medida de la relación como perfiles de pico bien definidos.

IV.1.1.3 Conclusiones

Tras una visión global del prototipo instrumental desarrollado para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, se puede concluir que el desarrollo a corto plazo de nuevas aplicaciones con la instrumentación disponible era muy complicado. A pesar de que dicha instrumentación desarrollada dio lugar al nacimiento de una nueva modalidad de Dilución isotópica logrando el desarrollo del primer detector verdaderamente genérico para la cuantificación de compuestos orgánicos (se aplicó a la cuantificación de estándares de alcanos, ésteres y BTEX, además de su aplicación a muestras reales) es necesaria la búsqueda de una

instrumentación capaz de resolver los hándicaps encontrados en el prototipo instrumental desarrollado y que permita extender aún más el campo de aplicación de la metodología.

IV.1.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (GC-IRMS)

Los instrumentos IRMS están especialmente diseñados para medir de manera precisa las pequeñas variaciones existentes en las abundancias naturales de los isótopos estables de elementos ligeros como carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), azufre ($^{66}\text{S}/^{64}\text{S}$), hidrógeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$) y oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Los isótopos estables de elementos ligeros tienen la característica común de que sus abundancias relativas varían de manera medible en los materiales naturales como resultado de procesos de fraccionamiento, gobernados por efectos cinéticos o termodinámicos donde uno de los isótopos estables se enriquece o empobrece respecto al otro. Estas variaciones medibles se pueden emplear para la diferenciación entre muestras que poseen una composición química idéntica en una amplia variedad de materiales, proporcionando información inalcanzable por otras técnicas.

Los instrumentos IRMS se desarrollaron hace más de 75 años. Sin embargo, no se adaptaron como detectores para cromatografía de gases hasta los años 70, y no fue hasta 1988 cuando se comercializó el primer GC-IRMS. Una mejora más tardía sobre el diseño instrumental fue la incorporación de un detector de ionización de llama (FID), que permitió la cuantificación de los analitos de manera simultánea al análisis isotópico. Posteriormente, se incorporaron otros detectores utilizados en cromatografía de gases que permitían la realización de análisis específicos del compuesto. La introducción de un MS convencional proporcionó la ventaja adicional de elucidación estructural pudiendo comprobar la pureza del pico cromatográfico para su análisis por IRMS. Para incorporar estos detectores al sistema GC-IRMS es necesaria una división del flujo tras la separación cromatográfica de manera que una pequeña fracción pasa al detector estándar, mientras que el resto del eluyente continúa hacia el sistema de monitorización isotópica.

El análisis isotópico de los compuestos orgánicos de una mezcla compleja mediante GC-IRMS proporcionó información adicional con un alto poder de

discriminación, lo que despertó el interés del estudio de las relaciones isotópicas. El gran avance que supuso la aparición de una instrumentación automatizada junto con la apreciación del potencial de la técnica para proporcionar una firma isotópica única para cada sustancia, así como el marcaje con isótopos estables para estudios de metabolismo, provocó que la instrumentación GC-IRMS, hasta entonces casi exclusiva de biogeoquímicos y de las industrias del petróleo y de los perfumes, apareciera en una amplia sección de las ciencias analíticas. Sin embargo, la detección de relaciones isotópicas de alta precisión en GC sigue siendo un área especializada y se utiliza tan solo en unos cientos de laboratorios en el mundo.

Las medidas IRMS de alta precisión requieren la conversión de los analitos a una forma molecular común antes de su entrada al espectrómetro de masas. La razón por la que es necesaria esta transformación es simple. Todas las moléculas orgánicas poseen dos o más elementos con abundancias isotópicas variantes. La composición isotópica de los diferentes elementos que constituyen una molécula puede variar de manera independiente dando lugar a diferentes isotopómeros con una masa nominal muy próxima pero con diferente composición isotópica. Por ejemplo, una molécula que esté constituida por carbono e hidrógeno puede tener una misma masa nominal debido a la contribución del ^{13}C o ^2H . Los instrumentos IRMS no tienen la suficiente resolución de masa para distinguir los isotopómeros existentes de una misma molécula debido a la alta precisión requerida en la medida de la relación isotópica. Para alcanzar esta alta precisión es necesario generar una gran corriente de iones y evitar así los problemas de precisión asociados a la estadística de conteo. Por lo tanto, cuanto mayor sea la ventana de masas mayor número de iones llegará al detector, sacrificando de esta manera la resolución de masa por la precisión de la medida. Los instrumentos IRMS suelen tener una resolución de masa de una unidad. Esto implica que la corriente de iones que llega al detector para una masa concreta estará formada por los diferentes isotopómeros de la molécula con una diferencia de una unidad de masa. Por lo tanto, la medida de la relación de masas moleculares puede estar afectada por la contribución de la variación isotópica de los diferentes elementos constituyentes de la molécula dando lugar a medidas poco exactas [74]. Además, algunas especies orgánicas pueden participar en reacciones de intercambio de protones en la fuente de ionización del MS dando lugar a una gran confusión. Por otro lado, la

ionización y transmisión de las moléculas en el espectrómetro de masas están acompañadas de efectos isotópicos sustanciales que dependen de la forma molecular del compuesto.

Para la transformación de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica en una forma molecular común, la instrumentación GC-IRMS dispone de dos interfases de reacción introducidas entre el GC y el IRMS. La elección de una u otra dependerá del elemento de interés. Para la medida de las relaciones isotópicas de C, N y S se emplea la interfase de combustión, donde los analitos se transforman en los gases simples CO₂, N₂ y SO₂, respectivamente, mientras que la medida de las relaciones isotópicas de H y O hace uso de la interfase de pirolisis, donde los analitos se convierten en los gases simples H₂ y CO.

Debido a que el interés de esta instrumentación especializada reside en la transformación de los compuestos orgánicos a CO₂, para la posterior aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, tan sólo nos centraremos en los principios y desarrollo de las interfases de combustión para la medida de las relaciones isotópicas de carbono.

IV.1.2.1 Procedimiento general para la medida de alta precisión de la relación ¹³C/¹²C mediante GC-IRMS

Todos los procedimientos para la medida de la abundancia de isótopos estables con muy alta exactitud y precisión tienen tres elementos comunes. Primero, los analitos se convierten en una forma molecular simple que posea pocos isotopólogos. En este caso, tras la inyección de los analitos en el sistema cromatográfico, el eluyente de la columna al completo pasa a la interfase de combustión donde se transforma en CO₂. Esta especie gaseosa posee un número pequeño de isotopólogos donde la mayor contribución se encuentra a las masas 44, 45 y 46. En la Tabla 6 se encuentran recogidos los isotopólogos existentes para la molécula de CO₂ y su contribución a las diferentes masas.

Tabla 6. Isotopólogos de la molécula de CO₂ y contribución de cada uno de ellos a las masas 44, 45 y 46, características de los análisis GC-IRMS.

Especie isotópica	Masa molecular	Abundancia isotópica	Abundancia por masa	Contribución por masa %
12C16O16O	44	0,98458	0.98458	100
13C16O16O	45	0,01073		93,5
12C16O17O	45	0,00075	0.01148	6,5
12C16O18O	46	0,00405		99,795
13C16O17O	46	8,18E-06		0,202
12C17O17O	46	1,43E-07	0.00406	0,003
13C16O18O	47	4,41E-05		
12C17O18O	47	1,54E-06		
13C17O17O	47	1,56E-09	0.00005	
12C18O18O	48	4,15E-06		
13C17O18O	48	1,68E-08	4,17E-06	
13C18O18O	49	4,53E-08	4,53E-08	

El agua aparece como subproducto mayoritario de la reacción de combustión y es necesario eliminarla antes de su entrada al IRMS, para evitar reacciones de protonación en la fuente de ionización que puedan producir potenciales interferencias isobáricas a las masas medidas. El CO₂ procedente de la combustión viaja hasta el detector IRMS donde se produce la ionización a través de una fuente de ionización electrónica. Los iones generados pasan al analizador de masas de sector magnético que separa los iones según su relación masa/carga para finalmente ser detectados simultáneamente por copas de Faraday, posicionadas en el mismo plano focal del espectrómetro de masas, dando lugar a medidas de las relaciones isotópicas altamente precisas. Para el carbono hay tres copas de Faraday que detectan simultáneamente los isotopólogos mayoritarios del CO₂ a m/z 44, m/z 45 y m/z 46. Estas señales se registran para la obtención del cromatograma a las diferentes masas medidas. Se emplea un sistema de medidas diferenciales en el que la muestra y un estándar de abundancia isotópica conocida y relativa a un estándar internacional, se comparan repetidamente. Este sistema de medidas diferenciales desarrollado por primera vez por Urey en 1950, sigue

empleándose en las medidas isotópicas de alta precisión. La diferencia en las corrientes de iones entre la muestra y el estándar, que se encuentra en la misma forma química que los analitos (CO₂), es exactamente proporcional a la diferencia en sus relaciones isotópicas, permitiendo el cálculo preciso de la relación isotópica relativa.

Por convenio, la abundancia relativa de los isótopos estables está siempre referida al isótopo pesado y se emplea la notación delta para expresar los resultados. El valor delta es la diferencia relativa en la relación isotópica entre la muestra y un estándar, y se expresa en partes por mil. La ecuación [28] describe el cálculo del valor del delta de carbono, $\delta^{13}\text{C}$, a partir de las relaciones isotópicas medidas ($R^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para muestra (R_m) y estándar (R_s).

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_m - R_s}{R_s} \times 1000 \quad [28]$$

La notación delta tiene dos funciones principales. En primer lugar, la incertidumbre de una relación isotópica relativa siempre va a ser menor que la de una relación isotópica absoluta, y por tanto se puede alcanzar una mayor precisión en los resultados. Por otro lado, la notación delta permite observar los pequeños cambios en las relaciones isotópicas de manera sencilla al eliminar un gran número de cifras decimales que no varían. De esta manera, un compuesto orgánico con una relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de $0,01082 \pm 0,00008$ podría darse en notación delta respecto al estándar internacional ($R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,011224$) como $\delta^{13}\text{C} = -35,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$. Valores de delta positivos representan un enriquecimiento de los isótopos pesados frente al estándar internacional, elegido por su alto enriquecimiento en el isótopo más pesado, mientras que valores negativos representan un empobrecimiento de los isótopos pesados.

Por último, es importante resaltar la importancia de la corrección del ^{17}O para el paso de la relación medida 44/45 a la relación 13/12, necesaria para el cálculo de deltas de carbono cuando se requieren medidas de alta precisión en las relaciones isotópicas naturales de un compuesto. Esta corrección está basada en un algoritmo matemático aplicado a las medidas de CO₂ para corregir la contribución isotópica del oxígeno natural. Como se puede observar en la Tabla 6, mientras que m/z 44 está representada por un solo isotopómero, la contribución del isotopómero $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ contribuye aproximadamente en un 7% a la abundancia de la masa 45.

Es necesario por tanto aplicar una corrección que permita la transformación de la relación medida a la relación real. Estos algoritmos, que necesitan la señal medida a m/z 46 para poder ser aplicados, están incluidos en el software de los equipos comerciales y facilita enormemente los cálculos. Tanto la automatización de la instrumentación como las mejoras en el software, que permiten obtener resultados finales de alta precisión sin la necesidad de optimizaciones ni cálculos adicionales, han provocado el gran avance producido en el número de aplicaciones de esta técnica tan especializada. Sin embargo, es necesario prestar una especial atención a las diferentes etapas del análisis para evitar cometer errores en la determinación. Todos los pasos de preparación de muestra y de análisis deben ser cuidadosamente optimizados y revisados para evitar efectos potenciales de discriminación de masa y evitar el fraccionamiento isotópico de los compuestos de interés.

Dado que esta instrumentación GC-IRMS permite la combustión de los compuestos eluidos de la columna cromatográfica a CO_2 de manera continua, constante y automatizada para la posterior medida de la relación isotópica de interés con alta precisión y exactitud en el espectrómetro de masas, abordaremos a continuación las diferentes etapas del análisis con el fin de encontrar las ventajas y limitaciones de esta instrumentación respecto al prototipo instrumental desarrollado GC-Combustión-(Q)-MS utilizado para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. Además, puesto que ambas metodologías requieren la conversión de los compuestos orgánicos a CO_2 , son consideradas técnicas no selectivas ya que toda la materia orgánica es detectada. Esta pérdida de selectividad supone un problema para su aplicación en muestras complejas donde todos los compuestos orgánicos serán detectados aunque tan sólo una mínima parte requieran ser analizados. Esta limitación está siendo abordada en las diferentes aplicaciones desarrolladas en GC-IRMS mediante la mejora en la resolución cromatográfica. Estas mejoras pueden ser de gran ayuda también en el análisis mediante Dilución Isotópica en línea de carbono para la cuantificación de compuestos orgánicos en muestras complejas.

IV.1.2.2 Sistemas de introducción de muestra

Al igual que en cualquier cromatógrafo de gases, existe una gran variedad de posibilidades para la introducción de la muestra en el sistema GC-IRMS. La

naturaleza de la muestra, las propiedades físico-químicas de los analitos y la concentración de los mismos son algunos de los parámetros a tener en cuenta para la elección del sistema de introducción de muestra más adecuado. Pero sin duda, el aspecto más importante a considerar para garantizar la calidad de la relación isotópica medida es una inyección de la muestra sin fraccionamiento. Para ello, es necesario una transferencia cuantitativa de todos los compuestos de la muestra desde el momento de la inyección hasta la entrada en la columna analítica. De lo contrario, los procesos de fraccionamiento que pueden tener lugar pueden traer consigo la aparición de efectos isotópicos durante la vaporización y difusión de la muestra que falsearán la medida de la relación isotópica.

Debido a esta necesidad de una inyección de la muestra sin fraccionamiento, en la actualidad los equipos comerciales GC-IRMS ofrecen una gran variedad de inyectores y modos de inyección integrados en el sistema o con posibilidades para su integración. De esta manera se asegura una transferencia cuantitativa de los analitos durante la etapa de inyección para un gran número de aplicaciones. La inyección split/splitless, on-column, vaporización con temperatura programable (PTV), microextracción en fase sólida y purga y trampa son las más comunes y utilizadas en este tipo de instrumentación. Todas ellas están controladas por el software de manera automatizada facilitando enormemente su optimización.

Los métodos de inyección splitless, on column y vaporización con temperatura programable (PTV) han sido todos ellos ampliamente utilizados con éxito. Sin embargo, existe alguna ambigüedad con el fraccionamiento isotópico asociado a la inyección split. Varias publicaciones no han encontrado un fraccionamiento significativo a cualquier relación de split, mientras que otras han citado problemas para una relación de split en el inyector menor de 20:1. Por otro lado, la microextracción en fase sólida ha demostrado ser una técnica de preconcentración e inyección adecuada para compuestos orgánicos solubles en agua, aunque existe un pequeño fraccionamiento isotópico asociado al proceso de adsorción [75]. Por último, el sistema de preconcentración purga y trampa es el que ha proporcionado los mejores límites de detección [76].

IV.1.2.3 Cromatógrafo de gases

Los principios fundamentales del cromatógrafo de gases no se diferencian de los utilizados en otras técnicas analíticas como pueden ser GC-MS o GC-FID.

IV.1.2.3.1 Resolución

La principal función del GC reside en proporcionar una resolución en línea de base entre los distintos compuestos de interés presentes en la muestra. La medida exacta de la composición isotópica en un pico cromatográfico requiere la integración del pico completo sin compuestos interferentes que coeluyan con los analitos. Debido a que se trata de una técnica no selectiva donde toda la materia orgánica que eluye de la columna cromatográfica va a ser detectada, la presencia de impurezas en un pico cromatográfico no podrá ser detectada. Desgraciadamente, la existencia de un gran número de compuestos solapados en muestras con matrices complejas, como puede ser una muestra medioambiental, es habitual. Se han propuesto procedimientos matemáticos para la resolución de los picos solapados obteniendo resultados altamente satisfactorios [77] [78]. Sin embargo, la incorporación en los softwares comerciales todavía no ha tenido lugar.

Además, el problema de la falta de resolución cromatográfica se agrava por un lado por la presencia de los capilares empleados en la interfase de combustión y por otro lado por el propio proceso de conversión química que tiende a degradar la forma del pico induciendo a la aparición de colas [79]. Estos efectos han sido, y están siendo, muy estudiados con el fin de disminuir el ensanchamiento producido en los picos. Desgraciadamente, no ha sido posible alcanzar aún la resolución obtenida en instrumentos GC-MS convencionales que pueda conducir a una mayor pureza de pico cromatográfica (menor solapamiento).

A pesar de los problemas encontrados para una resolución de picos a línea de base en muestras complejas, las condiciones cromatográficas utilizadas en la mayoría de los sistemas GC-Combustión-IRMS son todavía bastante rudimentarias, donde lo más usual es emplear una sola columna capilar de 30 o 60 m . La cromatografía bidimensional para el cálculo de relaciones isotópicas con este tipo de instrumentación podría mejorar enormemente el problema de resolución encontrado. Sin embargo, el uso de métodos GCxGC parece inadecuado debido a que se requieren tiempos de respuesta del detector muy rápidos [80]. Existen algunas publicaciones donde se han desarrollado sistemas que permiten la aplicación de la cromatografía en dos dimensiones con resultados altamente satisfactorios [81] [82]. Sin embargo, han sido necesarias algunas modificaciones

sobre la instrumentación original para poder lograrlo. En primer lugar, es necesaria la introducción de un sistema criogénico modulador entre las dos columnas cromatográficas, que permita el paso de los analitos de una columna a otra de manera controlada y focalizada. En segundo lugar, el diseño de nuevos reactores de combustión de menores dimensiones y diferentes materiales oxidantes que ofrezcan un volumen muerto menor y por tanto, un menor ensanchamiento de los picos. En tercer lugar, es necesario reemplazar el sistema de Nafion normalmente utilizado en este tipo de instrumentación para la eliminación del agua de los gases de combustión. La inserción de 10 cm del capilar de transferencia en una trampa de agua con hielo seco y acetona a -78°C , disminuye significativamente el ensanchamiento característico de este proceso [82]. Por último, es imprescindible modificar los amplificadores del detector a través de una nueva configuración de las resistencias y condensadores para permitir una respuesta más rápida del detector, así como el desarrollo de un procesador de datos que permita registrar la señal más rápidamente. Estos nuevos progresos en GC-IRMS están favoreciendo el desarrollo instrumental de nuevos sistemas comerciales que permiten la aplicación de la cromatografía bidimensional de manera automatizada, lo que supone una nueva era para esta instrumentación relativamente joven.

IV.1.2.3.2 Efectos isotópicos cromatográficos

Como ya se ha comentado, todas las etapas del análisis GC-IRMS deben proporcionar una transmisión de los analitos de la muestra sin que tengan lugar procesos de fraccionamiento. El paso de los analitos por la columna cromatográfica es un proceso cuantitativo. Sin embargo, existen efectos isotópicos que producen una pequeña desviación en el tiempo de las masas medidas simultáneamente, y que es necesario corregir para mantener la alta exactitud y precisión de los resultados. Debido a estos efectos isotópicos, la señal del isotopómero más pesado precede a la señal del isotopómero más ligero con una diferencia aproximada de 150 ms, variando en función de la naturaleza del compuesto, la polaridad de la fase estacionaria, la temperatura de la columna y el flujo del gas portador. Este comportamiento es contrario al esperado por un efecto en la presión de vapor, ya que el isotopómero más ligero tendría que eluir más rápidamente de la columna cromatográfica debido a su presión de vapor más alta y por tanto, a un punto de ebullición más bajo respecto al isotopómero más

pesado. Sin embargo, el efecto isotópico observado se debe a las diferencias entre las interacciones soluto-fase estacionaria, dominadas por fuerzas de dispersión de Van der Waals, que permiten una elución más rápida del isotopómero más pesado. Este isotopómero presenta un volumen molar más bajo. La razón para el decrecimiento en el volumen molar es que el incremento en la fuerza del enlace $^{13}\text{C-H}$ provoca una disminución de la longitud del mismo y, en menor grado, de los enlaces $^{12}\text{C-}^{13}\text{C}$, $^{12}\text{C-H}$ y $^{12}\text{C-}^{12}\text{C}$, respectivamente [83].

Es necesario, por tanto, tener en cuenta este efecto isotópico durante la etapa cromatográfica, ya que la pérdida de información debido a ventanas de tiempo inadecuadas para la detección del pico, dará lugar a la integración parcial del pico y comprometerá severamente la calidad de la relación isotópica medida.

IV.1.2.4 Interfase de combustión

El mayor problema encontrado en el acoplamiento del GC con el IRMS fue el desarrollo de interfases de reacción adecuadas que proporcionaran una conversión continua y cuantitativa de los analitos manteniendo la resolución del pico cromatográfico. Estas interfases son uno de los aspectos más especializados de los sistemas GC-IRMS y sigue siendo un foco de desarrollo en curso.

La interfase entre el GC y el IRMS debe cumplir cuatro objetivos fundamentales: i) convertir cuantitativamente los analitos en una forma molecular común necesaria para la medida, ii) eliminar los productos de reacción indeseables de la corriente gaseosa generada iii) evitar que el pico de disolvente alcance el reactor de conversión y iv) amortiguar las fluctuaciones de presión relativamente grandes que ocurren cuando los picos orgánicos discretos se combustionan o pirolizan. Estos requisitos deben cumplirse a la vez que se mantiene la resolución cromatográfica.

IV.1.2.4.1 Reactor de combustión

La combustión de las moléculas orgánicas a CO_2 puede ser rápida y cuantitativa a través de la interfase apropiada para el análisis isotópico de carbono. Las condiciones óptimas del reactor para alcanzar tanto una combustión completa como un largo tiempo de vida del reactor están sujetas a debate y varían con la química del analito. Las dos primeras consideraciones son la temperatura y el

poder de oxidación. Altas temperaturas permiten una combustión más rápida y cuantitativa pero también una pérdida rápida del poder de oxidación. Los óxidos de cobre y níquel son los oxidantes más comúnmente elegidos. El CuO es más reactivo a temperaturas por debajo de 800°C, mientras que el NiO comienza a ser favorable a temperaturas más altas. La diferencia surge de la dependencia de la temperatura con la presión parcial del oxígeno sobre estos reactivos. Una solución ampliamente aplicada es incluir tanto el CuO como el NiO en el mismo reactor junto con Pt como catalizador y trabajar entre 900-1030°C.

El O₂ se consume durante la combustión de los analitos y el sangrado de la columna, y los reactivos oxidantes deben ser regenerados. Esto debe realizarse periódicamente haciendo pasar un flujo de oxígeno a través del reactor.

El reactor de combustión es a menudo la principal fuente de ensanchamiento de los picos en GC-IRMS, y se ha dedicado un esfuerzo considerable a la optimización de su diseño. Dos aproximaciones son ahora comunes. La primera utiliza un tubo cerámico o de vidrio con un diámetro interno de 0.5 mm. Los hilos de metal reactivo (Cu, Ni y Pt) de 0.1 mm de diámetro, son enrollados juntos e introducidos en el tubo. El reactor se introduce en un tubo calentado a través de una resistencia, conectado por capilares de sílice fundida por cada uno de sus extremos y oxidado por la adición de O₂. Este diseño es el más duradero y el más fácil de montar pero produce un modesto ensanchamiento de los picos. El segundo diseño utiliza un solo capilar de sílice fundida con los hilos metálicos posicionados en el punto donde el capilar se calienta. Debido a la eliminación de conexiones y cambios en el diámetro interno este proceso no da lugar al ensanchamiento de picos. Sin embargo, resulta complejo de montar y se puede romper fácilmente ya que es necesario eliminar el recubrimiento de poliimida del capilar mediante su quemado.

IV.1.2.4.2 Eliminación de los productos de combustión interferentes

La combustión de las especies orgánicas produce H₂O como subproducto mayoritario y NO_x y SO_x como subproductos minoritarios si el N y el S están presentes en los compuestos de la muestra. Los óxidos de nitrógeno y de azufre son corrosivos en el espectrómetro de masas, pero de manera más importante, el NO₂⁺ es una interferencia isobárica con el ¹²C¹⁸O¹⁶O a m/z 46. La eliminación de estas especies se lleva a cabo por reducción sobre Cu elemental a 500-700°C a

través de un segundo reactor de reducción. Este paso no es necesario cuando los analitos no contienen N y/o S en su estructura. El agua también se debe reducir a una concentración baja debido a que puede participar en reacciones de transferencia de protones en la fuente de ionización del IRMS, produciendo la formación de $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^2\text{H}^+$ que interfiere de manera potencial con $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$ a m/z 45. La eliminación del agua de los gases de combustión se lleva a cabo a través de un desecador a contracorriente basado en una membrana permeable selectiva del fluoropolímero sulfonado Nafion. Aunque estos desecadores son más efectivos a temperaturas más bajas, el empleo del Nafion a temperatura ambiente ha resultado ser adecuado. También se suelen emplear ocasionalmente trampas de agua criogénicas que aunque requieren ser descongeladas periódicamente también eliminan otra fuente de ensanchamiento de los picos.

IV.1.2.4.3 Eliminación del disolvente

Los reactores de combustión están optimizados para recibir cantidades de analito a nivel de nanogramos. Permitir la entrada del disolvente en estos reactores da lugar al consumo del poder de oxidación y a una fluctuación en la presión que es a menudo suficiente para desestabilizar el circuito de protección en la fuente de ionización del IRMS. Las interfases GC-IRMS emplean por tanto un sistema para evitar la entrada del disolvente en la interfase. El método más común está basado en el uso de dos válvulas posicionadas antes y después del reactor. La apertura simultánea de ambas válvulas permite añadir un flujo de helio a través del reactor en sentido opuesto al eluyente de la columna cromatográfica y eliminarlo hacia el exterior. Este sistema se denomina comúnmente como Backflush (BF) y opera de manera automatizada. Este sistema también juega un papel importante en la regeneración del reactor de oxidación por la introducción de un flujo de oxígeno a contracorriente que pasa a través del reactor y es expulsado hacia el exterior a través de la válvula de BF posicionada antes del reactor de combustión.

Un segundo sistema desarrollado emplea una válvula que reemplaza el eluyente de la columna GC por una corriente de He limpio. Sin embargo, este método no ha sido ampliamente utilizado debido a problemas de mantenimiento de la válvula causados por los frecuentes ciclos de temperatura en el horno cromatográfico.

IV.1.2.4.4 Amortiguador de presión

La combustión de moléculas orgánicas de gran tamaño en especies de bajo peso molecular da lugar a un gran incremento en el volumen de gas. Si el pulso de presión generado en esta combustión alcanza la fuente de ionización del IRMS, se podría producir un cambio dinámico en el fraccionamiento isotópico que acompaña al proceso de ionización. Una comparación exacta entre la muestra y un estándar añadido de manera independiente y directa a la fuente de ionización se podría volver imposible. Para evitar esta situación, las interfases GC-IRMS incorporan un open split que proporciona un flujo constante al IRMS. En la práctica esto se traduce en la inserción de un pequeño capilar de 5 mm (0.11 mm de diámetro interno) a través de la línea de transferencia provocando una restricción del flujo. Esto provoca que el flujo que entra en el IRMS esté gobernado por la baja presión a través del capilar y que además sea constante. La introducción alternativa del flujo de muestra y el gas de trabajo en condiciones de presión prácticamente iguales permite las medidas altamente precisas y exactas de las relaciones isotópicas.

IV.1.2.5 Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas

Todos los IRMS emplean una fuente de ionización electrónica, un analizador de sector magnético y múltiples detectores de Faraday para la detección simultánea de las corrientes de iones. Este diseño permite maximizar la eficacia y transmisión de la ionización, proporcionando grandes y estables corrientes de iones que permiten una detección estable disminuyendo así la incertidumbre de la corriente medida.

Las fuentes de ionización elegidas en los instrumentos IRMS son típicamente “duras” con el fin de proporcionar una presión más alta en el volumen de ionización e incrementar así la eficacia de la misma. La energía de ionización para la medida de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es típicamente de 124 eV. Esta energía permite maximizar tanto la producción de iones moleculares como la linealidad de la relación isotópica medida. Los iones se extraen a través de potenciales relativamente altos, necesarios para minimizar las reacciones ión-molécula en la fuente de ionización y evitar así la dispersión del haz de iones generado. Todos los instrumentos modernos diseñados para GC-IRMS utilizan electroimanes para proporcionar un rango de masas de 1-80 amu a un voltaje de

aceleración de 3kV, donde los iones se separan según su relación masa/carga en el mismo plano focal. El diseño de estos instrumentos requiere un electroimán relativamente grande que mantiene la señal magnética tras retirar el campo que la ha inducido. Aunque los instrumentos IRMS son capaces de escanear a través de un rango de masas, el proceso es lento (<1 amu/s) y por ello siempre trabajan con un campo magnético constante para monitorizar un solo grupo de masas. La óptica iónica se elige para maximizar la transmisión de los iones y evitar fluctuaciones en la intensidad del haz iónico con pequeños cambios en el campo magnético.

La estabilidad, más que la sensibilidad, es de primordial importancia para los detectores. El uso de copas de Faraday conectadas a resistencias de alta ganancia para las medidas analógicas y simultáneas de las corrientes de iones cancela fluctuaciones en la intensidad del haz de iones y evita el salto entre las diferentes masas. Cada copa de Faraday está conectada a su propio amplificador con ganancias diferentes para cada una de ellas. De esta manera, los iones, de abundancia natural, medidos a las diferentes masas producirán señales similares. Algunos instrumentos tienen la capacidad de cambiar la amplificación de las copas para facilitar la medida de muestras que hayan sido marcadas con isótopos estables, proporcionando una gran flexibilidad en la detección y ampliando el campo de aplicación de la técnica.

Las señales de cada amplificador se graban simultáneamente, normalmente cada décima de segundo, creando un cromatograma para los iones monitorizados donde el área de pico es proporcional al número de iones detectados.

La precisión de todas las medidas de relaciones isotópicas está gobernada por dos factores: la limitación práctica del ruido instrumental y la estadística de conteo. Mientras las dos son aplicables a todas las formas de espectrometría de masas, esta última es particularmente importante en IRMS. El haz de iones generado por un MS tiene una distribución finita pero aleatoria de iones individuales. Si nosotros medimos un haz de iones que contiene una media de 10^6 iones/s en una serie de intervalos de un segundo, podríamos medir 999500 iones en un segundo y 1000025 en otro. Debido a la naturaleza discreta y a la distribución variable de los iones, la precisión con la que nosotros podríamos estimar la corriente de iones media aumenta como la raíz cuadrada del número de iones contados (0.1%), una

propiedad gobernada por la distribución de Poisson. Por lo tanto, la precisión de la medida de relaciones isotópicas está fundamentalmente limitada por el número de iones del isotopómero minoritario. Esta limitación combina tanto la eficacia de ionización del espectrómetro de masas como la abundancia relativa de este isotopómero.

La cantidad mínima de carbono necesario para alcanzar precisiones del 0.1‰ en la relación isotópica relativa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de un compuesto es de 1,2 – 60 ng C inyectados en columna, por lo que es necesario una gran concentración de compuesto en la muestra, o el empleo de técnicas de preconcentración para una medida precisa de la relación isotópica.

IV.1.2.6 Idoneidad de la instrumentación GC-IRMS para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono

Una vez abordada la instrumentación empleada para el análisis isotópico de carbono mediante GC-IRMS podemos concluir que esta técnica especializada podría satisfacer la necesidad de una nueva instrumentación que nos permita ampliar las aplicaciones de la dilución isotópica de carbono en línea. En primer lugar, se trata de un proceso completamente automatizado. La inyección de la muestra, la eliminación del disolvente y las etapas de oxidación y reoxidación del reactor de combustión están incorporadas en el sistema, proporcionando un sistema robusto e independiente. Por otro lado, la amplia gama de inyectores disponibles, como resultado del fraccionamiento asociado a esta etapa, proporciona a la técnica una gran flexibilidad para elegir el inyector o modo de inyección más adecuado dependiendo del tipo de muestra y de las propiedades físico químicas de los analitos. En tercer lugar, la interfase de combustión se encuentra en continuo desarrollo con el fin de proporcionar el menor ensanchamiento de los picos cromatográficos, un proceso principalmente asociado a la propia reacción de combustión, a las dimensiones y conexiones del reactor y al sistema de eliminación del agua de los gases de combustión. Las mejoras en el diseño del reactor están enfocadas tanto a disminuir el ensanchamiento de los picos como a proporcionar una mayor capacidad y eficacia de la oxidación, parámetros que están relacionados con el tipo y dimensiones de los oxidantes elegidos así como con la temperatura. Asimismo, la alta eficacia de la ionización y transmisión iónica proporciona una mayor señal analítica en comparación con

otras fuentes de ionización electrónicas. Además, el empleo de un sector magnético proporciona una alta estabilidad en la corriente de iones, lo que se traduce en una mejor precisión de la medida. Por último, el empleo de copas de Faraday para la detección de los iones de interés de manera simultánea elimina la mayor parte del ruido instrumental y evita los problemas relacionados con los detectores de conteo de iones, como son la pérdida de linealidad a altas velocidades de conteo, propiedad relacionada con el tiempo muerto del detector, y el desfase espectral (“spectral skew”) debido al carácter secuencial de la medida. Además, la posibilidad de modificar la amplificación de cada una de las copas de Faraday permite trabajar con diferentes configuraciones permitiendo la aplicación de procedimientos de Dilución Isotópica.

Otra característica importante de esta instrumentación GC-IRMS que supone un avance en la medida de la relación isotópica de carbono, reside en su optimización para evitar cualquier entrada de aire a través de las innumerables conexiones existentes en la interfase de combustión. De esta manera, la señal del fondo no se verá apenas afectada por el CO₂ ambiental presente en el momento del análisis. Por otro lado, la posibilidad de introducir un segundo detector permite mantener la capacidad de elucidación estructural de los MS convencionales y posibilitaría la evaluación de la pureza del pico cromatográfico, evitando así la necesidad de realizarlo en un análisis anterior o posterior al isotópico, como se ha hecho hasta ahora en la Dilución Isotópica de carbono en línea con GC-Combustión-(Q)-MS. De hecho, la implementación de detectores adicionales, junto con la necesidad de un sistema que evite el paso del disolvente al reactor de combustión, hizo necesario la introducción de un divisor de flujos en el interior del horno cromatográfico para poder dividir y dirigir el flujo de la columna hacia el detector complementario o bien hacia el exterior. Este sistema de división de flujos podría convertirse en la herramienta que nos permita la adición del flujo de trazador enriquecido (¹³CO₂) imprescindible para procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono.

La posibilidad de disponer de un equipo comercial GC-IRMS nos permitiría evaluar las características analíticas de esta instrumentación y su compatibilidad para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, ampliando así el número de compuestos analizables mediante esta metodología. En 2011 se instaló en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo un equipo GC-

IRMS configurado en fábrica para la medida de las relaciones isotópicas de carbono, lo que posibilitó la realización de la presente Tesis Doctoral.

IV.1.3 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LA INSTRUMENTACIÓN GC-COMBUSTIÓN-IRMS EMPLEADA

No todos los equipos GC-Combustión-IRMS disponen de todas las mejoras comentadas anteriormente. Dependiendo de la aplicación concreta, y en mayor medida del coste de la mejora, se podrá adquirir un equipo u otro dentro de un amplio abanico de configuraciones disponibles. A continuación se hará una descripción detallada del equipo GC-IRMS del que se dispuso para la realización de este trabajo de investigación.

IV.1.3.1 Sistema de introducción de muestra

El equipo posee dos inyectores para la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico: el inyector convencional split/splitless y el inyector de temperatura programable PTV. La principal diferencia entre ambos reside en la temperatura inicial del inyector. Mientras que el inyector split/splitless trabaja a temperaturas elevadas de manera constante, la inyección de la muestra en el inyector PTV se realiza a bajas temperaturas. Una rampa de temperatura controlada permite la transferencia de los compuestos hasta la entrada de la columna cromatográfica. Esta propiedad del inyector PTV le convierte en el inyector más flexible disponible en el mercado para GC por el gran número de modos de trabajo que permite. Dos propiedades que lo caracterizan son su baja discriminación de los compuestos de alto punto de ebullición y la posibilidad de la inyección de grandes volúmenes de muestra. Esta última propiedad ha sido ampliamente utilizada en GC como técnica de preconcentración, permitiendo además la inyección de disolventes polares en el inyector sin la distorsión de los picos cromatográficos. Esto es posible seleccionando una temperatura inicial del inyector que permita la evaporación selectiva del disolvente que abandona el inyector a través de la línea de split sin la pérdida de los analitos.

En todos los experimentos desarrollados a lo largo de la presente Tesis Doctoral se seleccionó el modo splitless para ambos tipos de inyección, debido principalmente a las características de las muestras y de los estándares analizados y a la sensibilidad del equipo para alcanzar una buena precisión. En este modo de

inyección, prácticamente la totalidad de la muestra se transfiere a la columna cromatográfica y es especialmente utilizado para la determinación de compuestos a nivel de trazas.

A continuación introduciremos las principales características de ambos inyectores en el modo de trabajo seleccionado. Es importante resaltar que el diseño del inyector varía dependiendo del fabricante.

IV.1.3.1.1 Inyector split/splitless en modo splitless

Durante la inyección splitless, la muestra, generalmente líquida, se introduce en el liner calentado donde se produce la evaporación de la muestra para su posterior transporte hacia la entrada de la columna cromatográfica. En la Figura 13a se muestra un esquema del diseño del inyector split/splitless desarrollado por la compañía alemana Thermo Scientific. Durante la evaporación y transporte de la muestra hacia la columna, la línea de split se mantiene cerrada, y es lo que generalmente se conoce como tiempo de splitless. La optimización del tiempo de splitless es fundamental para que exista una buena transmisión de los compuestos durante la etapa de inyección. Después de que la mayor parte de la muestra ha alcanzado la columna cromatográfica, la línea de split se abre y el liner se vacía rápidamente. La muestra se reconcentra en cabeza de columna por la elección de una temperatura inicial del horno adecuada.

Debido a la alta temperatura del inyector durante la inyección de la muestra, ésta puede sufrir procesos de degradación térmica. Por lo tanto, este tipo de inyector no es aconsejable para compuestos termolábiles.

Efectos de discriminación durante la etapa de inyección

Uno de los efectos relacionados con el inyector split/splitless es la pérdida selectiva de algunos de los componentes de la muestra en el inyector. La discriminación en el interior del inyector es un proceso muy complejo que viene determinado por múltiples factores [84]. A continuación abordaremos algunos de los más importantes.

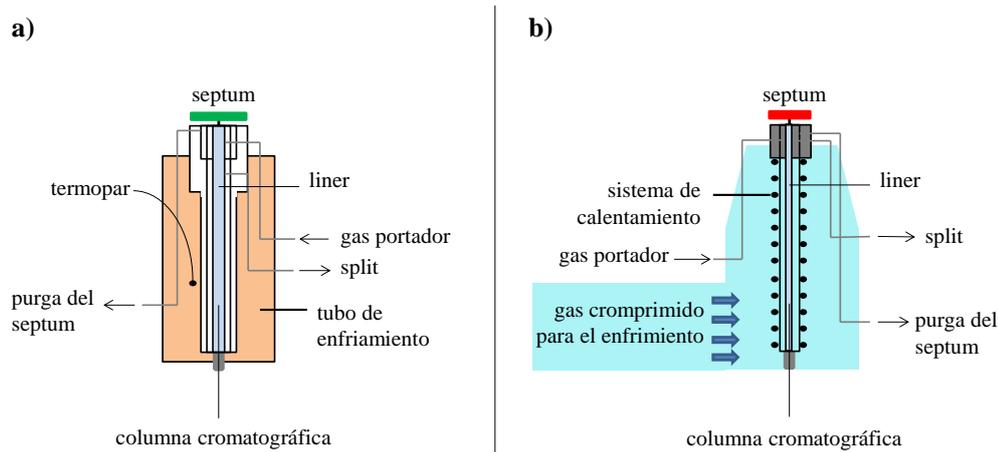


Figura 13. Diseño Thermo Scientific de los inyectores disponibles en el equipo GC-Combustión-IRMS empleado: a) inyector split/splitless y b) inyector PTV.

La discriminación de los compuestos menos volátiles comienza en la aguja de la jeringa tras su entrada en el inyector. Mientras los compuestos más volátiles de la muestra se evaporan, los menos volátiles permanecen aún en el interior de la aguja. Por lo tanto, la cantidad relativa de los compuestos más volátiles aumenta respecto a la de los menos volátiles. Este efecto es más pronunciado cuanto mayor sea la temperatura del inyector, el intervalo de volatilidades de los analitos y el tiempo de residencia de la aguja en el inyector. Una fuente adicional de discriminación de los compuestos de alto punto de ebullición es su posible adsorción en la superficie del interior del inyector cuando la temperatura es demasiado baja para su evaporación completa o su interacción con superficies activas.

Por otro lado, los tiempos altos de residencia del vapor en el interior del inyector, las temperaturas altas, y la sobrecarga por exceso de muestra, siendo ésta última la más usual, pueden causar la discriminación de los compuestos más volátiles en el inyector [84].

IV.1.3.1.2 Inyector PTV en modo splitless

La introducción de la muestra en el inyector a baja temperatura resuelve muchas de las limitaciones de las técnicas de inyección en caliente y por ello, hoy en día

la inyección PTV se considera la mejor técnica de inyección en cromatografía de gases.

La muestra se introduce en el inyector frío y las sustancias no volátiles se quedan depositadas en el interior del inyector sin transferirse a la columna cromatográfica. La muestra se inyecta por debajo del punto de ebullición del disolvente y tras un tiempo determinado se aumenta la temperatura progresivamente, evaporando el disolvente y los componentes de la muestra de manera controlada. Dado que la inyección se realiza en frío, no existe apenas discriminación en la aguja y por lo tanto el inyector PTV es ideal para muestras con amplios intervalos de puntos de ebullición. La probabilidad de sobrecarga por exceso de muestra es mínima, y presenta una menor discriminación respecto al inyector split/splitless dado que no hay evaporación brusca de la muestra. Además, la degradación térmica es menos probable ya que al tratarse de una evaporación controlada, el tiempo durante el cual los analitos se encuentran a temperaturas elevadas se minimiza. Debido a esta evaporación controlada, la reproducibilidad y exactitud del proceso aumenta en comparación con técnicas de inyección en caliente.

Como se puede ver en la Figura 13, el diseño del inyector PTV tiene un gran parecido al del inyector convencional split/splitless. Tan solo sufre una serie de modificaciones que permiten el control de la temperatura y un enfriamiento y calentamiento rápido de la cámara de vaporización. Para facilitar estos procesos de enfriamiento y calentamiento es necesario disminuir la masa térmica del liner. Por esta razón, los liners para inyectores PTV son normalmente de menores dimensiones que los utilizados en inyectores convencionales.

Como se puede observar en la Figura 13b, el calentamiento de la cámara de vaporización se realiza eléctricamente mientras que el enfriamiento se lleva a cabo a través de un sistema de aire comprimido. Este inyector puede alcanzar una temperatura máxima de 400°C y una velocidad máxima de calentamiento de 14°C/s. En la Figura 14 se muestra el funcionamiento del inyector PTV cuando el modo splitless es seleccionado. La válvula de split se encuentra inicialmente abierta hasta unos segundos antes de la inyección. Durante la etapa de inyección y transferencia, la válvula de split se mantiene cerrada hasta alcanzar la temperatura final deseada. La etapa de inyección se realiza a una temperatura baja y constante

mientras que la transferencia se produce de una manera controlada a través de una rampa de temperatura. El tiempo de splitless comienza una vez que se ha alcanzado la temperatura final del inyector. Una vez finalizado este tiempo de splitless, la válvula de split se abre para la limpieza del inyector.

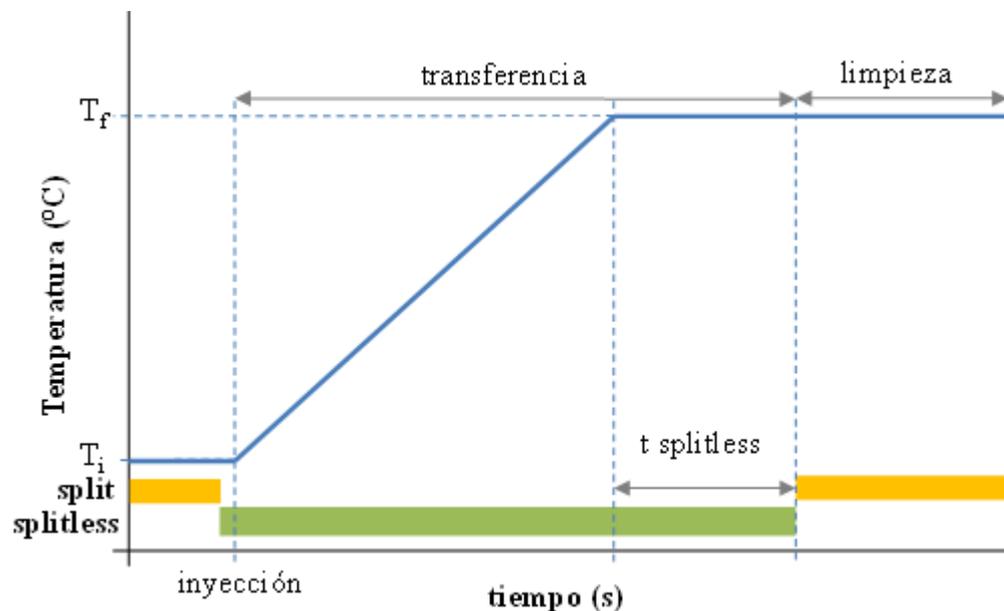


Figura 14. Procedimiento general del inyector PTV en modo splitless.

IV.1.3.2 Interfase de combustión

Al igual que cualquier interfase de combustión, la interfase empleada cumple con los criterios establecidos para la medida precisa de las relaciones isotópicas de carbono.

IV.1.3.2.1 Reactor de combustión

No ha sido posible obtener una información precisa sobre las dimensiones, relleno y diseño del reactor de combustión por cuestiones de confidencialidad del fabricante. Sin embargo, para poder realizar una comparación crítica con el reactor empleado en el desarrollo instrumental del prototipo inicial es necesario el conocimiento aproximado de ciertos parámetros. Para ello, tras la obturación de uno de los reactores empleados a lo largo del desarrollo experimental, se optó por

la rotura secuencial del tubo cerámico en pequeños trozos con el fin de obtener una información aproximada.

El reactor consta de un tubo cerámico de 32 cm de longitud, 2 mm de diámetro externo y 1 mm de diámetro interno, relleno en su parte central con hilos de cobre, níquel y platino de 0,1 mm de diámetro, introducidos a su vez en un segundo tubo de níquel que se encuentra en el interior del tubo cerámico. Este segundo tubo de níquel cumple dos funciones principales. Por una parte, proporciona al reactor una mayor capacidad de oxidación alcanzando una capacidad máxima de 120 µg de carbono a lo largo de la vida útil del reactor sin la necesidad de ampliar la longitud del mismo. Por otra parte, la disminución del diámetro interno respecto al del capilar de transferencia da lugar a un menor ensanchamiento de los picos cromatográficos, característico de esta etapa debido al cambio de dimensiones. En la Figura 15 se muestra el reactor diseñado por Thermo Scientific para el análisis isotópico de carbono. Como se puede observar, el capilar de transferencia del eluyente de la columna cromatográfica hacia el reactor aparece soldado al tubo cerámico. Este diseño evita cualquier aparición de puntos fríos durante la transferencia donde se podría producir la condensación de los analitos. Para poder realizar el sellado del capilar al tubo cerámico se empleó un capilar de acero ofreciendo una mayor resistencia y durabilidad. Este capilar entra directamente en el interior del tubo de níquel durante los primeros 2,5 cm del tubo evitando así un ensanchamiento pronunciado de los picos y cualquier aparición de puntos fríos. Con el objetivo de conectar dicho capilar de acero al capilar cromatográfico se emplea un soporte para la división de flujos situado en el interior del horno cromatográfico. Este divisor de flujos juega también un papel importante en el proceso de la eliminación del disolvente y posibilita el acoplamiento de detectores adicionales.

El tubo cerámico está introducido en el interior de un horno que permite alcanzar altas temperaturas para garantizar la conversión cuantitativa de las diferentes especies. La temperatura de trabajo recomendada por el fabricante para la medida de las relaciones isotópicas de carbono es de 1000°C. Para que tenga lugar la reacción de oxidación, los hilos de cobre y níquel así como el tubo de níquel que se encuentran en el interior del tubo cerámico, deben ser oxidados previamente haciendo pasar un flujo de oxígeno de 0.5 mL/min y empleando un programa de temperaturas optimizado por el fabricante (600°C, 6 horas; 900°C, 4 horas;

1000°C, 2 horas; eliminación del exceso de O₂ con un flujo de He, 2 horas). El cobre y el níquel se transforman en CuO y NiO respectivamente, aumentando el volumen ocupado por los hilos metálicos en el interior del reactor pero sin llegar a obstruir el paso del eluyente cromatográfico. El aumento en el volumen de los hilos metálicos del reactor de 0,1 mm de diámetro junto con las dimensiones del capilar metálico empleado en la transferencia, nos lleva a pensar que el diámetro interno del tubo de níquel debería ser al menos de 0,5 mm.

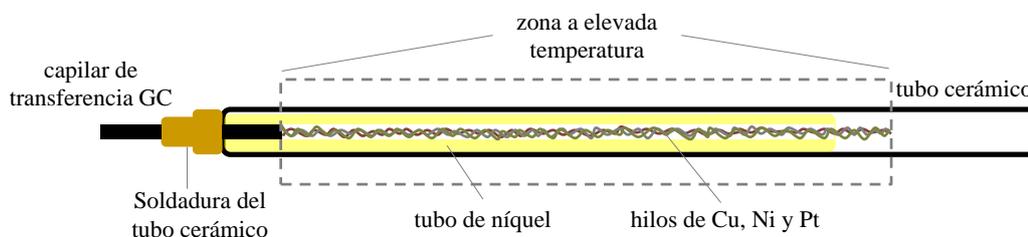


Figura 15. Reactor de combustión diseñado por Thermo Scientific para el análisis isotópico de carbono.

El empleo de cobre y níquel como oxidantes en la reacción de combustión a 1000°C desempeña una triple función. Por un lado, el NiO actúa como donador de oxígeno tras el paso del eluyente cromatográfico transformando la materia orgánica en CO₂. Como consecuencia de esta reacción de oxidación el NiO se transforma de nuevo en Ni elemental, teniendo que reoxidar el reactor de manera periódica para su transformación en el agente oxidante. Por otro lado, el CuO a la temperatura de trabajo empleada produce un sangrado continuo de oxígeno lo cual permite aumentar el tiempo entre las reoxidaciones del reactor. Por último, el NiO comienza a comportarse como donador de oxígeno a temperaturas más altas que el CuO. Este aumento en la temperatura da lugar a una combustión más rápida y cuantitativa alcanzando un mayor poder de oxidación.

IV.1.3.2.2 Eliminación del agua de los productos de combustión

El agua es un subproducto mayoritario de la reacción de combustión de los compuestos orgánicos. Como ya se ha mencionado, ésta puede dar lugar a reacciones de protonación en la fuente de ionización electrónica produciendo interferencias isobáricas a m/z 45, siendo una fuente de error en la medida de la relación isotópica ¹³C/¹²C en niveles de abundancia natural. El equipo dispone de

una membrana de Nafion semipermeable situada tras la reacción de combustión que permite la eliminación del agua a temperatura ambiente. El mayor inconveniente que presenta este sistema es el ensanchamiento de los picos cromatográficos en comparación con otros sistemas disponibles. Sin embargo, este sistema es más ergonómico y por ello es el más ampliamente utilizado.

IV.1.3.2.3 Eliminación del disolvente

El equipo emplea el sistema backflush para la eliminación del disolvente antes de su paso a la interfase de combustión. Este sistema permite trabajar en dos modos de operación alternativos dependiendo de la dirección del flujo que eluye de la columna cromatográfica. En la Figura 16 se encuentran representados ambos modos de trabajo, comúnmente denominados modo directo y modo backflush.

Durante la aplicación del modo de operación backflush (Figura 16a), un flujo de helio a contracorriente pasa a través del reactor de combustión redirigiendo los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica hacia el exterior del sistema a través de una válvula de venteo. La entrada de este flujo de helio en sentido contrario se realiza a través de un soporte para la división de flujos localizado en el interior del horno cromatográfico. Por otro lado, durante el modo de operación directo (Figura 16b), la válvula de entrada del flujo de helio a contracorriente permanece cerrada y el eluyente cromatográfico sigue su camino hacia el reactor de combustión.

Es aconsejable mantener el equipo en modo backflush cuando no se está utilizando para evitar así cualquier entrada de aire al espectrómetro de masas. A lo largo del análisis isotópico es habitual trabajar en modo backflush durante los primeros y últimos minutos del análisis, evitando así la entrada del disolvente al comienzo del cromatograma, y de los compuestos indeseados de alto peso molecular y sangrado de la columna al final del mismo.

IV.1.3.2.4 Amortiguador de presión

El equipo dispone de una interfase universal que permite la restricción del flujo procedente de la interfase de combustión, dando lugar a la introducción de un flujo constante a baja presión en el IRMS que evita la desestabilización en la fuente de ionización. Además, permite la introducción alternativa de un gas de

trabajo estándar en condiciones muy similares de presión facilitando las medidas altamente precisas y exactas de las relaciones isotópicas de carbono.

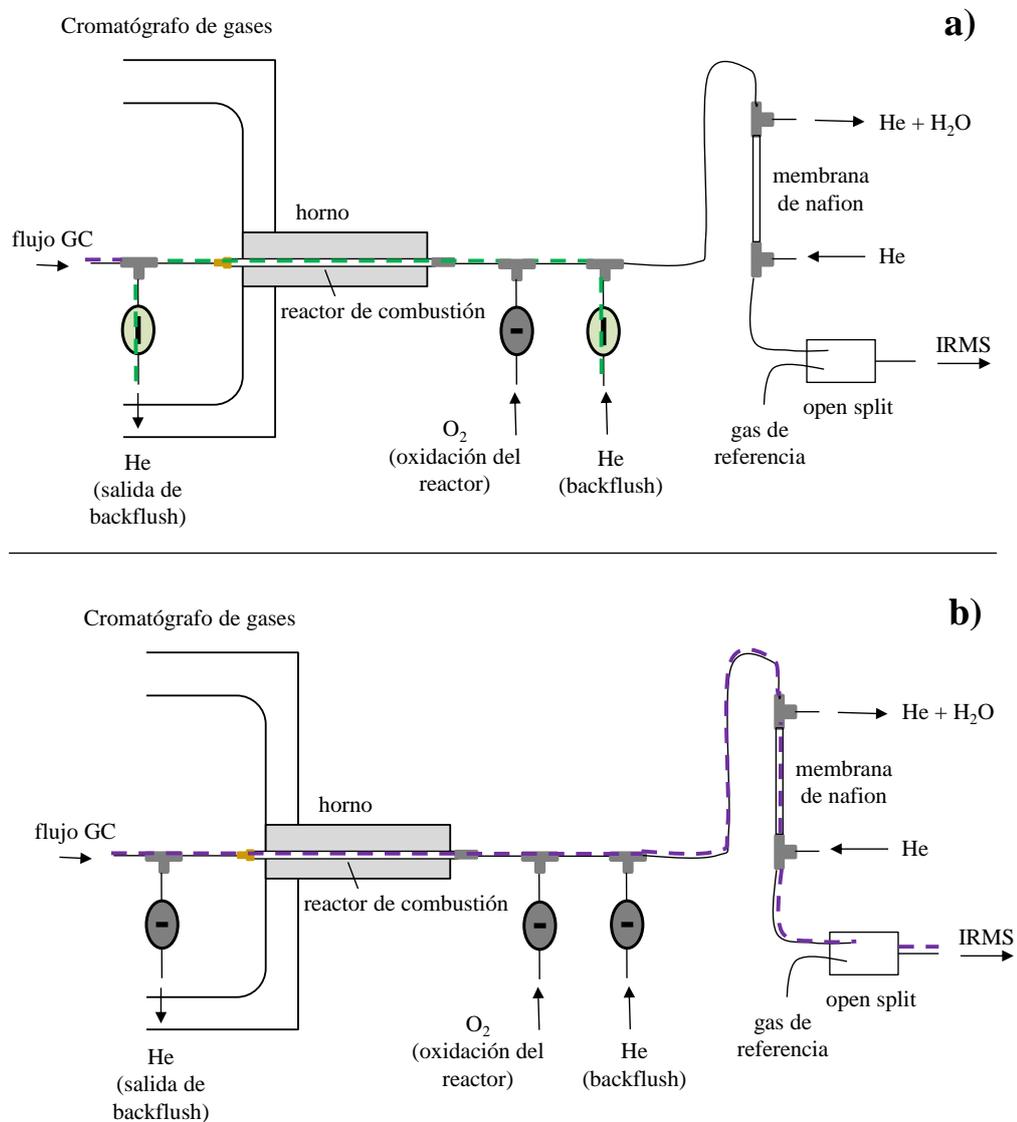


Figura 16. Modos de trabajo empleados en la instrumentación GC-IRMS: a) Modo Backflush y b) Modo Directo.

IV.1.3.3 Espectrómetro de masas

Los componentes básicos del espectrómetro de masas no se diferencian de cualquier otro IRMS empleado en el análisis de isótopos estables ligeros. La única mejora integrada de fábrica radica en las diferentes configuraciones disponibles que dependen de la amplificación de las copas de Faraday para cada una de las masas medidas. En la Tabla 7 se muestra la amplificación para cada una de las copas en las dos configuraciones disponibles para el CO₂. La configuración ¹²CO₂ permite el análisis isotópico en niveles de abundancia natural con una amplificación de la señal para m/z 45 100 veces mayor que para m/z 44. De esta manera, los iones de abundancia natural medidos a las diferentes masas producirán señales similares. Por otro lado, la configuración ¹³CO₂ se emplea para la medida de la relación isotópica de carbono en compuestos marcados isotópicamente o, en este caso particular, para permitir la medida de la relación isotópica ¹²C/¹³C tras la introducción de un flujo de trazador de manera continua para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. En este caso la amplificación para ambas relaciones m/z fue exactamente la misma.

Tabla 7. Amplificación de las copas de Faraday para m/z 44, 45 y 46 en las dos configuraciones de trabajo disponibles.

Configuración	Resistencia (Ω)		
	m/z 44	m/z 45	m/z 46
¹² CO ₂	3 x 10 ⁸	3 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹¹
¹³ CO ₂	3 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	1 x 10 ¹¹

IV.1.4 COMPARACIÓN INSTRUMENTAL

Tanto el prototipo instrumental desarrollado como el equipo comercial GC-IRMS precisan de una transformación de los analitos a CO₂. Aunque la principal razón de dicha transformación no es la misma, la interfase de combustión de ambos equipos debe satisfacer una serie de requisitos comunes. El primero de ellos y más importante es la conversión rápida y cuantitativa de los analitos. Para ello, es necesario contar con un reactor de los materiales adecuados que permita la combustión cuantitativa de cualquier compuesto orgánico que pase a su través. El

reactor diseñado por Thermo Scientific posee una mayor capacidad de oxidación por la introducción de un segundo tubo de níquel en el interior del tubo cerámico, y además permite trabajar a temperaturas más elevadas aumentando así el poder de oxidación del reactor.

Otro de los objetivos principales de la interfase de combustión es proporcionar el menor ensanchamiento de los picos cromatográficos. En ambos reactores, el capilar de transferencia, que permite el paso del eluyente cromatográfico hacia el reactor de combustión, se inserta directamente en el interior del reactor hasta la zona del reactor que permanece a alta temperatura, evitando la aparición de puntos fríos. La única diferencia entre ambos reactores reside en la complejidad del proceso de inserción. Mientras que en el prototipo instrumental la inserción del capilar se realiza manualmente, en el equipo comercial el capilar se encuentra soldado sobre el reactor. Ambos sistemas evitan la condensación de los compuestos durante su transferencia hacia el reactor. Por otro lado, las dimensiones del reactor son críticas respecto al ensanchamiento de los picos cromatográficos. La principal diferencia entre ambos reactores radica en el material del tubo. En el reactor del equipo comercial el capilar de transferencia se introduce directamente en el tubo de níquel, que tras su oxidación habrá aumentado ligeramente su volumen disminuyendo a su vez el diámetro interno del mismo. Esto puede disminuir el ensanchamiento producido por la diferencia de diámetros internos entre el capilar de transferencia (0,32 mm de diámetro interno) y el reactor de combustión respecto a la inserción directa en el tubo cerámico.

Un requisito adicional de la interfase de combustión es evitar el paso del disolvente hacia el reactor. Por tratarse de un equipo comercial, el equipo GC-IRMS posee un sistema más elegante para la eliminación del disolvente. Se realiza de manera automatizada a través del software y el disolvente se elimina hacia el exterior sin alcanzar la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Además, a través de este sistema también es posible la preoxidación y posteriores reoxidaciones del reactor sin intervención del analista. Cabe destacar que el diseño del prototipo instrumental que utiliza una válvula de 6 vías y 2 posiciones se podría mejorar con el empleo de una válvula neumática controlada por el software dándole una mayor independencia al sistema desarrollado.

La amortiguación de la presión y la eliminación del agua no se consideran requisitos comunes de ambas metodologías. Sin embargo, el estudio de las características analíticas de la nueva instrumentación disponible nos permitirá evaluar cómo afectan estos parámetros a los resultados obtenidos tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono.

El sistema de introducción de muestra para ambas metodologías debe mostrar una transferencia cuantitativa de los analitos que no dé lugar a procesos de fraccionamiento. Para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea es imprescindible que no exista una pérdida de los compuestos antes del equilibrio isotópico con el trazador, mientras que para el análisis isotópico, el fraccionamiento generado por una transmisión no cuantitativa puede ser crítica para la obtención de una relación isotópica correcta. Sin embargo, puede existir pérdida de muestra durante la etapa de inyección sin existir fraccionamiento isotópico, y es en este punto donde se encuentra la principal diferencia entre ambas metodologías. Así, un proceso de microextracción en fase sólida sería una técnica adecuada de preconcentración para un análisis isotópico específico del compuesto (CSIA), mientras que para metodologías de dilución isotópica en línea la adsorción selectiva de la fibra por los analitos no permitiría una cuantificación directa de los mismos. De la misma forma, a pesar de que no se hayan observado procesos de fraccionamiento isotópico en sistemas de introducción de muestra basados en la inyección splitless, este inyector proporciona la mayor discriminación de los compuestos durante la etapa de inyección. El prototipo desarrollado tan solo dispone de un inyector convencional split/splitless. Una mezcla de compuestos con un amplio rango de puntos de ebullición no podría ser cuantificada mediante Dilución Isotópica en línea. Sin embargo, el inyector PTV, disponible en la nueva instrumentación, permitiría una inyección cuantitativa de la mezcla sin dar lugar a la pérdida selectiva de los compuestos, tras su optimización. Además, la aplicación de la Dilución Isotópica en línea sería una extraordinaria herramienta para el estudio de etapas no cuantitativas como lo puede ser la inyección.

Por último, el espectrómetro de masas seleccionado para la detección juega un papel fundamental en la calidad de los resultados analíticos. El IRMS está especialmente diseñado y optimizado para proporcionar grandes y estables corrientes de iones por lo que cabe esperar una mejora en la sensibilidad,

precisión, rango lineal, relación señal/ruido y fondo instrumental que el proporcionado por un MS convencional tipo cuadrupolo para la señal de CO₂.

En esta ocasión, la mejora de un segundo detector en la instrumentación GC-combustión-IRMS que permitiría el análisis cualitativo e isotópico en una sola inyección no fue introducida. A diferencia del prototipo desarrollado se pierde la capacidad de elucidación estructural por lo que será necesario la inyección de la muestra en un segundo equipo GC-MS que permita comprobar la pureza del pico cromatográfico antes de su análisis isotópico.

Dadas las magníficas características que proporciona la instrumentación GC-IRMS para la aplicación con éxito de la Dilución Isotópica en línea de carbono, es necesario tan solo una pequeña modificación para la aplicación de la metodología: la introducción del flujo de trazador en el sistema.

IV.1.5 MODIFICACIÓN INSTRUMENTAL PARA LA APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA

IV.1.5.1 Introducción del flujo del trazador isotópico

El trazador isotópico de carbono se encuentra almacenado en un depósito de 5 L de acero inoxidable presurizado a 5 bares. El depósito cuenta con un controlador de flujo másico para suministrar de manera precisa el flujo de trazador. Tras este controlador de flujo, un capilar de sílice fundida de 0.32 mm de diámetro interno debe ser conectado al sistema para la introducción del ¹³CO₂.

En el prototipo instrumental desarrollado para la aplicación de IDMS en línea, el flujo de trazador se adicionó a través de un conector en Y de acero inoxidable tras la conversión del eluyente cromatográfico a CO₂, y justo antes de la entrada al espectrómetro de masas. Sin embargo, el diseño instrumental GC-IRMS no permite la aplicación de esta configuración debido a la presencia de una membrana de Nafion entre el reactor de combustión y el IRMS. Pequeñas pérdidas de CO₂ durante la eliminación del agua no podrían ser compensadas por lo que se optó por añadir un pequeño flujo de ¹³CO₂ diluido en He (0.5 mL/min) después de la separación cromatográfica y antes del horno de combustión. Como ya se ha comentado, este equipo dispone de una plataforma para la división de flujos localizada en el interior del horno cromatográfico empleada para

suministrar el flujo de backflush al sistema así como para la incorporación de detectores adicionales. Esta plataforma dispone de un gran número de conexiones disponibles aptas para la introducción del flujo de trazador. La Figura 17 muestra un esquema de las conexiones utilizadas en el interior del horno cromatográfico tras la modificación instrumental que permite la adición en continuo del flujo del trazador sin sacrificar los dos modos de trabajo permitidos por el equipo (modo backflush y modo directo).

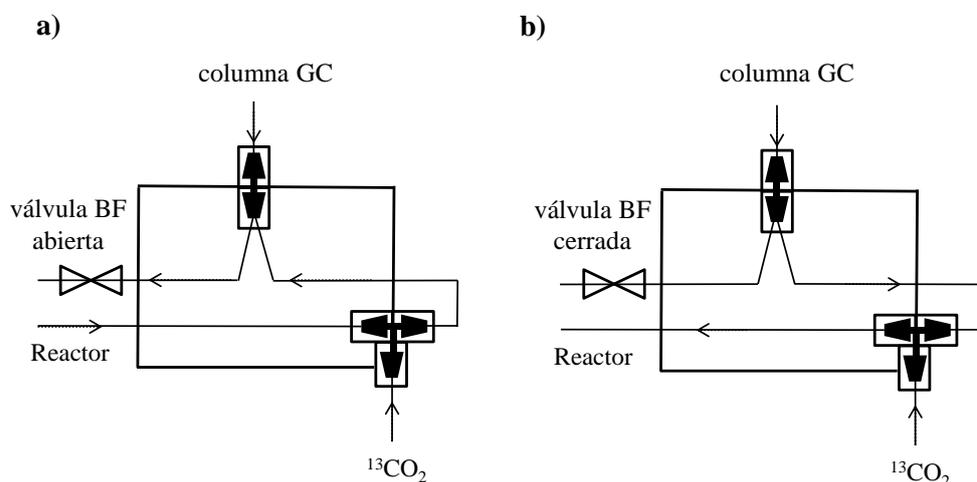


Figura 17. Modificación instrumental detallada para la introducción del flujo en línea del trazador a través del divisor de flujos localizado en el interior del horno cromatográfico en a) modo backflush y b) modo directo.

IV.1.5.2 Configuración $^{13}\text{CO}_2$

El equipo GC-IRMS se configuró en fábrica para poder disponer de dos posibles amplificaciones para m/z 45. De esta manera, y en contraste con el modo de trabajo convencional de los equipos GC-IRMS donde la señal a m/z 45 está amplificada 100 veces respecto a m/z 44 (configuración $^{12}\text{CO}_2$), se pudo utilizar la misma amplificación en ambas copas de Faraday (configuración $^{13}\text{CO}_2$). En la Figura 18 se muestran los cromatogramas modelo obtenidos para las dos configuraciones disponibles. La elección de la configuración $^{12}\text{CO}_2$ (Figura 18a) se emplea para el análisis isotópico de carbono de compuestos de abundancia isotópica natural, observando señales prácticamente idénticas a m/z 44 y m/z 45.

Por el contrario, la introducción del trazador isotópico de carbono en el sistema hace necesario el cambio de configuración de tal manera de que se disponga de una misma amplificación de la señal para m/z 44 y m/z 45 (Figura 18b). Se puede observar una señal prácticamente constante a m/z 45 debido a la introducción continua del flujo de trazador que solo varía débilmente durante la elución del compuesto debido a la contribución natural del ^{13}C (en torno al 1,1%). En este caso, la señal a m/z 44 es la que da lugar al perfil cromatográfico mientras que la señal a m/z 45 se mantiene casi constante a lo largo del cromatograma.

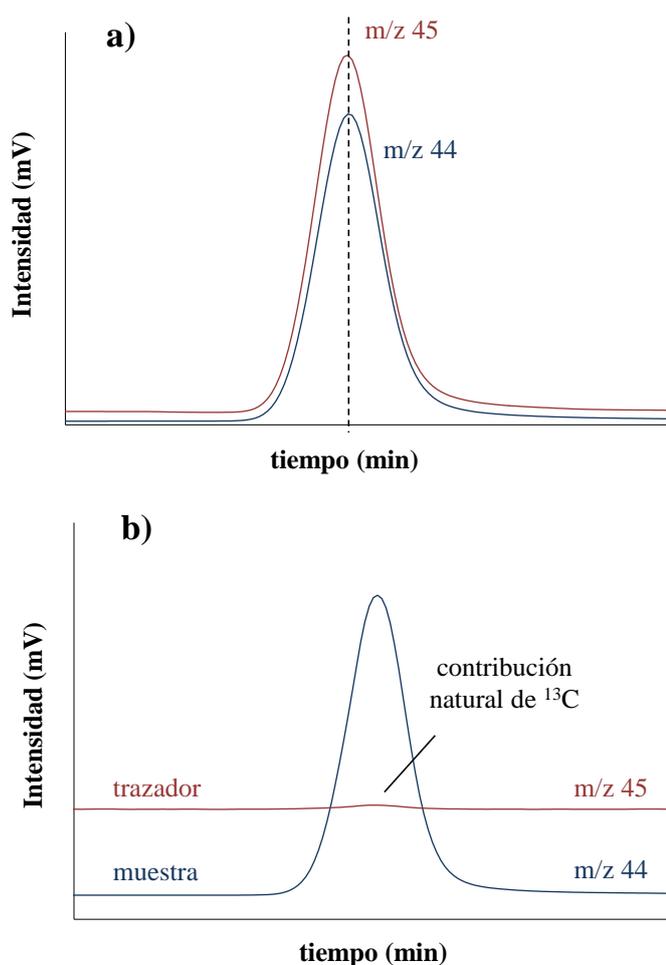


Figura 18. Cromatogramas tipo para a) el análisis isotópico específico del compuesto (configuración $^{12}\text{CO}_2$) y b) aplicaciones de dilución isotópica de carbono en línea (configuración $^{13}\text{CO}_2$).

La pequeña diferencia en los tiempos de retención del ^{12}C y ^{13}C debido al fraccionamiento isotópico que tiene lugar durante la separación cromatográfica es prácticamente inapreciable en la Figura 18a. Sin embargo, el enfrentamiento gráfico entre ambas señales puede demostrar la existencia de una desviación temporal para las masas de interés de una manera más visual (Figura 19). Si ambos isotopómeros eluyeran al mismo tiempo de la columna cromatográfica, al enfrentar ambas señales deberíamos observar un comportamiento lineal como el observado para los primeros puntos correspondientes a la señal del fondo antes y después de la elución del compuesto. La dispersión de los puntos respecto a ese comportamiento ideal durante la elución del pico cromatográfico confirma que se produce fraccionamiento isotópico durante la separación.

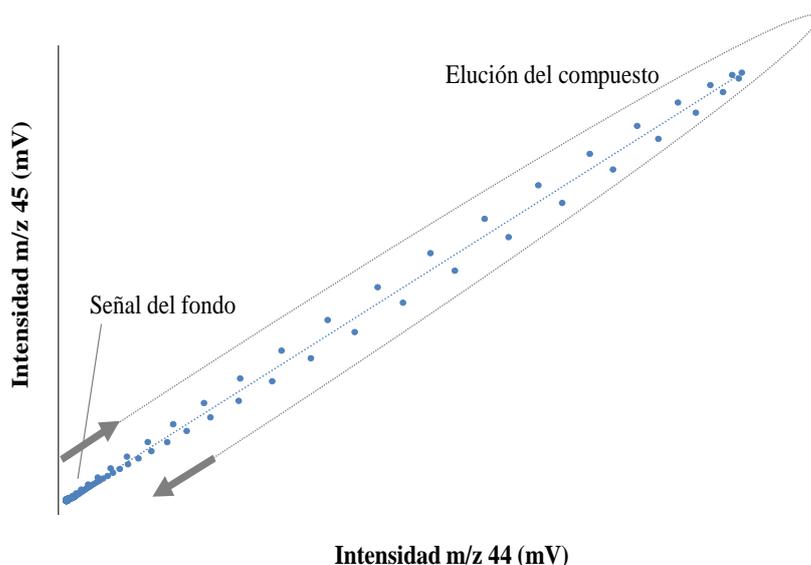


Figura 19. Representación gráfica de la desviación temporal de los isotopómeros estables del carbono debido al fraccionamiento isotópico durante la separación cromatográfica.

Cabe destacar que este débil fraccionamiento isotópico es de vital importancia cuando se quieren alcanzar resultados de alta precisión como los necesarios en el análisis isotópico (Compound Specific Isotopic Analysis, CSIA). Sin embargo, para la cuantificación mediante dilución isotópica de carbono en línea, donde se calcula la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ punto a punto a lo largo de todo el

cromatograma, esta diferencia en los tiempos de retención no varía la calidad de los resultados debido a la baja contribución de ^{13}C sobre la señal del trazador en muestras de abundancia natural.

IV.1.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Con el objetivo de evaluar las características analíticas de la nueva instrumentación para la aplicación de la dilución isotópica de carbono en línea se inyectó 1 μL de una disolución de 10 $\mu\text{g C/g}$ del alcano n-tetradecano empleando el inyector split/splitless y un flujo de trazador de 0,5 mL/min. Éstas fueron las mismas condiciones que las empleadas para el estudio de las características analíticas del prototipo instrumental desarrollado GC-Combustión-(Q)-MS. La única diferencia reside en la concentración del estándar analítico que en aquella ocasión fue de 5 $\mu\text{g C/g}$. La elección de condiciones de trabajo similares proporcionará una comparación real entre ambos equipos.

IV.1.6.1 Ensanchamiento de los picos cromatográficos

Debido al ensanchamiento de los picos cromatográficos por la introducción de una interfase de combustión entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas, es necesario conocer el grado de ensanchamiento existente en cada caso particular. Este ensanchamiento se considera un parámetro limitante para metodologías de Dilución Isotópica en línea de carbono por la necesidad de una resolución en línea de base de los analitos, ya mencionada.

Desafortunadamente, se observó un ensanchamiento notable en el pico cromatográfico obtenido para el n-tetradecano con un ancho de pico a media altura de 0.038 min (Figura 20a). Este valor fue mayor que el obtenido con el prototipo previo donde se obtuvo un ancho de pico a media altura de 0.022 min (Figura 20b), siendo este el ensanchamiento habitual cuando se trabaja de manera convencional con otros detectores para cromatografía de gases como GC-MS o GC-FID. Al producirse dicho ensanchamiento no sólo en la línea de base sino también a media altura, se puede descartar que su origen sea el pequeño incremento de concentración entre los dos experimentos.

Ya que tanto el diseño como las características del reactor de combustión del GC-combustión-IRMS son más apropiados para la obtención de un menor ensanchamiento que las del prototipo desarrollado (reducción en el número de

conexiones y disminución del diámetro interno del reactor respecto al del capilar de transferencia), todo parece indicar que el ensanchamiento producido se debe a la introducción de la membrana de Nafion para la eliminación del agua de los gases producidos durante la combustión, y al largo recorrido del eluyente cromatográfico hasta la entrada al espectrómetro de masas por su paso a través del sistema amortiguador de presión. Ambos sistemas son requisitos fundamentales que debe cumplir cualquier interfase de combustión para el análisis isotópico de carbono de alta precisión. Sin embargo, ambos son prescindibles para aplicaciones de dilución isotópica de carbono en línea y por tanto su eliminación disminuiría el ensanchamiento producido.

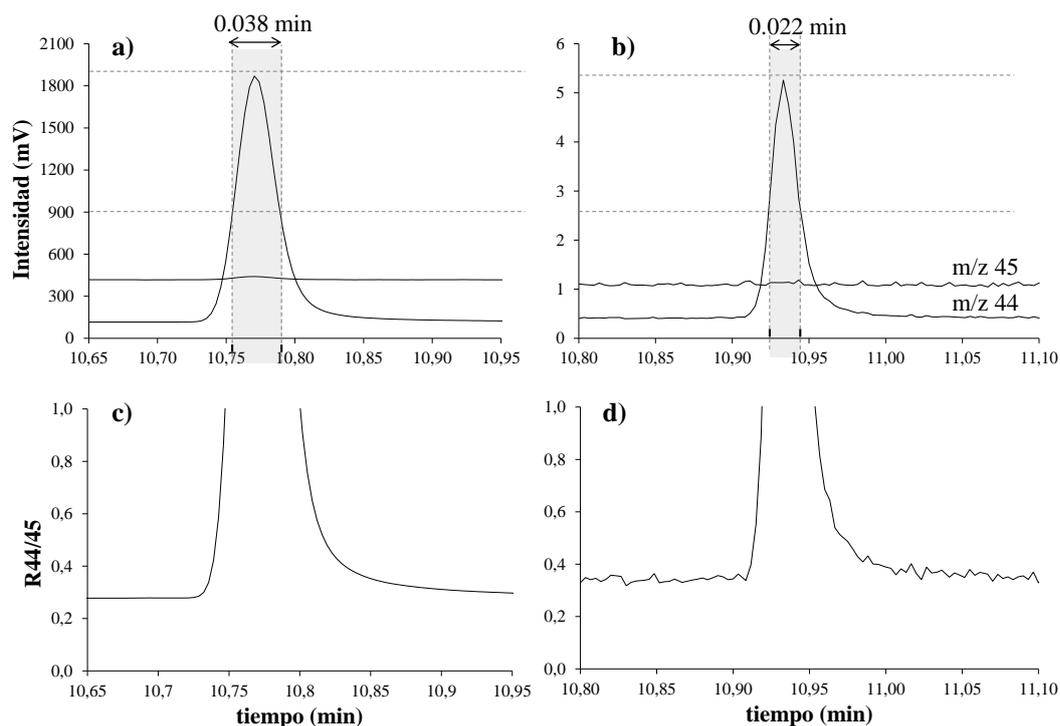


Figura 20. Cromatogramas de intensidad (a y b) y de relación isotópica 44/45 (c y d) obtenidos para el *n*-tetradecano (8 $\mu\text{g C/g}$) mediante GC-IRMS (a y c) y GC-Combustión-(Q)-MS empleando un flujo de trazador $^{13}\text{CO}_2$ de 0,5 mL/min.

IV.1.6.2 Precisión de la relación isotópica

La precisión es uno de los parámetros que define a los espectrómetros de masas de relaciones isotópicas. Para confirmar este hecho, se calculó la desviación estándar relativa de la relación 44/45 antes de la elución del pico cromatográfico. El valor obtenido fue de 0.05% RSD (n=50), siendo un orden de magnitud menor que el obtenido con el prototipo instrumental GC-combustión-MS tipo cuadrupolo. Esta mejora en la precisión de la relación isotópica se observa claramente en la estabilidad del cromatograma de relaciones isotópicas que se muestra en el fondo de la Figura 20c. Con el fin de ofrecer una comparación visual, la Figura 20d muestra los mismos resultados obtenidos para el prototipo instrumental, observando un fondo mucho más ruidoso. Por lo tanto y como era de esperar, la nueva instrumentación GC-IRMS ofrece una mejor precisión de la relación isotópica.

IV.1.6.3 Sensibilidad y límites de detección

El límite de detección para el n-tetradecano, basado en tres veces la desviación estándar de la señal obtenida para el fondo a m/z 44, fue de 15 ppb (ng C/g). Teniendo en cuenta el volumen de inyección y el ancho de pico en línea de base, (6,6s en este caso particular) es posible el cálculo del límite de detección independientemente de la columna empleada y del flujo del gas portador. El valor encontrado fue de 1,6 pg C/s, siendo un poco más alto que el proporcionado por un GC-MS en modo full scan (1 pg C/s) y claramente mejor que el obtenido por un detector de ionización en llama (10 pg C/s). Sorprendentemente, este límite de detección fue débilmente peor que el obtenido con el prototipo desarrollado que emplea un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo como detector (0,8 pg C/s).

A pesar de obtener señales altamente estables que dan lugar a una disminución del ruido instrumental y a una precisión en la relación isotópica inmejorable, los límites de detección encontrados fueron superiores que los obtenidos con el prototipo previo. Pueden existir dos razones básicas que expliquen este aumento en el límite de detección. Por un lado, está claro que tener en cuenta el ancho de pico en línea de base para el cálculo del límite de detección va a producir un aumento directamente proporcional al tiempo de elución del pico. Sin embargo, el límite de detección encontrado con el prototipo previo (3,1 pg C) sigue siendo menor que el calculado con la nueva instrumentación (10,6 pg C) cuando el

tiempo de elución no se tiene en cuenta. Como se puede observar en los cromatogramas de intensidades obtenidos para ambas configuraciones (Figura 20^a y Figura 20b), la relación señal ruido del n-tetradecano para m/z 44 es prácticamente la misma en ambos casos a pesar de que ahora la concentración se duplica respecto a las condiciones anteriormente empleadas. El ensanchamiento del pico provoca una disminución en la intensidad del mismo y por tanto es posible explicar la misma relación de intensidades obtenida en ambos casos con el consecuente aumento en el límite de detección. La integración del área bajo el pico demostraría la mayor concentración empleada en esta ocasión.

Por otro lado, los instrumentos IRMS aplican una mayor energía de ionización (124 eV) en la fuente electrónica con el fin de obtener corrientes de iones más grandes y estables que las obtenidas habitualmente. Sin embargo, los datos obtenidos no demuestran una mayor señal para la molécula de CO_2 a pesar de la mayor energía aplicada. Este posible efecto positivo puede verse contrarrestado por los detectores empleados en cada caso. Mientras que el MS de tipo cuadrupolo utiliza un detector de conteo de iones, el IRMS hace uso de copas de Faraday para la detección simultánea a las masas de interés. Estos detectores que ofrecen una mayor precisión en la medida también se caracterizan por su menor sensibilidad respecto a los detectores secuenciales. Por lo tanto, una alta energía de ionización en la fuente junto con un detector de masas tipo cuadrupolo sería la instrumentación que ofrecería los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y límites de detección, a pesar de sacrificar la alta precisión de los instrumentos IRMS, no necesaria para procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono.

IV.1.6.4 Conclusiones

El sacrificio de la sensibilidad para la medida altamente precisa de la instrumentación IRMS ha quedado constatado tras el estudio de sus características analíticas para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. Así como se ha encontrado una precisión en la medida de la relación 44/45 un orden de magnitud mejor que para MS de tipo cuadrupolo, los límites de detección empeoran ligeramente. El ensanchamiento de los picos cromatográficos y la sensibilidad del detector utilizado han sido los principales motivos encontrados.

Una vez estudiadas las características analíticas de la nueva instrumentación proponemos posibles mejoras sobre el prototipo original que mejorarían sus características analíticas para procedimientos de dilución isotópica de carbono en línea. Tal y como se muestra en la Figura 21, las mejoras propuestas respecto al prototipo inicialmente desarrollado son: i) el empleo del sistema backflush para la eliminación del disolvente y la oxidación del reactor de combustión; ii) la introducción del flujo de trazador entre la columna cromatográfica y el reactor de combustión para permitir el funcionamiento del sistema backflush; iii) el empleo de una válvula de 4 vías para el cambio de configuración; iv) un reactor de combustión capaz de minimizar el ensanchamiento de los picos cromatográficos como puede ser el diseñado por Thermo Scientific; y, v) la aplicación de un potencial de ionización alternativo en la fuente que permita trabajar en las dos configuraciones disponibles, GC-MS (Figura 21a) y GC-Combustión-MS (Figura 21b).

Este diseño daría lugar a un menor ensanchamiento de los picos cromatográficos con la consecuente mejora en los límites de detección y, en la resolución requerida para procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono. Además, la introducción del sistema backflush facilitaría la eliminación del disolvente, la oxidación del reactor, y la minimización de fugas o entradas de aire, permitiendo además el empleo de una válvula de 4 vías en lugar de 6 para el cambio de configuración. En el prototipo inicialmente desarrollado, se requiere una válvula de 6 vías para evitar la sobrepresión producida por la introducción del trazador isotópico en el sistema cuando se trabaja en el modo convencional GC-MS. Sin embargo, en esta propuesta el empleo del sistema BF en dicha configuración permite la salida del flujo del trazador hacia el exterior, sin la necesidad de una salida adicional en la válvula. La automatización del sistema también supondría un gran avance ofreciendo una mayor autonomía y robustez instrumental. Además, la introducción de estas mejoras no impediría trabajar en las dos configuraciones disponibles en el prototipo inicialmente desarrollado.

El desarrollo de nuevas aplicaciones de Dilución Isotópica en línea de carbono necesita de una instrumentación adecuada que no restrinja el alcance y capacidades de la metodología. El equipo comercial GC-IRMS nos va a permitir la evaluación de nuevos compuestos orgánicos con el fin de ampliar las aplicaciones del nuevo modo de Dilución Isotópica. Sin embargo, no hay que

olvidar que los avances instrumentales (GC, interfases de combustión y MS) son imprescindibles para ofrecer los mejores resultados.

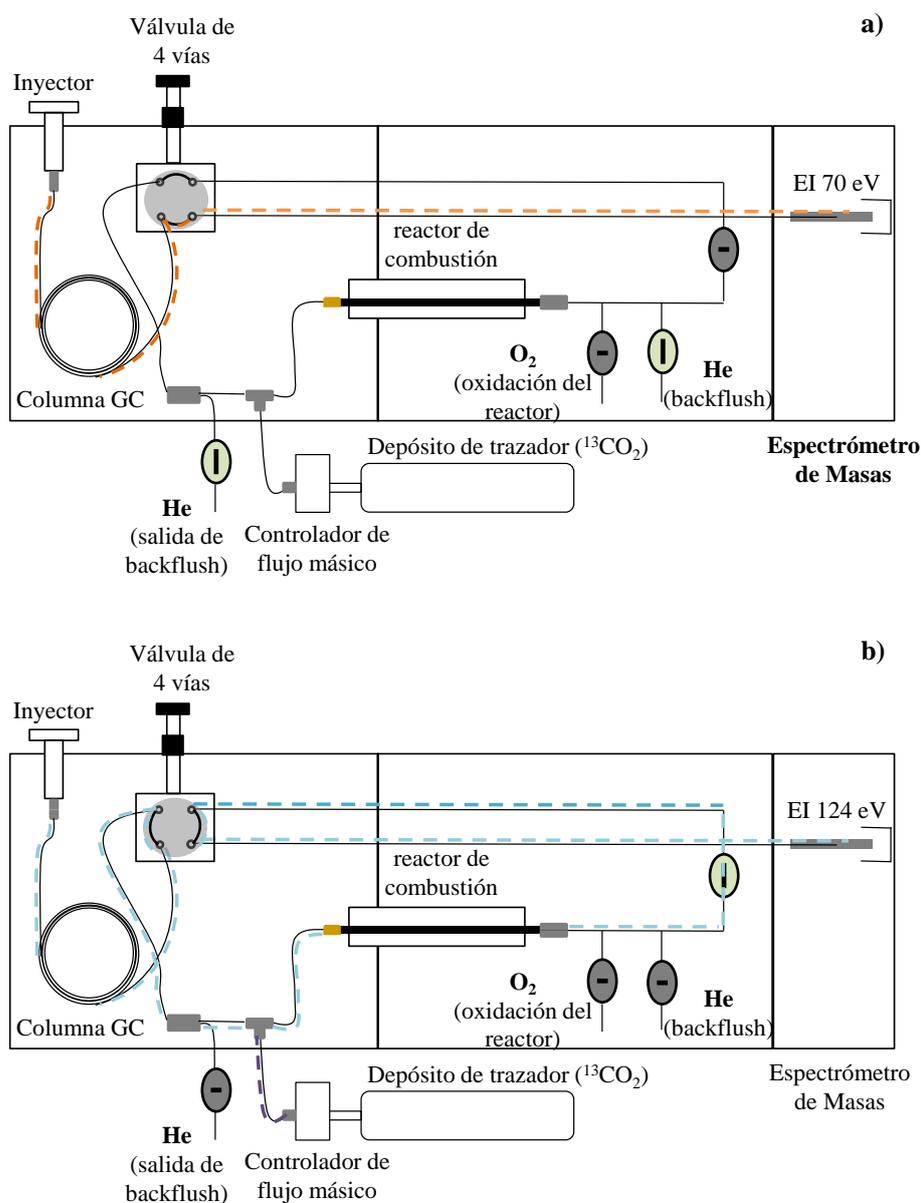


Figura 21. Esquema de las mejoras instrumentales propuestas sobre el prototipo original desarrollado para la Dilución Isotópica en línea de carbono en ambas configuraciones disponibles: a) GC-MS y b) GC-Combustión-MS.

IV.1.7 ANALITOS DE INTERÉS

Uno de los pocos requisitos necesarios para la aplicación del procedimiento de Dilución Isotópica en línea carbono es la *transmisión cuantitativa* de todos los analitos desde la aguja de la jeringa hasta la conversión de los compuestos en CO₂. Una vez adicionado el flujo del trazador isotópico de carbono (¹³CO₂) al flujo de ¹²CO₂ natural procedente de la muestra, las pérdidas o efectos de supresión de la ionización no deberían afectar a los resultados cuantitativos. Existen, por tanto, dos etapas instrumentales críticas donde puede tener lugar la pérdida selectiva de los compuestos inyectados que no podrá ser corregida con el procedimiento de dilución isotópica: la inyección y la combustión.

En primer lugar, para la validación del procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono con el prototipo instrumental desarrollado inicialmente, se llevó a cabo la cuantificación de una mezcla de compuestos orgánicos sencillos formados únicamente por átomos de C e H (C9-C20). La mezcla de compuestos orgánicos elegida cubre un amplio rango tanto de puntos de ebullición (126-343°C) como de número de carbonos en su estructura. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en términos de exactitud y precisión. En esta ocasión, el patrón interno elegido fue uno de los compuestos de la mezcla, por lo que su única diferencia con los analitos reside tan sólo en el número de carbonos. Para evaluar la aplicabilidad de la metodología a compuestos orgánicos más complejos se seleccionó una mezcla de compuestos que contenía compuestos insaturados de bajo punto de ebullición (BTEX), compuestos saturados (alcanos), y compuestos funcionalizados (ésteres). El patrón interno elegido fue de la misma naturaleza que una de las familias de compuestos evaluada pero diferente al resto. Los resultados fueron de nuevo cuantitativos, demostrando el carácter genérico de la metodología. Por lo tanto, el procedimiento hasta entonces estaba validado para la cuantificación de compuestos puramente orgánicos que contienen tan sólo átomos de C, H y O, y que cubren un amplio rango de puntos de ebullición hasta un máximo de 343 °C.

Este estudio demostró una transmisión prácticamente cuantitativa durante la etapa de inyección en el rango de puntos de ebullición estudiado y una conversión cuantitativa de los analitos orgánicos sencillos en el reactor de combustión independientemente de su estructura. En principio, la metodología sería aplicable a todos los compuestos orgánicos que se puedan separar por cromatografía de

gases. Sin embargo, es necesario demostrar que la metodología se puede extender a otras familias de compuestos orgánicos, volátiles y no tan volátiles, para demostrar el alcance de la metodología.

IV.1.8 APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA A COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ALTO PESO MOLECULAR: HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Se consideran compuestos orgánicos volátiles aquellos con temperaturas de ebullición por debajo de 250 °C. Sin embargo, existen otros muchos compuestos orgánicos de interés analizables por cromatografía de gases cuyo punto de ebullición supera ampliamente esta temperatura. La extensión de la metodología a compuestos de alto peso molecular ampliaría el campo de aplicación del procedimiento desarrollado. El inyector PTV incorporado en la nueva instrumentación GC-IRMS es una herramienta con gran potencial para esta nueva aplicación por ofrecer una transferencia cuantitativa durante la etapa de inyección, cuya única limitación reside en la temperatura máxima alcanzada por el inyector. Con el objetivo de extender la metodología a compuestos de alto peso molecular se optó por el estudio de una familia de compuestos orgánicos de gran interés por su impacto medioambiental y sus efectos en la salud: los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Estos compuestos están formados por la fusión de dos o más anillos aromáticos sencillos, y generalmente no presentan heteroátomos en su estructura. Se empleó una mezcla estándar certificada de 16 PAHs, que cubren un amplio rango de puntos de ebullición (218-525°C) y de número de carbonos en su estructura (10-22 C) (ver Tabla. A. 1 del Anexo 1). Esta mezcla contiene la mayoría de los PAHs presentes en la lista de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) como contaminantes prioritarios.

IV.1.8.1 Identificación

La instrumentación GC-IRMS no dispone de un segundo detector que permita la identificación de los PAHs en la mezcla estándar empleada. La pérdida de la capacidad de elucidación estructural de la instrumentación IRMS hace necesario la inyección de los patrones individuales de la mezcla con el fin de obtener el tiempo de retención de cada compuesto y realizar una identificación por comparación. Sin embargo, la necesidad de disponer de cada estándar individual y

el gran tiempo de análisis requerido nos llevó a inyectar la muestra en la misma columna pero instalada en un GC-MS convencional para la identificación de cada compuesto de la mezcla en una sola inyección. El equipo empleado para la identificación tan solo disponía de un inyector split/splitless por lo que se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que las empleadas para el estudio de la discriminación del inyector cuando la inyección splitless fue evaluada.

IV.1.8.2 Evaluación del inyector: efectos de discriminación

El procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono es ideal para estudiar los efectos de discriminación en el inyector ya que las pérdidas durante esta etapa se pueden cuantificar fácilmente. De hecho, se ha empleado ya en el laboratorio para evaluar cuantitativamente las recuperaciones en el proceso de SPME [71]. Es importante resaltar que resulta complicado llevar a cabo estos estudios de discriminación en el inyector empleando otras técnicas de detección alternativas tales como FID o EI-MS, ya que la señal que proporcionan es dependiente de la fórmula química y estructura de los compuestos orgánicos. Dado que el cromatógrafo de gases del equipo GC-IRMS está equipado con un inyector convencional split/splitless y un inyector PTV, es posible el estudio de la discriminación en ambos inyectores durante esta etapa.

Las condiciones óptimas de la inyección para el análisis de PAHs ya han sido descritas con anterioridad en la bibliografía [85]. Las condiciones empleadas en este estudio para el inyector split/splitless fueron las mismas que las ya optimizadas puesto que son las que ofrecen la mejor transmisión de los analitos durante esta etapa. Sin embargo, la optimización del inyector PTV suele estar basada en la capacidad del inyector para la inyección de grandes volúmenes de muestra como técnica de preconcentración por la alta sensibilidad requerida para la cuantificación de PAHs en muestras medioambientales. El empleo del inyector PTV en modo splitless para este tipo de aplicaciones es inusual, y los parámetros que afectan a la inyección en ambos modos de trabajo PTV difieren. Por lo tanto, las condiciones empleadas en trabajos anteriores sólo se utilizaron como punto de partida para la optimización del inyector PTV en modo splitless. El objetivo de la inyección en nuestro caso es obtener la mínima discriminación de los analitos por las diferencias en sus puntos de ebullición. Los parámetros estudiados fueron: la

temperatura inicial y final del inyector, la rampa de temperaturas del inyector, la velocidad de inyección, el flujo de split, el tiempo de splitless, el tiempo isotérmico final del inyector, y el tiempo isotérmico inicial de la columna. Se observó que los parámetros que mayor influencia tienen sobre la discriminación de los compuestos en el inyector están relacionados con la temperatura inicial y final del mismo, el tiempo isotérmico a la temperatura final del inyector, y la velocidad de la rampa de calentamiento empleada.

La temperatura inicial del inyector PTV debe ser ligeramente superior a la temperatura inicial del horno cromatográfico para permitir la transmisión y preconcentración de los compuestos más volátiles en cabeza de columna y lo suficientemente baja para evitar su discriminación en el inyector. Por otro lado, la temperatura final debe permitir la vaporización completa de los compuestos de mayor punto de ebullición. La única limitación del inyector para este propósito es la temperatura máxima de trabajo de la columna cromatográfica empleada. En la Figura 22 se muestra la influencia tanto de la velocidad de la rampa de calentamiento del inyector como del tiempo isotérmico a la temperatura final del mismo en la transmisión de los 16 PAHs analizados. Los resultados están expresados a través de los factores de respuesta calculados como el área bajo el pico correspondiente a cada PAH de la mezcla respecto a su concentración en carbono ($\mu\text{g C/g}$), y normalizados respecto al primer PAH eluído de la columna cromatográfica. Los resultados para las parejas de PAHs: 2-bromonafteno y acenafteno, y dibenzo(a,h)antraceno y benzo(g,h,i)perileno, se presentan de manera conjunta ya que no fue posible una resolución en línea de base con la columna utilizada.

Tal y como se muestra en la Figura 22, el empleo de una rampa de calentamiento de $0,1^\circ\text{C/s}$ dio lugar a la discriminación de los compuestos debido a las diferencias en sus puntos de ebullición, mientras que una rampa más rápida de 10°C/s (valor óptimo) permitió una transmisión más homogénea. La velocidad de la rampa de calentamiento del inyector debe ser lo bastante rápida para que se produzca la vaporización de los analitos antes de la finalización del tiempo inicial isotérmico del horno cromatográfico y evitar así la pérdida gradual de los mismos por una vaporización incompleta en el inyector. También se observó una discriminación de los compuestos más pesados con el tiempo isotérmico final del inyector. Un tiempo de 1 min dio lugar a una severa discriminación de los cuatro

últimos compuestos eluidos mientras que el resto de los PAHs tuvieron un comportamiento similar al observado cuando el tiempo isotérmico fue de 20 minutos (tiempo óptimo). En esta ocasión no se produjo una discriminación gradual como sí ocurrió con la velocidad de calentamiento del inyector. Un tiempo isotérmico final de 1 minuto no permite la vaporización de los últimos compuestos eluidos pero es suficiente para la transmisión cuantitativa del resto de PAHs analizados.

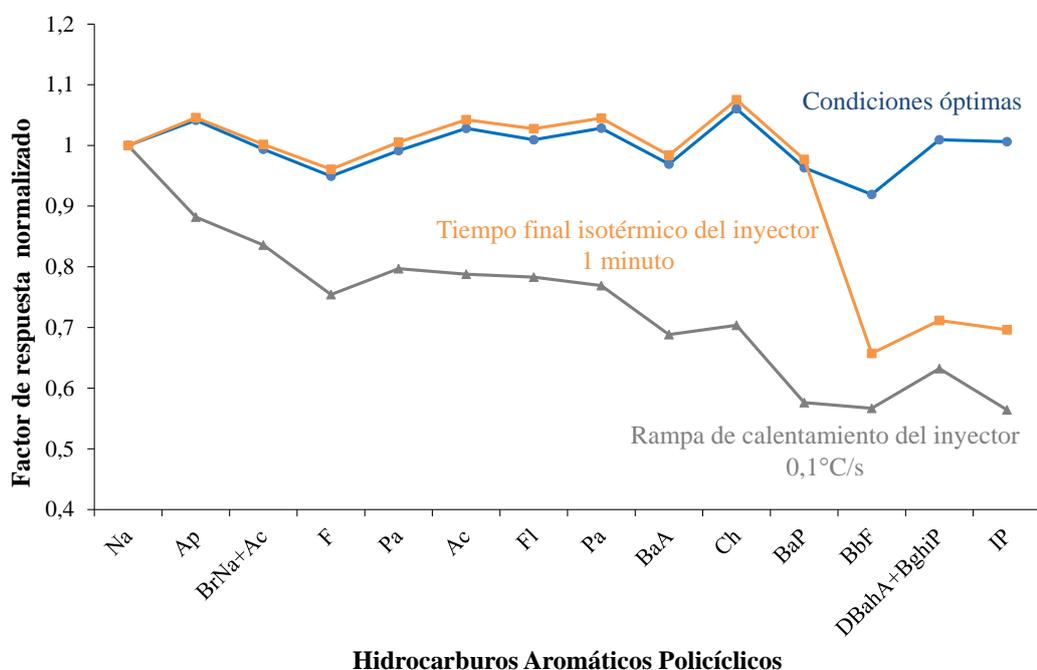


Figura 22. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por $\mu\text{g C/g}$ inyectado) de los 16 PAHs analizados, dados por orden de elución, durante la optimización de la inyección PTV.

Es necesario mencionar que los valores de los diferentes parámetros a los que se observó una mayor discriminación fueron valores límite a los que no se suele trabajar. Sin embargo, la diferencia no fue significativa con el cambio de condiciones en un rango “normal” de trabajo, por lo que se pudo concluir que la mayor contribución a la disminución de la discriminación en nuestro inyector PTV era simplemente la inyección de la muestra a bajas temperaturas.

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos para los 16 PAHs analizados empleando ambos modos de inyección en sus respectivas condiciones óptimas. Dichas condiciones se encuentran recogidas en la sección experimental de la presente Tesis doctoral (Tabla 3).

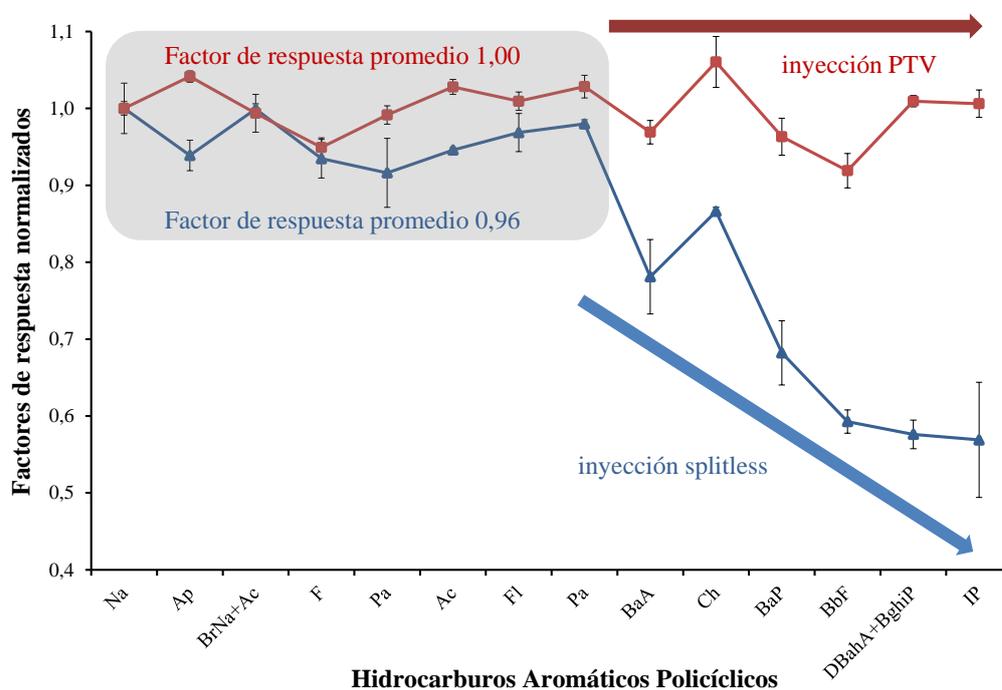


Figura 23. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por $\mu\text{g C/g}$ inyectado) de los 16 PAHs analizados, dados por orden de elución, empleando el inyector en modo splitless tanto en modo convencional como PTV. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar para $n=3$.

Como se puede ver claramente en la Figura 23, el inyector split/splitless dio lugar a una caída significativa en la transmisión de los PAHs más pesados eluidos en la parte final del cromatograma en comparación con los más ligeros. Los nueve primeros PAHs eluidos proporcionan respuestas normalizadas bastante similares obteniendo un factor de respuesta promedio de $0,96 \pm 0,3$. Por el contrario, dicho factor de respuesta disminuye abruptamente para los PAHs más pesados, donde el factor de respuesta promedio para los últimos cuatro PAHs fue de $0,58 \pm 0,01$. Por otro lado, bajo las condiciones óptimas de la inyección PTV los factores de

respuesta normalizados fueron prácticamente idénticos para los 16 PAHs analizados, obteniendo un valor promedio de $1,00 \pm 0,04$.

Por lo tanto, seleccionando las condiciones más adecuadas en el inyector PTV que no den lugar a la pérdida selectiva de los analitos de la mezcla, es posible la aplicación del procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono para proporcionar una respuesta genérica, exclusivamente dependiente de la cantidad de carbono inyectado para cada compuesto.

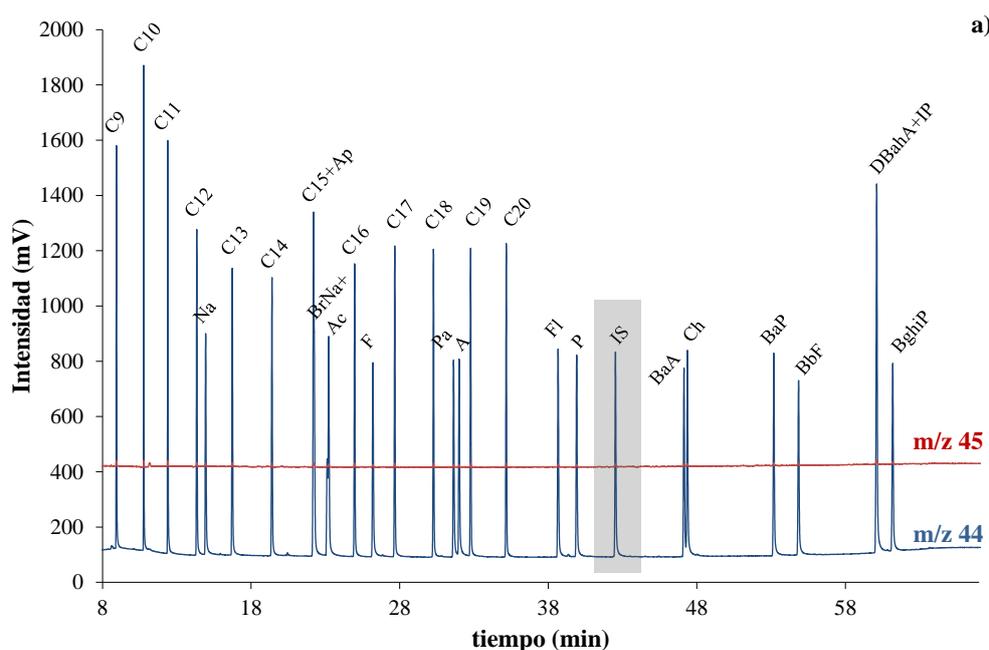
IV.1.8.3 Evaluación de la Dilución Isotópica en línea de carbono para la cuantificación de compuestos puramente orgánicos de alto peso molecular sin estándares específicos

La estrategia propuesta de Dilución Isotópica tiene la capacidad de cuantificar una mezcla compleja de compuestos orgánicos sin la necesidad de procedimientos de calibración específicos, debido a la respuesta genérica del detector por la conversión de los analitos a CO_2 . Dicha capacidad se evaluó de manera definitiva mediante la inyección de una mezcla sintética formada por 28 compuestos: los 16 PAHs empleados para la evaluación de la discriminación en el inyector y otros 12 n-alcenos (C9-C20). En este caso el intervalo de puntos de ebullición fue tan amplio como 126-525 °C. Se seleccionó un solo patrón interno genérico con el objetivo de corregir la variabilidad en la inyección y calcular el flujo másico del trazador enriquecido. El patrón interno seleccionado fue el benzo(b)fluoreno, un PAH que no está presente en la mezcla sintética y que no coeluye con ninguno de los analitos, resolviéndose cromatográficamente del resto de los compuestos bajo estudio. La concentración para los PAHs y n-alcenos fue de 8,5 $\mu\text{g C/g}$ y 10 $\mu\text{g C/g}$, respectivamente.

En la Figura 24a se muestra uno de los cromatogramas de intensidades obtenido para m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2$) y para m/z 45 ($^{13}\text{CO}_2$). La señal para m/z 44 proporciona el perfil cromatográfico de la mezcla mientras que se observa una señal continua y estable para m/z 45 a lo largo del cromatograma, procedente del trazador isotópico adicionado en línea. La mayoría de los compuestos de la mezcla se resuelven cromatográficamente en línea de base, pero la elución simultánea de dos compuestos no permite la cuantificación individual para cada uno de ellos. Ésta es claramente una de las limitaciones del procedimiento propuesto. En este caso particular, además de los cuatro PAHs que no pudieron resolverse con la columna

Resultados y discusión

empleada, el alcano pentadecano y el PAH acenafteno no se resuelven completamente. Se optó por proporcionar los resultados cuantitativos en dicho casos como la suma de ambos compuestos. El cromatograma de flujo másico obtenido tras la aplicación de la ecuación de la Dilución Isotópica en línea se muestra en la Figura 24b. La integración del área bajo el pico en el cromatograma de flujo másico obtenido y el empleo del benzo(b)fluoreno como patrón interno proporcionaron los resultados cuantitativos dados en la Tabla 8. La evaluación de los datos obtenidos demuestra una recuperación cuantitativa de los 28 compuestos de la mezcla ya que se obtuvieron valores cercanos al 100 % para la mayoría de los compuestos. La recuperación media fue del 99,5 % con un rango de variación de 91-106 %. Cabe resaltar que el nonano fue el único compuesto que presentó un error significativo (recuperación del 91 %) debido probablemente a la débil pérdida durante la eliminación del disolvente tras el tiempo de splitless en la inyección PTV o a posibles errores en la integración ya que eluye en la cola del disolvente. Además, la repetibilidad de los resultados estuvo siempre por debajo del 2,5 % (n=5).



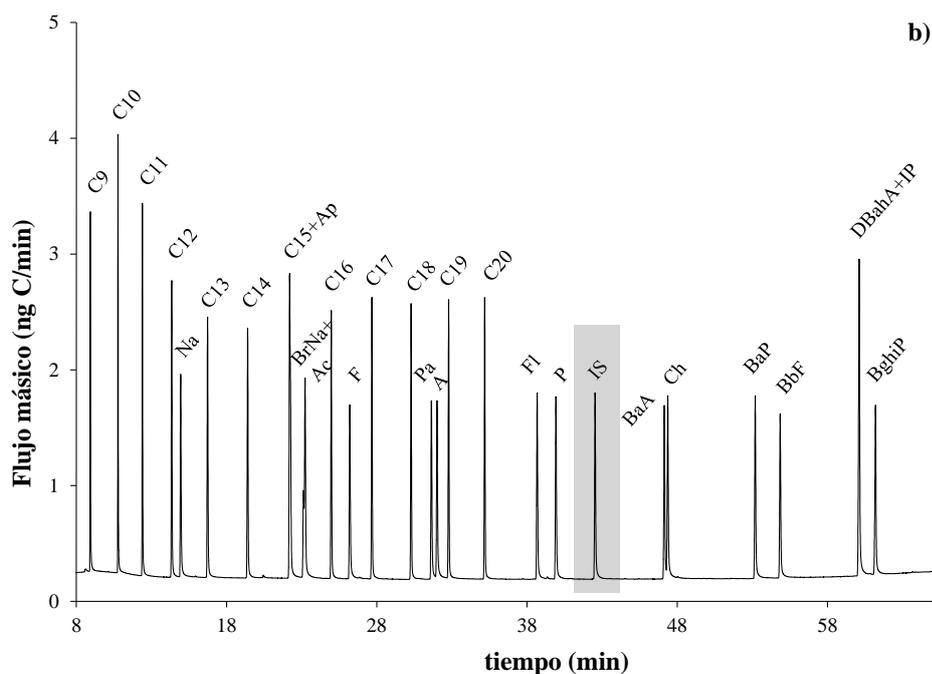


Figura 24. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla sintética de PAHs ($8,5 \mu\text{g C/g}$) y *n*-alcanos ($10 \mu\text{g C/g}$). El patrón interno empleado fue el benzo(b)fluoreno ($8,5 \mu\text{g C/g}$).

Con el fin de evaluar la respuesta genérica del detector y la necesidad del uso del flujo de trazador, se llevó a cabo la cuantificación de la mezcla sintética integrando tan sólo la señal para m/z 44 en el cromatograma de intensidades, y empleando el benzo(b)fluoreno como patrón interno para la corrección de la variabilidad en la inyección. Cabe destacar que este procedimiento es el mismo que el empleado para la cuantificación mediante GC-FID cuando la naturaleza de la muestra permite el empleo de un solo patrón interno para la cuantificación.

Los resultados numéricos obtenidos que se proporcionan en la Tabla 8 se comparan gráficamente en la Figura 25, donde se pueden observar las recuperaciones obtenidas por ambos procedimientos empleados. Las pequeñas diferencias encontradas fueron generalmente por defecto. Solamente para los últimos seis compuestos eluidos de la columna las recuperaciones obtenidas fueron por exceso y prácticamente iguales para los dos últimos. En esta ocasión la recuperación media fue del 97 % en un rango de 86-108 %. A pesar del aumento

en el error respecto al procedimiento de Dilución Isotópica en línea, el empleo de este sistema como detector genérico para cromatografía de gases podría ser considerado.

Tabla 8. Resultados cuantitativos para la mezcla sintética de PAHs y n-alcános mediante la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono y a través de la respuesta genérica del GC-IRMS para m/z 44. Se utilizó el benzo(b)fluoreno como patrón interno genérico. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para n=5.

Compuesto	Recuperación (%)	
	IDMS de carbono en línea	GC-Combustión-IRMS
Nonano	90,5 ± 1,9	85,7 ± 0,8
Decano	94,6 ± 2,1	90,3 ± 1,7
Undecano	97,0 ± 1,8	93,5 ± 0,8
Dodecano	98,7 ± 2,5	94,9 ± 0,5
Naftaleno	94,7 ± 2,6	92,9 ± 1,1
Tridecano	99,9 ± 2,0	96,5 ± 0,8
Tetradecano	98,7 ± 1,7	94,6 ± 0,7
Pentadecano+Acenaftileno	101,0 ± 2,2	98,3 ± 1,2
2-Bromonafteno+Acenafteno	99,5 ± 2,3	98,8 ± 1,0
Hexadecano	100,1 ± 2,2	96,8 ± 0,7
Fluoreno	97,6 ± 2,9	96,3 ± 0,6
Heptadecano	102,4 ± 1,9	98,8 ± 0,7
Octadecano	102,5 ± 1,8	97,7 ± 0,9
Fenantreno	99,6 ± 2,3	93,6 ± 0,5
Antraceno	102,0 ± 1,6	98,8 ± 0,3
Nonadecano	103,5 ± 2,1	98,2 ± 0,6
Eicosano	103,2 ± 2,2	99,3 ± 0,8
Fluoranteno	101,2 ± 1,9	99,9 ± 0,9
Pireno	104,8 ± 2,1	102,7 ± 0,3
Benzo (a) antraceno	96,3 ± 2,5	91,8 ± 0,6
Criseno	106,2 ± 2,0	108,4 ± 4,2
Benzo (a) pireno	98,3 ± 3,1	100,9 ± 1,4
Benzo (b) fluoranteno	93,3 ± 2,5	94,8 ± 1,6
Dibenzo (a,h) antraceno+Indeno (1,2,3-cd) pireno	100,7 ± 3,8	100,7 ± 0,7
Benzo (g,h,i) pireno	101,0 ± 3,5	101,0 ± 1

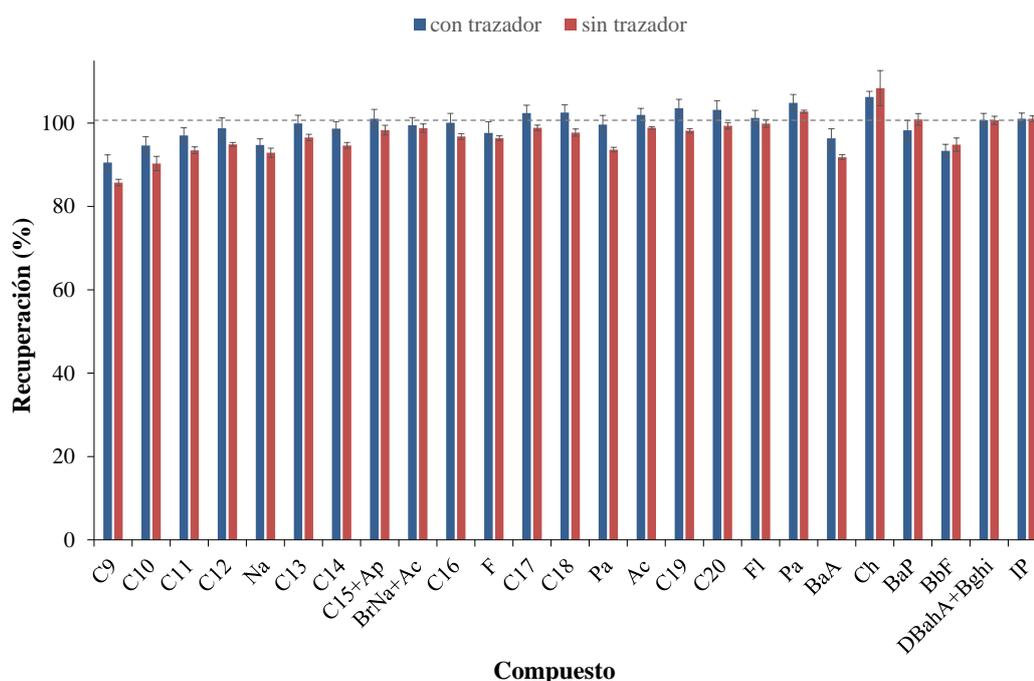


Figura 25. Comparación de las recuperaciones obtenidas para la mezcla sintética de PAHs y alcanos empleando el benzo(b)fluoreno como patrón interno mediante el procedimiento de Dilución Isotópica en línea y mediante el cálculo de factores de respuesta para m/z 44. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para $n=5$.

En la Figura 26 se muestra un zoom realizado sobre los primeros 38 minutos del cromatograma de intensidades presentado en la Figura 24, donde se puede observar cómo la señal del trazador a m/z 45 no es completamente constante. La variación de la señal en la parte inicial del cromatograma parece corregir los errores producidos para los primeros compuestos eluidos de la columna cromatográfica. Probablemente, la ionización de estos compuestos, que llegan a la fuente de ionización del MS junto con la cola del disolvente, sea menor que cuando el disolvente ya no se encuentra presente, lo que hace que la cuantificación se desvíe en esa región.

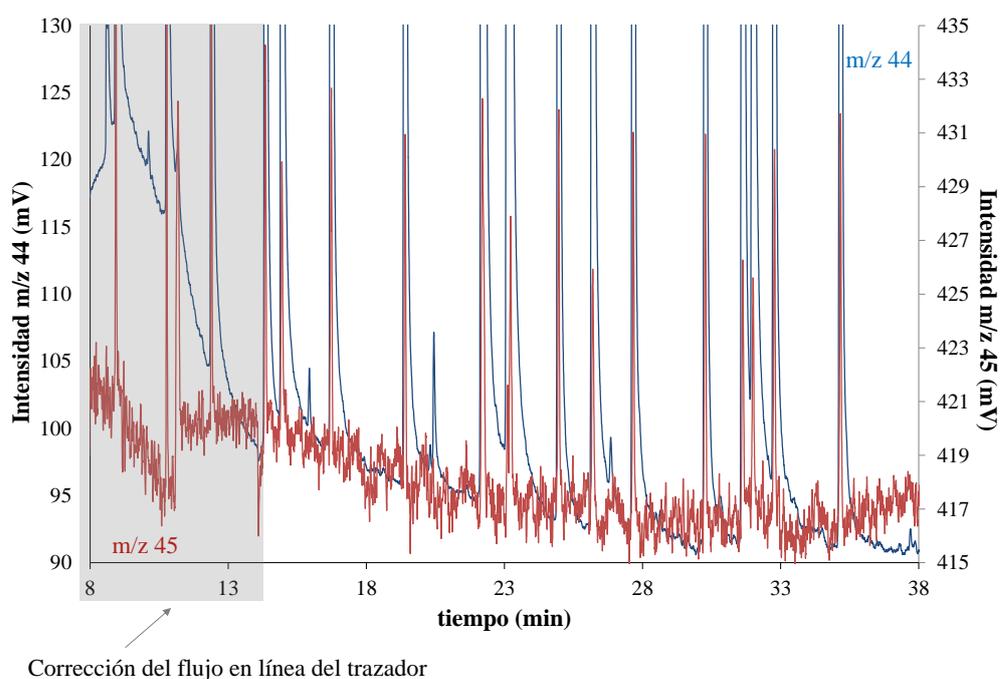


Figura 26. Ampliación del cromatograma de intensidades obtenido para mezcla sintética de PAHs y *n*-alcanos. Corrección del flujo de trazador en línea sobre los primeros compuestos orgánicos eluidos.

Este estudio confirma la capacidad del flujo de trazador enriquecido adicionado en línea para corregir pequeñas variaciones en la sensibilidad instrumental, efectos de deriva, o efectos de matriz durante el proceso de ionización en la fuente. Sin embargo, es necesario comentar que la integración de los picos en el cromatograma de flujo másico dio lugar a una incertidumbre en la concentración de un orden de magnitud mayor que la integración de los picos en el cromatograma de intensidades, tal y como se muestra en la Tabla 8. Por lo tanto, la influencia de la señal para el trazador a m/z 45 es significativa en el proceso de integración.

IV.1.9 APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO EN LÍNEA A COMPUESTOS CON HETEROÁTOMOS EN SU ESTRUCTURA

Por otro lado, es todavía necesario comprobar cómo afecta la presencia de heteroátomos comunes a la eficacia de la combustión, bajo las condiciones de transmisión completa durante la inyección, previamente validada. La presencia de heteroátomos fue un factor limitante ya que hasta el momento tan sólo se había comprobado una combustión completa para compuestos puramente orgánicos. La presencia de otros elementos diferentes al C, H y O podría afectar a la eficacia de combustión aumentando así el número de variables que podrían dar lugar a la pérdida selectiva de los compuestos hasta su mezcla con el trazador. En particular, el azufre y el cloro pueden formar sales no volátiles de manera irreversible con el cobre y el níquel, presentes en el horno y principales donores de oxígeno en la reacción de combustión, y su acumulación en el reactor puede reducir tanto la eficacia de la combustión como la vida útil del reactor. Con este objetivo se decidió aplicar la Dilución Isotópica en línea de carbono a dos familias de compuestos orgánicos con cloro y azufre en su estructura: los bifenilos policlorados (PCBs) y los benzotiofenos.

Los PCBs son compuestos sintéticos formados por dos anillos bencénicos fusionados a los que se pueden unir hasta 10 átomos de cloro. Al igual que los PAHs tienen un gran interés medioambiental. La mezcla de los 12 congéneres seleccionada para el estudio incluye 6 congéneres considerados indicadores de contaminación alimentaria por la Agencia de Salud Alimentaria Europea (EFSA), y 6 congéneres relevantes por su presencia en el medio ambiente y listados en la norma EN 61619: “Líquidos aislantes. Contaminación por policlorobifenilos (PCB). Método de determinación por cromatografía de gases con columnas capilares” (ver Tabla. A. 2 del Anexo 1). Por otro lado, el tiofeno es un compuesto heterocíclico formado por cuatro átomos de carbono y uno de azufre. Dentro de la familia de los tiofenos se encuentran los benzotiofenos y dibenzotiofenos, formados por el anillo de tiofeno fusionado con uno o dos anillos de benceno, respectivamente. Estos compuestos se encuentran de manera natural en productos del petróleo y su presencia puede ser nefasta en motores diésel, tanto por la emisión al medioambiente de los óxidos de azufre producidos durante la combustión, como por la oxidación de las diferentes componentes de los motores.

Para este estudio se seleccionaron el benzotiofeno, 3-metilbenzotiofeno y dibenzotiofeno (ver Tabla. A. 3 del Anexo 1).

Al igual que para la mezcla estándar de PAHs, fue necesario realizar la identificación de los compuestos para todas las mezclas estándar utilizadas en el presente estudio.

IV.1.9.1 Bifenilos Policlorados

Con el objetivo de estudiar la eficacia de la combustión de compuestos con heteroátomos en su estructura, se inyectó una mezcla estándar de 12 PCBs con una concentración de 15 $\mu\text{g/g}$ por compuesto. La concentración en carbono dependerá del número de átomos de cloro que contenga cada compuesto particular. Para la mezcla evaluada el rango de átomos de cloro fue de 3-8. En esta ocasión se utilizó el octadecano (9 $\mu\text{g C/g}$) como patrón interno genérico, a pesar de presentar una naturaleza completamente distinta a la de los analitos. Cabe recordar que el empleo de esta metodología permite la elección de un patrón interno independientemente de cuál sea su naturaleza, debido a que la respuesta del detector es independiente del compuesto. Por lo tanto, los únicos requisitos que debe cumplir el patrón interno son que no esté presente en la muestra y que no coeluya con ninguno de los compuestos de la mezcla. Esto representa una gran ventaja respecto a otros detectores para cromatografía de gases considerados “casi” genéricos como es el caso del FID. En este caso, es necesaria la elección de un patrón interno de la misma naturaleza que los compuestos objeto de estudio y con un número de carbonos similar, por lo que para muestras complejas será complicado encontrar una zona libre de interferencias para la elución del patrón interno.

El cromatograma de flujo másico obtenido se muestra en la Figura 27. Tal y como se puede observar, la señal de los PCBs disminuye con el tiempo de retención debido a que el número de átomos de cloro en la molécula aumenta. Puesto que todos los compuestos están presentes en la misma concentración, la concentración de carbono disminuye a medida que aumenta el número de cloros.

En esta ocasión, los picos para los congéneres 31 y 18 no se resuelven de manera completa y los resultados de la cuantificación se presentan conjuntamente. En la Figura 28 se encuentran representados los resultados cuantitativos obtenidos

expresados en recuperación a partir de los resultados teóricos. El resultado de la recuperación para todos los PCBs fue de 101-106 % con una precisión < 1% RSD (n=3). La variación de la recuperación fue aleatoria e independiente del número de cloros que contuviera el compuesto. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de átomos de cloro, incluso a gran escala, no dificulta la combustión cuantitativa de los compuestos.

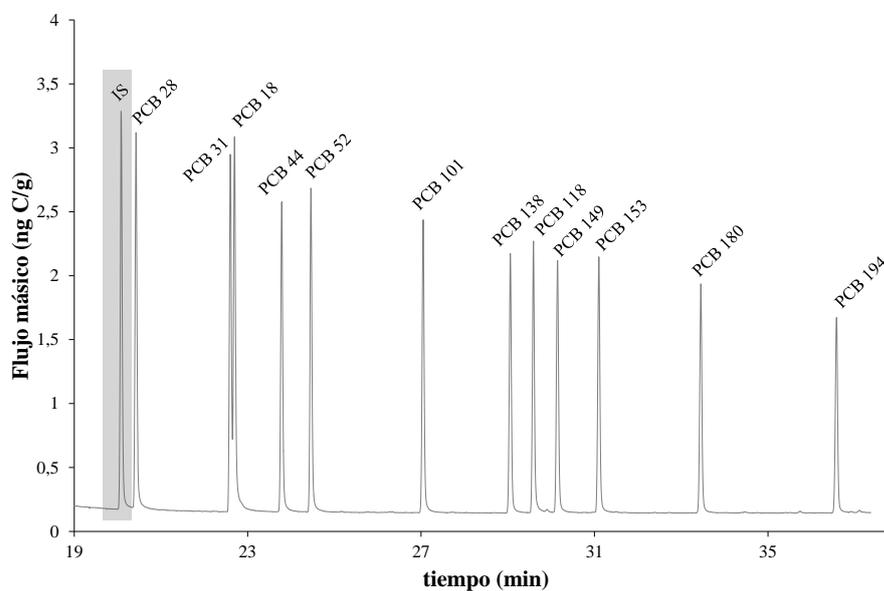


Figura 27. Cromatograma de flujo másico para la mezcla estándar de PCBs (15 $\mu\text{g/g}$). El patrón interno utilizado fue el octadecano (9 $\mu\text{g C/g}$).

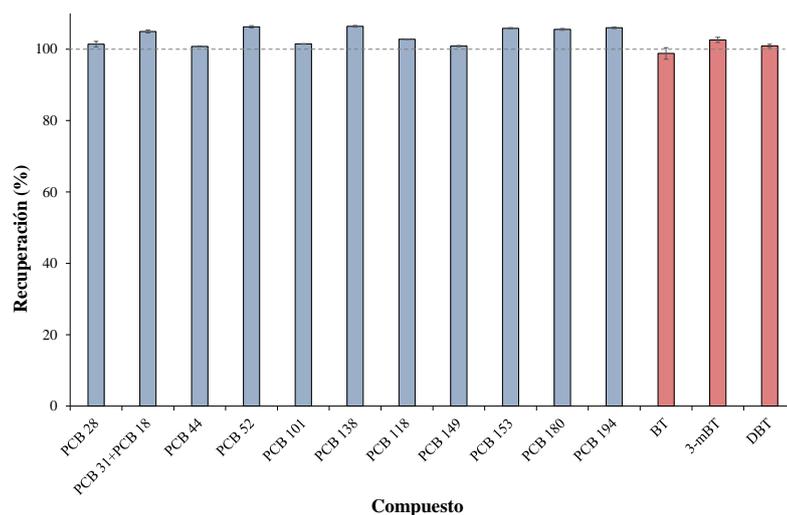


Figura 28. Recuperaciones obtenidas para la mezcla estándar de PCBs (azul) y benzotiofenos (rojo) empleando el octadecano y pentadecano, respectivamente para la obtención de los datos cuantitativos. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar para $n=3$.

IV.1.9.2 Benzotiofenos

Al igual que el cloro, el azufre puede afectar negativamente sobre la eficacia de combustión del reactor. Para evaluar los posibles efectos de combustión no cuantitativa se preparó una mezcla de benzotiofenos a partir de los patrones puros de benzotiofeno, 3-metilbenzotiofeno y dibenzotiofeno con una concentración aproximada de $7 \mu\text{g C/g}$ para cada compuesto. Como patrón interno genérico se utilizó otra vez un alcano, el pentadecano ($17 \mu\text{g C/g}$).

En la Figura 29 se muestra el cromatograma de flujo másico obtenido. La pequeña diferencia en la intensidad de los picos obtenidos para los compuestos de azufre se debe a las diferentes concentraciones empleadas.

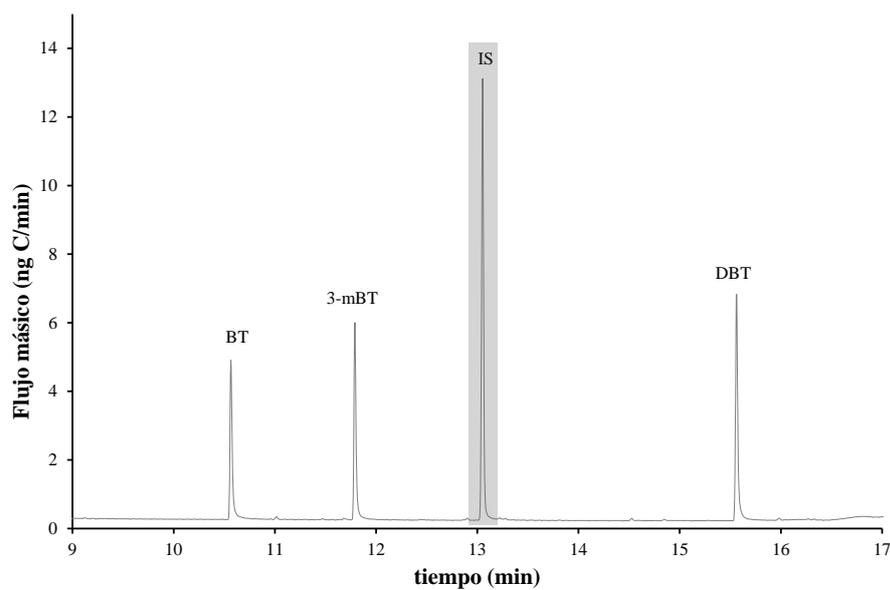


Figura 29. Cromatograma de flujo másico para la mezcla de benzotiofenos ($7 \mu\text{g C/g}$). El patrón interno utilizado fue el pentadecano ($17 \mu\text{g C/g}$).

La integración del área bajo el pico en dicho cromatograma proporcionó los resultados cuantitativos que se muestran también en la Figura 28, expresados como recuperación en % a partir de los valores teóricos. Se observó una excelente precisión ($< 2\%$ RSD, $n=3$). Los resultados de recuperación para los tres compuestos de azufre estuvieron en el rango 97-103%, lo que parece demostrar de nuevo que la presencia de heteroátomos, en este caso de S, no dificulta la combustión cuantitativa de ninguno de los compuestos analizados.

Es importante resaltar que durante los análisis de los compuestos de cloro y azufre a nivel de trazas no fue necesario una reoxidación del reactor de combustión mayor de lo habitual. Por lo tanto, la presencia de estos heteroátomos no da lugar a un deterioro de las capacidades de combustión del horno ni a una disminución de la vida útil del mismo.

Resultados y discusión

IV.2 CAPÍTULO 2

Evaluación de la respuesta independiente del compuesto en la Dilución Isotópica de carbono en línea mediante GC-IRMS. Comparación con GC-FID en la aplicación a la determinación de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAMEs) en Biodiesel.

*“No es necesario ser un experto para trabajar en cromatografía de gases, pero cuanto mayor sea tu conocimiento, mejores serán tus resultados”
(Walt Jennings, pionero en GC)*

La cromatografía de gases está considerada una técnica analítica de separación extremadamente poderosa caracterizada por la alta eficacia de separación de las columnas capilares, la automatización del proceso, los tiempos de análisis relativamente cortos, la instrumentación sofisticada, y la alta precisión y reproducibilidad en el análisis cuantitativo. Es por ello que esta técnica de separación se encuentra en la mayoría de los laboratorios analíticos.

La columna cromatográfica es el corazón del cromatógrafo de gases por ser la responsable de la separación. Sin embargo, el detector es imprescindible para la detección de los compuestos previamente separados. Una separación que proporcione la mejor resolución sería inútil sin el detector adecuado. Es por ello que la cromatografía de gases moderna emplea una amplia variedad de detectores universales, selectivos y sensibles, para la identificación y cuantificación de los compuestos de una muestra. El criterio de selección del detector más adecuado depende del objetivo del análisis.

Para la cuantificación de los compuestos orgánicos individuales de una muestra mediante GC es necesaria la determinación de los factores de respuesta del detector para cada compuesto de interés. Esto se debe a que la respuesta del detector es altamente dependiente de la estructura química del compuesto [86]. Generalmente, esta determinación se realiza a través de curvas de calibración a partir de estándares específicos de concentración conocida. Sin embargo, no siempre es posible calibrar la respuesta del detector para cada compuesto de interés. Cuando los compuestos presentan propiedades carcinogénicas, mutagénicas o se consideran peligrosos para el medio ambiente, o incluso cuando los patrones puros no se encuentran disponibles comercialmente, no es posible llevar a cabo la cuantificación de los analitos.

Algunos sistemas de detección elemental para GC, como lo son el ICP-MS y la detección por emisión atómica (AED), son capaces de generar una respuesta para un determinado elemento independientemente de la forma química de la que forme parte [87] [88]. Esta particularidad hace posible el empleo de un único patrón genérico que contenga el elemento de interés para cuantificar las distintas especies en las que ese elemento pueda estar presente en una determinada muestra. Esta estrategia de calibración, comúnmente denominada **Calibración Independiente del Compuesto** (CIC), es característica de detectores elementales donde se produce la atomización de los compuestos orgánicos, y la mayoría de las aplicaciones están basadas en la detección de un elemento para el que el detector es altamente sensible. Estos detectores elementales tienen dos limitaciones importantes. Por un lado, una muestra que contenga tan sólo compuestos orgánicos puros formados por átomos de carbono e hidrógeno, solamente podrán ser cuantificados seleccionando el carbono como elemento detectable. La sensibilidad de los detectores elementales para el carbono suele ser bastante pobre y es por ello que en la mayoría de los casos siempre se hace uso de un heteroátomo o un elemento metálico presente en el compuesto orgánico para aplicar la calibración independiente del compuesto [61]. Por otro lado, cuando la muestra contiene compuestos orgánicos de diferente naturaleza, donde el elemento detectable varía para cada uno de los compuestos de interés, la adición de un solo patrón genérico no sería suficiente para la cuantificación.

Existen otros detectores para GC considerados universales para compuestos orgánicos, donde bajo ciertas circunstancias también pueden mostrar una

sensibilidad independiente del compuesto utilizando ciertas aproximaciones predictivas. La respuesta del detector de ionización de llama (FID) se puede predecir en base a la estructura de la molécula a través del conocido número de carbonos efectivo (ECN) [89]. Así, si se conoce la identidad de todos los picos del cromatograma FID, el uso de ECN puede permitir determinaciones cuantitativas usando un solo patrón interno genérico para compensar fluctuaciones derivadas de la inyección. Este concepto también ha sido recientemente extendido y aplicado a la detección por Espectrometría de Masas con ionización electrónica para cuantificar compuestos para los que no se dispone de estándares específicos mediante GC-MS [90].

El procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono empleando un espectrómetro de masas con fuente de impacto electrónico ha demostrado ser un detector universal y genérico para compuestos orgánicos, cuya respuesta tan sólo depende del número de átomos de carbono del compuesto. Con el fin de comparar este nuevo detector para GC con los diferentes detectores establecidos, a continuación se abordarán las principales características analíticas, ventajas y limitaciones de los detectores universales para GC que permiten una calibración independiente del compuesto, empleando el carbono como elemento detectable.

IV.2.1 DETECTORES UNIVERSALES PARA COMPUESTOS ORGÁNICOS EN GC. ESTUDIO DE LA CALIBRACIÓN INDEPENDIENTE DEL COMPUESTO.

IV.2.1.1 Factor de respuesta y calibración independiente del compuesto.

Debido a la fuerte dependencia que generalmente existe entre la respuesta del detector y la naturaleza del analito, diferentes analitos con la misma concentración dan lugar a áreas de pico distintas. La determinación del factor de respuesta para cada analito permite la cuantificación del mismo con un simple cálculo. El factor de respuesta para un analito *i* se define como la relación existente entre la cantidad de analito (en peso o concentración) y su área de pico según la siguiente ecuación:

$$RF_i = w_i/A_i \quad [29]$$

Donde RF_i , w_i y A_i se corresponden con el factor de respuesta, la cantidad, y el área de pico del analito i , respectivamente. A partir de este momento nos referiremos a w_i como la concentración de analito presente en la muestra.

Una vez determinado el factor de respuesta para cada analito de interés es posible calcular su concentración simplemente multiplicando el área de pico por su factor de respuesta. Sin embargo, el área de pico puede variar entre los diferentes análisis debido a las pequeñas variaciones en los volúmenes de muestra inyectados. El empleo de factores de respuesta relativos puede corregir esta variabilidad. El factor de respuesta relativo (RRF_i) utiliza un patrón interno de referencia de concentración conocida, que se adiciona a la muestra para corregir la variabilidad en la inyección, y se define como la relación entre el factor de respuesta obtenido para el analito (RF_i) y el factor de respuesta obtenido para el patrón interno (RF_{IS}), según la siguiente ecuación [30]:

$$RRF_i = \frac{A_{IS}}{A_i} \times \frac{w_i}{w_{IS}} \quad [30]$$

En donde A_{IS} y w_{IS} son el área y la concentración del patrón interno utilizado. Por lo tanto, la concentración del analito en la muestra se puede obtener directamente a través de la ecuación [31].

$$w_i = \frac{RRF_i \times w_{IS} \times A_i}{A_{IS}} \quad [31]$$

Este tipo de calibración asume un factor de respuesta constante con la concentración del analito. Por lo tanto, se recomienda la realización de una calibración externa a diferentes concentraciones de analito, al menos durante la validación de la metodología para evaluar la respuesta del sistema en el rango de concentración deseada.

Cuando los estándares específicos no se encuentran disponibles comercialmente, la determinación de los factores de respuesta para cada analito no es posible. Es entonces cuando los detectores que ofrecen una respuesta independiente del compuesto juegan un papel fundamental en la cuantificación de los analitos. Asumiendo que un detector genérico y universal para compuestos orgánicos ofrece una respuesta tan sólo dependiente del número de átomos de carbono

presente en el compuesto, el factor de respuesta respecto a su concentración en carbono será el mismo para todos los compuestos detectados. De esta manera, el factor de respuesta relativo es igual a 1 y la concentración en carbono del analito en la muestra se reduce a la siguiente expresión:

$$C_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \times C_{IS} \quad [32]$$

En donde C_i y C_{IS} son las concentraciones en carbono del analito y del patrón interno, respectivamente. Finalmente, conociendo la estructura molecular tanto del analito como del patrón interno empleado, la concentración del analito en la muestra se puede calcular a partir de la ecuación [33]:

$$c_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \times \frac{n_{IS}}{n_i} \times \frac{MW_i}{MW_{IS}} \times c_{IS} \quad [33]$$

En donde n_i , n_{IS} , MW_i y MW_{IS} se corresponden con el número de átomos de carbono y los pesos moleculares del analito y patrón interno, respectivamente, mientras que c_i y c_{IS} son las concentraciones del analito y del patrón interno utilizado. Por lo tanto, la estrategia de la calibración independiente del compuesto permite la cuantificación directa del analito sin la necesidad de estándares específicos ni la realización de calibraciones externas a partir de la ecuación [33]. Es importante tener en cuenta que esta ecuación es la misma que la empleada en el procedimiento de la dilución isotópica de carbono en línea (ecuación [25]).

IV.2.1.2 Detector de ionización de llama (FID)

El detector de ionización de llama ha sido el detector más utilizado desde su introducción en 1958 [91] debido a las magníficas características analíticas que presenta. Este detector muestra un amplio rango lineal de casi 7 órdenes de magnitud, una alta sensibilidad (10^{-12} g C/s), bajos niveles de ruido, una excepcional fiabilidad y un comportamiento “casi” universal para compuestos orgánicos. De hecho, está considerado como el detector más universal para compuestos orgánicos en cromatografía de gases.

El funcionamiento de este detector es muy sencillo. La pieza central del detector está formada por una llama de hidrógeno/aire que por sí sola no produce iones (Figura 30). Cuando los compuestos orgánicos eluidos de la columna

cromatográfica llegan a la llama se inicia un conjunto de complejas reacciones donde tiene lugar la transformación de los compuestos. La alta concentración de radicales de hidrógeno permite la hidrogenación de los dobles enlaces y la rotura de los enlaces carbono-carbono. Prácticamente, todos los átomos de carbono se convierten en metano, que después se oxida a dióxido de carbono en la parte más oxidante de la llama [92].

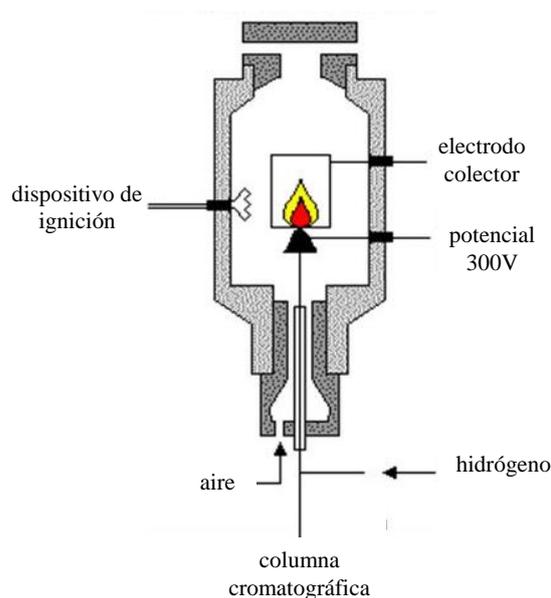


Figura 30. Esquema del detector de ionización de llama.

Durante el proceso de oxidación, aproximadamente un átomo de carbono por cada millón de átomos de carbono existentes se transforma en un ion de acuerdo con la siguiente reacción:



El movimiento de los iones se mide como la corriente eléctrica generada entre dos electrodos que son la base metálica de la llama y el colector circular metálico situado en la parte superior. La corriente generada por el fondo es extremadamente baja debido a que la llama hidrógeno/aire apenas produce iones por sí misma. Por lo tanto, los iones generados por los analitos se pueden detectar de manera eficaz en el rango de los picoamperios.

Los átomos de carbono que no se transforman en metano bajo las condiciones de trabajo del FID no se pueden detectar. Desgraciadamente, existe un número limitado de pequeñas moléculas tales como el monóxido de carbono, dióxido de carbono, disulfuro de carbono, formaldehído y ácido fórmico, que el FID no es capaz de detectar. Esta es la razón de la denominación de detector “casi” universal del FID.

IV.2.1.2.1 Estimación de los factores de respuesta para la detección FID: calibración independiente del compuesto.

Tras la aparición del detector FID en GC, fue necesario muy poco tiempo para observar la existencia de una fuerte correlación entre la respuesta molar del detector y el número de átomos de carbono de los compuestos orgánicos puros (formados únicamente por C e H) y sencillos [93]. Esta extraordinaria capacidad del detector FID provocó una rápida respuesta en el estudio de otros compuestos orgánicos de mayor complejidad estructural [94] [95] así como una mayor inquietud por el conocimiento del mecanismo de ionización en la llama.

Los factores de respuesta relativos obtenidos en varios estudios de diferentes series homólogas de compuestos orgánicos fueron significativamente diferentes. Los compuestos utilizados como patrones internos siempre fueron hidrocarburos alifáticos o aromáticos sencillos. La ecuación utilizada para el cálculo de los RRF_i (ecuación [30]) está basada, por definición, en un factor de respuesta de 1.0 para el patrón interno de referencia. De esta manera, el valor numérico del factor de respuesta relativo es igual a la concentración relativa del compuesto, necesaria para generar la misma respuesta que el patrón interno de referencia. Un factor de respuesta mayor que 1 significa que el detector es menos sensible para el compuesto que para el patrón interno. Por lo tanto, para conseguir una calibración independiente del compuesto el área observada debería estar multiplicada por un número mayor que 1, para obtener el mismo valor de área por unidad de concentración para el compuesto y para el patrón interno de referencia.

Para todos los compuestos estudiados se observó una menor sensibilidad del detector FID que para el patrón interno de referencia. Para explicar las diferentes respuestas observadas se empleó un nuevo concepto basado en la estructura molecular de los compuestos: el *Número de Carbonos Efectivo* (ECN).

El factor de respuesta relativo en unidades de concentración se puede relacionar con el factor de respuesta relativo molar ($RRF_{i-molar}$) a través de la siguiente ecuación [6]:

$$RRF_{i-molar} = RRF_i \times \frac{MW_{IS}}{MW_i} \quad [34]$$

Se observó que el factor de respuesta molar para los hidrocarburos alifáticos y aromáticos era proporcional al número de átomos de carbonos del compuesto. Por lo tanto, el factor de respuesta relativo, en unidades de concentración, se podría relacionar con el número de átomos de carbono del compuesto de interés (n_i) y del patrón interno (n_{IS}) a través de la ecuación [35]:

$$RRF_i = \frac{n_{IS}}{n_i} \times \frac{MW_i}{MW_{IS}} \quad [35]$$

De esta manera, se podría determinar el factor de respuesta relativo sin la necesidad de calcularlo experimentalmente, permitiendo la calibración independiente del compuesto sin estándares específicos ni gráficas de calibración.

Por otro lado, se observó que el factor de respuesta relativo molar, para aquellos compuestos que presentaban un grupo carbonilo en su estructura, era proporcional al número de átomos de carbonos del compuesto menos 1. Por lo tanto, la ecuación [35] tomaría la siguiente forma:

$$RRF_i = \frac{n_{IS}}{n_i - 1} \times \frac{MW_i}{MW_{IS}} \quad [36]$$

El factor de respuesta relativo molar para todos los compuestos orgánicos estudiados fue proporcional a un valor constante que dependía de la contribución de los átomos de carbono en los diferentes grupos funcionales. El sumatorio de la contribución de cada átomo de carbono se consideró el número de carbonos efectivo que la llama es capaz de transformar eficazmente en los iones que dan lugar a la respuesta del detector FID. Así, la contribución de los átomos de carbono de un hidrocarburo alifático es de 1, mientras que la contribución es nula cuando el átomo de carbono está formando parte de un grupo carbonilo en

aldehídos y cetonas. La contribución al ECN de los diferentes grupos funcionales, tras los primeros estudios realizados, se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Contribución del número de carbonos efectivo empleado para la predicción de los factores de respuesta en GC-FID.

Átomo/grupo funcional	Contribución ECN
C-alifático	1
C-aromático	1
C-olefínico	0,95
C-nitrilo	0,3
C-carbonilo	0
C-carboxilo	0
O-alcohol primario	-0,6
O-alcohol secundario	-0,75
O-alcohol terciario	-0,25
O-éter	-1
N-amina primaria	-0,6

El factor de respuesta relativo, en concentración, cuando se emplea el ECN viene dado por la ecuación [37]:

$$RRF_i = \frac{ECN_{IS}}{ECN_i} \times \frac{MW_i}{MW_{IS}} \quad [37]$$

Sustituyendo este valor de RRF_i en la ecuación [30], se obtiene la ecuación básica de la calibración independiente del compuesto para GC-FID:

$$w_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \times \frac{ECN_{IS}}{ECN_i} \times \frac{MW_i}{MW_{IS}} \times w_{IS} \quad [38]$$

Esta ecuación es equivalente a la ecuación [33], correspondiente a la ecuación de la calibración independiente del compuesto para un detector verdaderamente genérico. La única diferencia radica en la sustitución del número de carbonos del compuesto orgánico por el número de carbonos efectivo para el detector FID.

Es importante resaltar que cuando los analitos de interés no contienen en su estructura ninguno de los grupos funcionales que dan lugar a una menor ionización en la llama, o cuando todos los analitos presentan una estructura molecular común, la elección del patrón interno adecuado hará posible la calibración independiente del compuesto sin la necesidad del empleo del número de carbonos efectivo.

Se ha dedicado mucho tiempo y esfuerzo en la investigación del uso de factores de respuesta basados en ECN para la cuantificación absoluta mediante GC-FID, desde su aparición hace ya más de 50 años [2,17-21, 2013]. Se han logrado asignar valores de contribución al ENC a todos los grupos funcionales y heteroátomos existentes en los compuestos orgánicos analizables por GC. Además, también se han conseguido determinar los factores de respuesta relativos en compuestos derivatizados [1985]. Sin embargo, la asignación de una contribución fija a un determinado carbono, grupo funcional o heteroátomo no ofrece demasiada fiabilidad debido a una serie de variables a tener en cuenta. Los factores de respuesta pueden sufrir desviaciones significativas dependiendo de la pureza del compuesto, el modo de inyección, la descomposición y discriminación de los compuestos durante la etapa de inyección, la adsorción inespecífica de los compuestos en la columna cromatográfica, los efectos de matriz durante los procesos de hidrogenólisis e ionización en la llama, y el diseño del propio detector. Por otro lado, el desconocimiento parcial del mecanismo del proceso de ionización de los compuestos en la llama impide el empleo directo del número de carbonos efectivo, tabulado para los distintos grupos funcionales, a nuevos compuestos orgánicos. La predicción del factor de respuesta a través del ECN puede dar lugar a datos cuantitativos erróneos para compuestos para los que no se ha estudiado su ionización en la llama previamente. Es por ello que existe un gran número de trabajos publicados donde se puede encontrar el ECN para cada compuesto orgánico particular [2008]. Sin embargo, aun empleando los factores de respuesta tabulados y utilizando las mismas condiciones cromatográficas, los factores de respuesta pueden variar dependiendo del diseño del GC-FID utilizado.

El empleo del número de carbonos efectivo para el cálculo de los factores de respuesta, sin la necesidad de calibraciones externas, lleva asociada pues una pérdida de exactitud en los datos cuantitativos. Sin embargo, la gran ventaja de utilizar un solo patrón genérico para la cuantificación de un amplio número de

compuestos de diferente naturaleza, tiene una gran aplicación en la industria del petróleo y los biocombustibles. La destilación fraccionada del petróleo da lugar a diferentes tipos de combustibles (gasolinas, querosenos y gasóleos, entre otros) formados por una gran variedad de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. El factor de respuesta molar de estos compuestos es directamente proporcional a su número de carbonos. Por lo tanto, la pérdida de exactitud solamente estará relacionada con la discriminación de los compuestos durante la etapa de inyección, debido a la diferencia en sus puntos de ebullición. Los compuestos orgánicos recogidos en cada fracción tienen un rango de puntos de ebullición bastante estrecho, por lo que la discriminación en el inyector se minimiza. El empleo de un solo patrón genérico en este tipo de muestras puede proporcionar datos de alta calidad, reduciendo considerablemente el tiempo del análisis y su coste.

Recientemente [96], el empleo de la calibración independiente del compuesto mediante GC*GC-FID permitió la cuantificación de 150 compuestos orgánicos en una muestra de biocombustible, utilizando tan sólo dos patrones internos genéricos para la cuantificación. El cálculo de los factores de respuesta se realizó a través del empleo del número de carbonos efectivo. Para verificar que los factores de respuesta empleados estaban en concordancia con los proporcionados por el equipo utilizado, se calcularon experimentalmente los factores de respuesta para 19 de los compuestos de la mezcla, pertenecientes a familias de diferente naturaleza. La diferencia entre el factor de respuesta experimental y el calculado fue menor del 5% para 17 de los 19 compuestos. A pesar de poder cometer un error en la cuantificación de hasta un 15%, el uso de la calibración independiente del compuesto mediante el cálculo predictivo de los factores de respuesta está muy bien considerado en este tipo de aplicaciones.

IV.2.1.2.2 Métodos quimiométricos para la estimación de los factores de respuesta sin estándares específicos mediante GC-FID

En 1989, Musurrama y col. [97] aplicaron un método quimiométrico, basado en una aproximación por mínimos cuadrados parciales, para correlacionar los factores de respuesta relativos determinados por Dietz y col. [98] para una mezcla de 100 compuestos bencénicos y piridínicos sustituidos, empleando 17 tipos diferentes de descriptores moleculares. Estos descriptores moleculares fueron: (1) el peso molecular, (2) el número de átomos (C, H y O), y (3) el número de grupos

funcionales (alquenos, carbonilos, alcoholes, éteres,...). Los factores de respuesta se pudieron predecir con una desviación media del 5% para aquellos compuestos que se ajustaron al modelo desarrollado. Este modelo predictivo se consideró especialmente útil para la determinación de los factores de respuesta de compuestos en muestras complejas para los que no se dispone de estándares específicos, con un alto grado de fiabilidad.

Recientemente [99] y con el mismo objetivo, se ha empleado un nuevo descriptor molecular para la determinación de los factores de respuesta relativos: la entalpía de combustión (ΔH°_c). En un primer paso, se calculó la entalpía de combustión de cada compuesto a través de un análisis de regresión lineal, basado en la fórmula molecular del compuesto. En un segundo paso, se observó una excelente correlación entre estas entalpías de combustión y los factores de respuesta relativos calculados experimentalmente. Así, los factores de respuesta se pudieron predecir a partir de la fórmula molecular del compuesto. Con una base de datos de 351 compuestos, aproximadamente el 60% de los compuestos mostraron una diferencia entre el factor de respuesta calculado y el predicho menor del 5%, mientras que para el 80% de ellos, esta diferencia fue menor del 10%. Posteriormente, este método se simplificó a una sola ecuación, proporcionando el mejor ajuste de los diferentes descriptores moleculares utilizados [100].

Estos métodos quimiométricos, basados en ecuaciones predictivas, son de gran utilidad cuando no se dispone de todos los estándares específicos de una muestra compleja. A través de la correlación entre los factores de respuesta determinados experimentalmente y una serie de descriptores moleculares se generan ecuaciones predictivas, mediante las cuales es posible calcular el factor de respuesta de los compuestos para los que no se dispone de estándares específicos. Sin embargo, a pesar de poder obtener datos cuantitativos es necesario el uso de estándares de calibración, perdiendo así el carácter genérico de la detección.

IV.2.1.3 Espectrómetro de Masas con fuente de ionización electrónica (EI-MS)

La Espectrometría de Masas con fuente de ionización electrónica ha sido junto con la detección FID la técnica de detección más utilizada en cromatografía de gases. Además de proporcionar información cuantitativa, su capacidad de

elucidación estructural la convierte en una poderosa herramienta para el análisis de compuestos orgánicos en una amplia variedad de muestras. Además, su versatilidad, *selectividad*, bajo coste operacional, y alta sensibilidad, han provocado una fuerte tendencia en la implantación de la técnica en la mayoría de los laboratorios de todo el mundo.

Obviamente, su selectividad y habilidad de elucidación estructural tienen como consecuencia *una respuesta fuertemente dependiente de la especie*, y este grado de dependencia se puede relacionar directamente con el proceso de ionización electrónico en la fuente.

IV.2.1.3.1 Fuente de ionización electrónica

La fuente de ionización electrónica consiste en una cámara de alto vacío que contiene dos filamentos de wolframio. En la Figura 31 se puede observar un esquema de la fuente de EI.

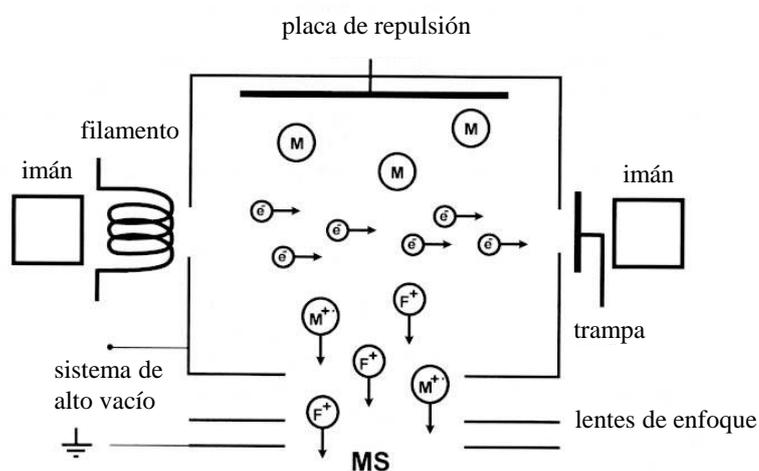
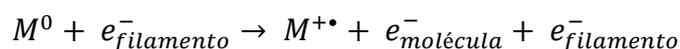


Figura 31. Diagrama de una fuente de ionización electrónica en espectrometría de masas.

Los electrones generados por la emisión térmica del filamento caliente son atraídos por un potencial aplicado, normalmente 70 eV, entre dicho filamento y un ánodo. Las moléculas gaseosas procedentes del eluyente cromatográfico colisionan perpendicularmente con los electrones generados, y esta colisión es la responsable de la ionización de las moléculas por la pérdida de electrones debido

a repulsiones electrostáticas. Las moléculas orgánicas se ionizan de acuerdo con la siguiente reacción:



Los iones positivos formados son atraídos por una placa de aceleración y repelidos por una placa de repulsión mediante una diferencia de potencial aplicada entre ambas con el objetivo de introducirlos en el analizador de masas.

El ion radical $M^{+\bullet}$ se denomina ion molecular y proporciona una valiosa información analítica ya que tiene el mismo peso molecular que la molécula original. Los iones moleculares, al ser radicales y poseer una elevada energía, son lábiles y pueden sufrir *procesos de fragmentación* que dependen, y son *específicos, de cada molécula orgánica original*. Los fragmentos moleculares formados proporcionan información estructural adicional que se utiliza para confirmar la presencia de la molécula en estudio. Para la mayoría de las moléculas orgánicas, el rendimiento de la ionización dentro de la fuente es máximo en la región de los 70 eV, y la fragmentación producida es altamente reproducible independientemente del espectrómetro de masas utilizado. Existen por tanto, bibliotecas universales de fragmentación que pueden ser utilizadas para realizar identificaciones rápidas y fiables de compuestos desconocidos.

IV.2.1.3.2 Capacidad del detector EI-MS para la aplicación de la calibración independiente del compuesto

El detector EI-MS puede considerarse un detector “universal” para compuestos orgánicos en GC por su capacidad para detectar cualquier compuesto orgánico presente en una muestra. Sin embargo, debido a la especificidad de su respuesta es necesario el empleo de estándares analíticos específicos y la realización de calibraciones externas para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos orgánicos. El número de posibles compuestos orgánicos y sus isómeros aumenta rápidamente con su peso molecular, y como consecuencia es imposible disponer de todos los estándares específicos para poder realizar calibraciones externas. A este tipo de compuestos para los que no existen estándares certificados con bajas incertidumbres asociadas se les denomina comúnmente CLASS (*Compounds Lacking Authentic Standards or Surrogates*).

En los últimos años, se ha dedicado un gran esfuerzo en el desarrollo de ecuaciones predictivas que permitan la cuantificación de estos compuestos CLASS mediante GC-EI-MS. A pesar de que sería posible la cuantificación de estos compuestos mediante GC-FID, esto conllevaría la pérdida de la capacidad de elucidación estructural de la instrumentación GC-EI-MS, necesaria para la identificación de la pureza cromatográfica del compuesto de interés. Basándose en los métodos quimiométricos y ecuaciones predictivas desarrolladas para la cuantificación de compuestos CLASS mediante GC-FID, se ha desarrollado una aproximación basada en el número de carbonos efectivo para GC-EI-MS con resultados prometedores. Esta aproximación resultó ser una herramienta muy atractiva para la cuantificación directa de CLASS en ausencia de estándares específicos. La diferencia porcentual media encontrada entre el factor de respuesta experimental y el calculado a través de la aproximación desarrollada para una mezcla de 54 CLASS fue de $19,2 \pm 16,1\%$ cuando se utilizó un MS de tipo TOF, y de $28,2 \pm 27,6\%$ cuando el MS fue de tipo cuadrupolo (Q). Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos a través de anteriores aproximaciones predictivas basadas tan sólo en el número de átomos de carbono del compuesto. En este caso, la diferencia porcentual ascendía a $53,4 \pm 53,3\%$ y de $61,7 \pm 81,3\%$ para TOF-MS y Q-MS, respectivamente. Por lo tanto, la aproximación basada en ECN proporciona un mejor ajuste en la predicción de los factores de respuesta [101]. Además, la desviación obtenida empleando la predicción basada en ECN disminuye significativamente cuando la comparación se limitó a 26 de los 54 compuestos de la mezcla con un número de carbonos mayor o igual a 4. En esta ocasión, los errores relativos fueron de $9,84 \pm 7,28\%$ (TOF-MS) y de $16,8 \pm 8,35\%$ (Q-MS).

A pesar de los resultados obtenidos, es bien conocido que la sensibilidad relativa del GC-EI-MS está fuertemente comprometida por los efectos combinados del método de inyección, el tipo de matriz, el pretratamiento de la muestra, y las propiedades físico-químicas de cada compuesto individual. Pequeñas variaciones en los factores de respuesta pueden tener una influencia significativa en el valor de los ECN calculados y dar lugar a grandes errores en la cuantificación. Es necesario por tanto el desarrollo de una extensa base de datos con nuevos tipos de compuestos orgánicos, métodos de inyección, pretratamientos de muestra y diferentes tipos de matriz que permitan un estudio más completo de la sensibilidad

relativa de la instrumentación GC-EI-MS para poder extender el campo de aplicación de este tipo de aproximaciones predictivas.

IV.2.1.4 Detector de Emisión Atómica (AED)

El detector de emisión atómica es un detector relativamente joven en GC, ya que su comercialización no se realizó hasta 1989. Se caracteriza por proporcionar una detección altamente sensible y selectiva que proporciona información específica del elemento. Es capaz de detectar 26 elementos, entre ellos el carbono, y está considerado un detector universal para compuestos orgánicos. Este detector proporciona límites de detección en el rango de los pg/s para muchos de los elementos detectables, una respuesta lineal de 3-5 órdenes de magnitud y una selectividad frente al carbono del mismo orden de magnitud.

La respuesta de este detector se basa en la atomización de las moléculas del analito (Figura 32). Los compuestos orgánicos que eluyen de la columna cromatográfica se introducen en un plasma de He a alta temperatura mantenido por radiación microondas. La temperatura del plasma es lo suficientemente alta para fragmentar todos los compuestos orgánicos en los átomos que los constituyen. Estos átomos excitados producen líneas de emisión características del elemento. La radiación emitida se colima y se refleja en una red de difracción, descomponiéndose en líneas de emisión individuales que se recogen en una serie de fotodiodos capaces de detectar la radiación emitida en un rango de 170-837 nm. Los fotodiodos pueden medir hasta 4 elementos simultáneamente en un rango de longitudes de onda de 20-25 nm.

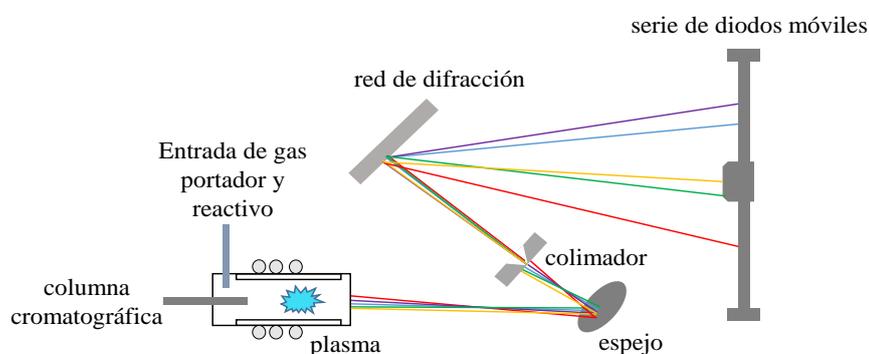


Figura 32. Esquema del detector de emisión atómica (AED) para GC.

A menudo es necesario adicionar un flujo de gas reactivo, normalmente H₂ y/o O₂, al flujo del gas plasmógeno para mejorar la detección de algunos elementos. Entre estos elementos se encuentran el C, S, H, Cl, P y Sn.

IV.2.1.4.1 Calibración independiente del compuesto en GC-AED

La capacidad de este sistema de detección para obtener resultados cuantitativos sin patrones ha quedado patente en distintas aplicaciones en análisis de especiación y en la determinación de compuestos orgánicos con heteroátomos en su estructura. La elección de un elemento distinto al carbono para la cuantificación de los compuestos orgánicos da lugar a una detección más selectiva, obteniendo cromatogramas más sencillos en muestras complejas. Sin embargo, el detector de emisión atómica también ha proporcionado una detección universal e independiente del compuesto para compuestos orgánicos cuando se detecta carbono.

La aplicación de la calibración independiente del compuesto del detector AED para carbono se ha demostrado para la determinación de hidrocarburos en mezclas modelo a partir de la relación carbono-hidrógeno. De esta manera, fue posible la cuantificación de los compuestos sin la necesidad de conocer su estructura ni su fórmula molecular, a partir de la siguiente ecuación:

$$w_i = w_{IS} \times \left(1 + \frac{1}{AW_C} \frac{A_{H,i}}{A_{C,i}} \times \frac{A_{C,IS}}{A_{H,IS}} \times \frac{n_{H,IS}}{n_{C,IS}} \right) \quad [39]$$

En donde w_i y w_{IS} son las concentraciones del compuesto y del patrón interno; $A_{C,i}$, $A_{H,i}$ y $A_{C,IS}$, $A_{H,IS}$ son las áreas bajo el pico para el carbono y el hidrógeno en el compuesto y el patrón interno, respectivamente; $n_{C,IS}$ y $n_{H,IS}$ son el número de carbonos e hidrógenos en el compuesto utilizado como patrón interno; y AW_C es el peso atómico del carbono. Para aumentar la sensibilidad de la respuesta del detector respecto al carbono es necesario adicionar un flujo constante de O₂ sobre el gas plasmógeno [102]. El flujo de O₂ necesario para alcanzar una sensibilidad similar a la del resto de los elementos detectables suele estar optimizada por el fabricante. Bajo estas condiciones experimentales se observó una fuerte dependencia entre los factores de respuesta relativos y la concentración del compuesto, obteniendo errores cuantitativos de hasta un 30%. Sin embargo, trabajando en el valor máximo del flujo de O₂ permitido por el equipo, el error

cuantitativo disminuyó abruptamente, llegando a obtener una exactitud en la cuantificación de tan sólo un 6% en el peor de los casos. Sin embargo, esta exactitud sólo fue posible sacrificando la sensibilidad del detector para el carbono, aumentando en un orden de magnitud respecto al resto de los elementos detectados.

IV.2.1.5 Comparación crítica

Como hemos visto, existen diferentes estrategias para llevar a cabo la calibración independiente del compuesto para Carbono en detectores considerados universales para compuestos orgánicos en GC.

La respuesta de los detectores moleculares ha mostrado una alta proporcionalidad con el número de átomos de carbono del compuesto. Sin embargo, la presencia de diferentes grupos funcionales y heteroátomos provocan variaciones en los factores de respuesta relativos observados. Por lo tanto, es necesario el empleo del número de carbonos efectivo o la determinación de ecuaciones predictivas basadas en diferentes descriptores moleculares para llevar a cabo la calibración independiente del compuesto.

Las aproximaciones predictivas basadas en el ECN mediante EI-MS son aún muy tempranas para poder medir el grado de aplicabilidad. Sin embargo, se puede considerar un procedimiento semicuantitativo para compuestos CLASS en muestras medioambientales.

Por otro lado, la CIC ha sido una estrategia de calibración muy estudiada en GC-FID. El interés por encontrar un detector universal, absoluto y cuantitativo para cromatografía de gases aumentó el esfuerzo por comprender el mecanismo de este detector. Estos estudios corroboraron la existencia de un gran número de variables que afectaban a los factores de respuesta relativos, dando lugar a la pérdida de exactitud cuando se empleaba el ECN para predecir los factores de respuesta. Desafortunadamente, esta pérdida de exactitud impidió la extensión de este procedimiento de cuantificación sin estándares específicos. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias esta aproximación ha ofrecido resultados altamente satisfactorios en términos de exactitud. Se conoce que la respuesta del detector FID es máxima y estable para los hidrocarburos alifáticos. En este caso, las únicas variables que pueden afectar a los factores de respuesta relativos son la posible

discriminación de los compuestos en el inyector, los efectos de matriz durante la etapa de hidrogenólisis y oxidación en la llama, y los cambios de sensibilidad instrumental durante el análisis. Por lo tanto, una muestra sencilla con hidrocarburos alifáticos en un rango próximo de puntos de ebullición, o bien el empleo de un modo de inyección que no dé lugar a la discriminación de los compuestos, se podría cuantificar de manera exacta y precisa empleando la CIC. Del mismo modo, la elección de un patrón interno genérico que posea las mismas características estructurales que los analitos puede dar lugar a una CIC con bajos errores cuantitativos. Por lo tanto, la posibilidad de una CIC en GC-FID que ofrezca buenos resultados cuantitativos dependerá de la naturaleza de la muestra y de las condiciones del análisis. Además, una ventaja que ofrece este detector para la CIC es su amplio rango lineal. Como se puede observar en la Tabla 10, el detector FID es el que posee el mayor rango lineal de los detectores universales estudiados. Este amplio rango lineal del detector FID permitirá llevar a cabo la CIC para la cuantificación de compuestos orgánicos mayoritarios y minoritarios en un mismo análisis con una diferencia en la concentración de hasta 7 órdenes de magnitud.

El detector elemental AED ha proporcionado una sensibilidad universal independiente del compuesto para compuestos orgánicos a través de la relación carbono-hidrógeno. Sin embargo, la respuesta independiente del compuesto es fuertemente dependiente de las condiciones de trabajo. Se observó una gran variabilidad en los factores de respuesta relativos respecto a la concentración, dando lugar a grandes errores cuantitativos. Es por ello por lo que el rango lineal de este detector para la detección de carbono es tan sólo de dos órdenes de magnitud. La optimización del flujo de gas reactivo es imprescindible para obtener una buena exactitud y precisión en los resultados. Sin embargo, bajo el flujo óptimo del gas reactivo, los límites de detección disminuyen hasta en un orden de magnitud. La gran ventaja de este procedimiento es la posibilidad de cuantificar compuestos orgánicos puros para los que no se conoce su estructura a través de la relación carbono-hidrógeno. Por lo tanto, no es necesario una identificación previa de los compuestos antes del análisis cuantitativo mientras exista una buena resolución cromatográfica.

En la Tabla 10 también se ha incluido el procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono por su carácter universal y genérico. La respuesta de este

detector tan sólo depende del número de átomos de carbono del analito y del patrón interno, independientemente de su naturaleza. Al contrario que los detectores FID y EI-MS, con el detector GC-Combustión-MS no es necesario determinar el ECN ya que todos los átomos de carbono de los diferentes compuestos analizados se transforman en CO₂ antes de ser detectados, de manera que no se requiere ninguna corrección para los diferentes grupos funcionales. Por lo tanto, su sensibilidad es verdaderamente independiente del compuesto, haciendo posible la CIC de manera directa con excelentes resultados en términos de exactitud y precisión.

Tabla 10. Características analíticas de los detectores universales para compuestos orgánicos en GC cuando se emplea la CIC para el carbono.

	Especie detectada	LD (g C/s)	Rango lineal	CIC
FID	CHO ⁺	10 ⁻¹¹ -10 ⁻¹²	10 ⁷	ECN
EI-MS	Patrón de fragmentación	10 ⁻¹² Barrido completo	10 ⁶	ECN
AED	C/H	10 ⁻¹¹	10 ²	relación C/H
IDMS de C en línea	CO ₂ ⁺	10 ⁻¹²	10 ²	directo

En términos de sensibilidad, los límites de detección están en el rango bajo de los pg/s, un valor muy similar a los encontrados en FID, AED y EIMS en modo de barrido completo. En comparación con el detector AED, la respuesta es independiente de las condiciones de trabajo siempre y cuando esté asegurada la oxidación cuantitativa de los compuestos en el reactor de oxidación. La mayor limitación del detector IDMS en línea de carbono respecto al resto de detectores moleculares se encuentra en su estrecho rango lineal. Los principales motivos están relacionados con la saturación del detector (copas de Faraday), la eficacia de la reacción de combustión, y la pérdida de precisión. Como consecuencia, este estrecho rango lineal impide la cuantificación genérica de compuestos que estén presentes en una muestra en un rango muy distinto de concentración, en un solo análisis. Por otro lado, debido a la introducción del flujo de trazador, este detector

es el único que corrige posibles cambios de sensibilidad instrumental durante el análisis y efectos de matriz durante la formación de la especie detectada. Todo parece indicar que este nuevo detector está muy cerca de convertirse en el primer detector universal y genérico para compuestos orgánicos en GC.

Por último, todos los detectores genéricos para GC deben cumplir una serie de características comunes para poder obtener resultados cuantitativos exactos. En primer lugar, es imprescindible una separación cromatográfica completa de los analitos de la muestra. La coelución de los compuestos en un solo pico cromatográfico no permitirá la cuantificación individual de los compuestos. Debido al carácter genérico de los detectores todos los compuestos que contengan carbono serán detectados, por lo que la aplicación de la CIC no es adecuada para muestras complejas. En la actualidad existen recursos que pueden mejorar la separación de los analitos, como por ejemplo la cromatografía bidimensional. Por otro lado, es necesario poder realizar una inyección directa de la muestra en el sistema, sin tratamientos previos o procesos de preconcentración que puedan dar lugar a pérdidas selectivas de los analitos. Por lo tanto, muestras medioambientales o clínicas, que hacen uso de extensos protocolos de preparación de muestra para extraer y preconcentrar los analitos de la muestra, no podrán ser cuantificadas utilizando este tipo de estrategias. Además, la transmisión de los analitos durante la etapa de inyección debe ser cuantitativa. Por lo tanto, es necesario una buena optimización de esta etapa si se quieren conseguir resultados de calidad. Algunas de estas limitaciones impiden el uso de la CIC de los detectores genéricos en aplicaciones concretas. Sin embargo, son de gran utilidad siempre y cuando las muestras cumplan con los requisitos necesarios para su aplicación.

IV.2.2 DETERMINACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS EN BIODIESEL: NECESIDAD DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS

IV.2.2.1 Biodiesel: marco global y normativa vigente

La inestabilidad del mercado del petróleo, su disponibilidad limitada y principalmente, el serio impacto medioambiental de los combustibles fósiles, han estimulado el estudio de combustibles alternativos, sostenibles, renovables, y no

contaminantes que permitan el reemplazamiento de los combustibles fósiles convencionales.

El biodiesel, definido por la ASTM (American Society for Testing and Materials) como el *combustible* formado por la mezcla de monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga, derivados de aceites vegetales y grasas animales, se ha convertido en la mejor alternativa para el reemplazamiento de los combustibles utilizados en motores diésel, debido principalmente a sus propiedades físicas similares [103].

La introducción y comercialización del biodiesel en el mercado ha estado acompañado del desarrollo de normas internacionales, necesarias para armonizar las metodologías de análisis y los parámetros técnicos de los productos y servicios proporcionados. El seguimiento de estas normas asegura la alta calidad del producto final, ofreciendo así una mayor transparencia, fiabilidad e idoneidad de los procesos de producción, distribución y almacenamiento. Sin embargo, para poder garantizar una cadena de trazabilidad ininterrumpida al Sistema Internacional de unidades, que permita asegurar la calidad del producto a largo plazo, es necesario el desarrollo de materiales de referencia certificados y metodologías analíticas que ofrezcan resultados de alta calidad metrológica.

La Directiva de Energía Renovable de la Unión Europea 2009/28/EC representa una nueva fuerza motriz para el desarrollo de una infraestructura metrológica para biocombustibles. Los proyectos de investigación asociados (JRP) a esta directiva deberían desarrollar la infraestructura metrológica necesaria para determinar las características físicas y químicas de los biocombustibles, así como el origen biológico y geográfico de los mismos. Con este objetivo, nació en 2009 el proyecto europeo JRP-ENG09 “*Metrology for Biofuels*” organizado por la *Asociación Europea de Institutos de Metrología Nacional (EUROMET)*, con fecha de finalización en 2020. Existe, por tanto, un largo camino para establecer con buen criterio los parámetros físico-químicos que afectan a la calidad de un biodiesel, así como las metodologías de análisis adecuadas para obtener resultados fiables y trazables a través de materiales de referencia certificados.

La Norma Europea EN 14214 es la que actualmente establece los valores límite de los diferentes parámetros físico-químicos de un biodiesel, así como sus

metodologías de análisis. Esta Norma está basada en la Norma Americana ASTM D 6751. En la Tabla 11 se muestran las especificaciones que debe cumplir un biodiesel para su comercialización como combustible para motores diésel, así como las Normas individuales para cada parámetro concreto.

Tabla 11. Especificaciones para biodiesel de acuerdo a la Norma EN 14214.

Parámetro	Unidades	Límites	Norma
Contenido en ésteres	% (m/m)	96,5 min	EN 14103
Metiléster linoleico	% (m/m)	12 max	EN 14103
Metilésteres poliinsaturados > 4	% (m/m)	1 max	-
Densidad a 15°C	kg/m ³	860-900	EN ISO 3675
Viscosidad a 40°C	mm ² /s	3,5-5	EN ISO 3104
Punto de inflamación	°C	120	EN ISO 3679
Contenido en azufre	mg/kg	10,0 max	EN ISO 20864
Residuo carbonoso	% (m/m)	0,30 max	EN ISO 10370
Número de cetanos	-	51	EN ISO 5165
Contenido en cenizas de sulfatos	% (m/m)	0,02 max	ISO 3987
Contenido en agua	mg/kg	500 max	EN ISO 12937
Contaminación total	mg/kg	24 max	EN 12662
Corrosión en lámina de cobre	-	1	EN ISO 2160
Estabilidad a la oxidación	horas	6 min	EN 14112
Valor ácido	mg KOH/g muestras	0,50 max	EN 14104
Índice de yodo	g I/100 g muestra	120 max	EN 14111
Contenido en metanol	% (m/m)	0,20 max	EN 14110
Contenido en monoglicéridos	% (m/m)	0,80 max	EN 14105
Contenido en diglicéridos	% (m/m)	0,20 max	EN 14105
Contenido en triglicéridos	% (m/m)	0,20 max	EN 14105
Glicerina libre	% (m/m)	0,02 max	EN 14105
Glicerina total	% (m/m)	0,25 max	EN 14105
Metales grupo I (Na + K)	mg/kg	5,0 max	EN 14108
Metales grupo II (Ca + Mg)	mg/kg	5,0 max	prEN14538
Contenido en fósforo	mg/kg	10 max	EN 14107
Temperatura de destilación	°C	-	EN 116

Las Normas actualmente establecidas por la que se rige la calidad de un biodiesel son adaptaciones de las Normas empleadas para combustibles diésel, debido principalmente a sus propiedades físicas similares. Sin embargo, los diferentes métodos de obtención entre un combustible diésel y un biodiesel dan lugar a

diferentes impurezas presentes en el producto final. Estas impurezas son en parte responsables de la calidad del combustible. Es necesario, por tanto, conocer con exactitud cuáles son los parámetros que verdaderamente afectan a las propiedades de un biodiesel para su empleo como combustible, ya que tanto estos parámetros como sus valores límite pueden diferir significativamente de las de un combustible diésel. Además, serán necesarios materiales de referencia certificados para la determinación de las nuevas impurezas encontradas. Por otro lado, los compuestos mayoritarios de un diésel y un biodiesel, a pesar de ofrecer el alto poder energético que los caracteriza, poseen estructuras químicas diferentes, y el uso de metodologías de análisis adaptadas puede dar lugar a resultados erróneos o de baja exactitud. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías de análisis que permitan caracterizar un biodiesel de manera exacta y fiable.

IV.2.2.2 Importancia de la determinación de FAMEs en biodiesel

Los ésteres metílicos de ácidos grasos son los principales componentes de un biodiesel y son los responsables directos de su alto poder calorífico, necesario para su empleo como combustible en motores diésel [104].

La transesterificación ha sido el proceso más ampliamente estudiado y empleado para la obtención de biodiesel. A través de este proceso, los triglicéridos - componentes mayoritarios de aceites y grasas - reaccionan con alcoholes de cadena corta en presencia de un catalizador (normalmente alcalino) para transformarse en monolaquil ésteres de ácidos grasos, tal y como se ilustra en la Figura 33. El alcohol más comúnmente utilizado en los procesos industriales de transesterificación es el metanol y por ello, el biodiesel también se ha definido como el combustible formado por la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) derivados de aceites vegetales y grasas animales. Este proceso da lugar a dos productos mayoritarios: el biodiesel y la glicerina, también conocida como glicerol. Ambos productos son miscibles. Sin embargo, la ligera diferencia existente en la densidad de ambos productos permite una separación sencilla a través de un simple proceso de centrifugación.

IV.2.2.2.1 Determinación del origen del biodiesel

En la actualidad, las materias primas predominantes en la producción de biodiesel son las semillas oleaginosas de soja, colza y palma. Sin embargo, existe una

amplia variedad de aceites vegetales a partir de los cuales es posible obtener biodiesel [105][106]. Entre los más comunes se encuentran el aceite de coco, canola, girasol, maíz, jatropha y camelina. Las grasas animales y los aceites reciclados de uso doméstico también representan un mercado significativo para la producción de biodiesel en algunas regiones. Sin embargo, la escala de producción respecto a los aceites vegetales es mucho menor. Por otro lado, en los últimos años ha existido un especial interés por el desarrollo y empleo de lípidos de algas como materias primas para la producción de biodiesel [107]. De todos los organismos fotosintéticos, las microalgas son los organismos más productores de lípidos debido a las grandes cantidades de CO₂ que pueden fijar por unidad de área. El empleo de microalgas para la producción de biodiesel está ofreciendo muy buenos resultados con propiedades características únicas que mejoran las propiedades físico-químicas del biodiesel para su uso como combustible.

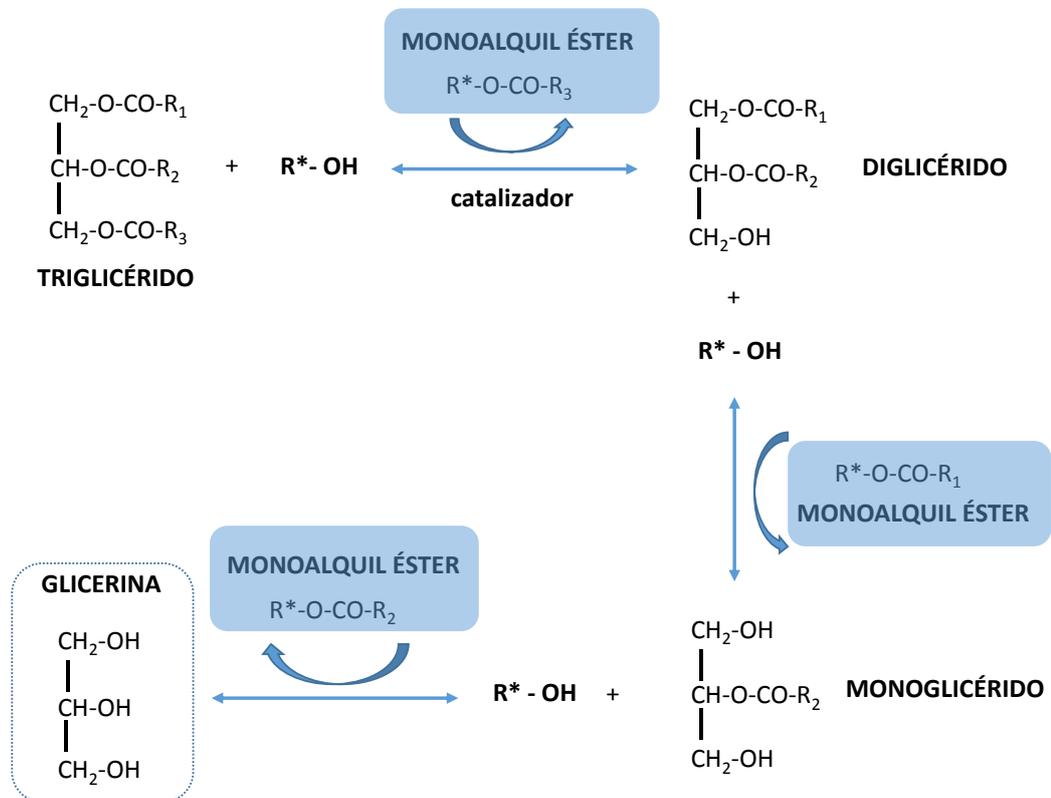


Figura 33. Esquema del proceso de transesterificación normalmente empleado para la obtención de biodiesel.

Aunque el biodiesel producido por la transesterificación de triglicéridos contiene numerosas especies de FAMES individuales, generalmente está dominado por un número limitado de compuestos. En la Tabla 12 se halla una lista de los FAMES más comúnmente encontrados en un biodiesel, independientemente de cuál sea su origen. Con el fin de nombrar los FAMES de una manera más intuitiva existe una sencilla nomenclatura para referirse a estos compuestos. Este convenio consiste en el símbolo químico del carbono precedido de dos números separados por el signo de puntuación de dos puntos. El primer número se refiere al número de átomos de carbono procedentes del ácido graso original, y el segundo al número de dobles enlaces carbono-carbono presentes en dicha cadena. Esta nomenclatura no tiene en cuenta el número de carbonos del alcohol utilizado en el proceso de transesterificación con el objetivo de relacionar rápidamente los ácidos grasos del aceite original con los FAMES del biodiesel.

Tabla 12. Nombre común, nomenclatura, fórmula molecular y peso molecular de los FAMES típicamente encontrados en un biodiesel (aparecen resaltados en gris los FAMES predominantes).

Nombre común	Nomenclatura	Fórmula molecular	Peso molecular
Laureato de metilo	C12:0	$C_{13}H_{26}O_2$	214,34
Miristato de metilo	C14:0	$C_{15}H_{30}O_2$	242,40
Miristoleato de metilo	C14:1	$C_{15}H_{28}O_2$	240,39
Palmitato de metilo	C16:0	$C_{17}H_{34}O_2$	270,45
Palmitoleato de metilo	C16:1	$C_{17}H_{32}O_2$	268,43
Estearato de metilo	C18:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298,50
Oleato de metilo	C18:1	$C_{19}H_{36}O_2$	296,49
Linoleato de metilo	C18:2	$C_{19}H_{34}O_2$	294,47
Linolenato de metilo	C18:3	$C_{19}H_{32}O_2$	292,46
Araquidato de metilo	C20:0	$C_{21}H_{42}O_2$	326,56
Gondoato de metilo	C20:1	$C_{21}H_{40}O_2$	324,54
Behenato de metilo	C22:0	$C_{23}H_{46}O_2$	354,61
Erucato de metilo	C22:1	$C_{23}H_{44}O_2$	352,59

La composición de los FAMES derivados de la mayoría de los aceites vegetales y grasas animales está básicamente dominada por cinco FAMES: palmitato de metilo (C16:0), estearato de metilo (C18:0), oleato de metilo (C18:1), linoleato de metilo (C18:2) y linolenato de metilo (C18:3). Los FAMES predominantes en la composición de la mayoría de los biodiesel son los C18. Sin embargo, algunas composiciones están dominadas por otros FAMES más ligeros. Por ejemplo, el biodiesel de coco y el biodiesel de palma, están dominados por los FAMES C12:0 y C16:0, respectivamente. Por otra parte, algunos lípidos derivados de microalgas poseen un perfil composicional similar al de la mayoría de los aceites vegetales y animales. Sin embargo, existe un gran número de microalgas más diversas en su composición, donde los FAMES C10:0, C14:0 y C16:0 son los que dan lugar a su perfil composicional característico.

Dentro de los biocombustibles dominados por los FAMES C18, la cantidad relativa de los compuestos saturados (C18:0), monoinsaturados (C18:1) y diinsaturados (C18:2) varían considerablemente. Por ejemplo, la colza y la canola están dominados por el FAME C18:1, el maíz y el girasol por el FAME C18:2, y la jatropha se caracteriza por tener una composición muy similar en ambos FAMES. En la Figura 34 se muestra la composición de los tres tipos de biodiesel de origen vegetal más comúnmente comercializados: soja (USA), colza (Europa), y palma (Asia). Los datos utilizados para la realización de esta figura fueron los obtenidos por Hoekman y col. tras una extensa revisión bibliográfica en la caracterización de biodiesel. La alta incertidumbre asociada a la concentración de cada FAME individual se debe principalmente a la amplia variedad de metodologías utilizadas para la determinación de FAMES. Sin embargo, existen otras fuentes de incertidumbre asociadas. El proceso de obtención del biodiesel, el origen geográfico de las materias primas, y los procesos de distribución y almacenamiento tienen también una influencia significativa en la diferente composición encontrada para biocombustibles con el mismo origen biológico.

La cuantificación exacta de los FAMES de un biodiesel podría ser una primera herramienta de discriminación del biodiesel según su origen biológico. El biodiesel obtenido de grasas animales se puede diferenciar del resto por la presencia del FAME C17:0, que aunque no se considera uno de los compuestos mayoritarios del biodiesel, se encuentra presente de manera significativa. Por otro lado, el biodiesel obtenido por la transesterificación de los lípidos presentes en la

mayoría de las microalgas da lugar a un perfil característico que permite su diferenciación. Por lo tanto, se podría realizar una clasificación de los diferentes tipos de biodiesel según su origen vegetal, animal o microbiológico, conociendo la concentración individual de los FAMES que lo constituyen. Dentro de un mismo origen biológico, también es posible la diferenciación de los diferentes tipos de biodiesel dependiendo de las diferentes materias primas utilizadas. Como se puede observar en la Figura 34, existe una clara diferencia en la composición de los FAMES mayoritarios presentes en los biodiesel basados en soja, colza y palma, por lo que su discriminación sería posible. Sin embargo, el empleo de otras semillas oleaginosas para la producción de biodiesel pueden dar lugar a perfiles composicionales muy parecidos a los presentados en la Figura 34. Éste es el caso de los perfiles obtenidos para la colza y la canola (Figura 35). En estos casos, la cuantificación de los FAMES mayoritarios que da lugar al perfil composicional característico del biodiesel no tendría el poder de discriminación deseado.

Un problema asociado a los procesos de distribución y almacenamiento del biodiesel es la baja estabilidad oxidativa y el carácter higroscópico que presenta. Estas características pueden dar lugar a variaciones en la composición del biodiesel que deben ser tenidas en cuenta antes de su empleo en motores diésel. Estos cambios en la composición del biodiesel pueden dar lugar a confusión cuando se requiere de una discriminación por su origen. Sin embargo, la cuantificación de los FAMES predominantes antes y después de su distribución y almacenamiento podría ser un parámetro que defina la calidad de tales procesos.

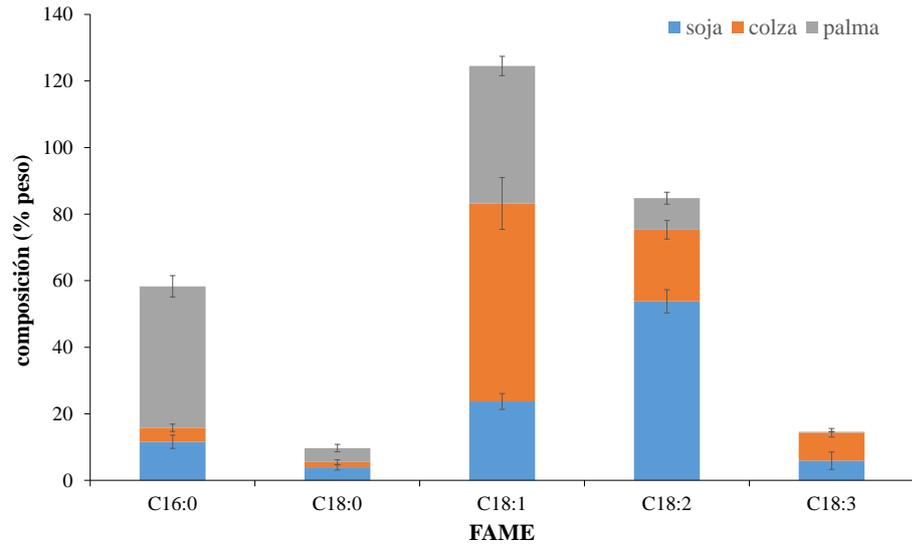


Figura 34. Perfil del biodiesel basado en soja, colza y palma según la composición de sus FAMEs mayoritarios.

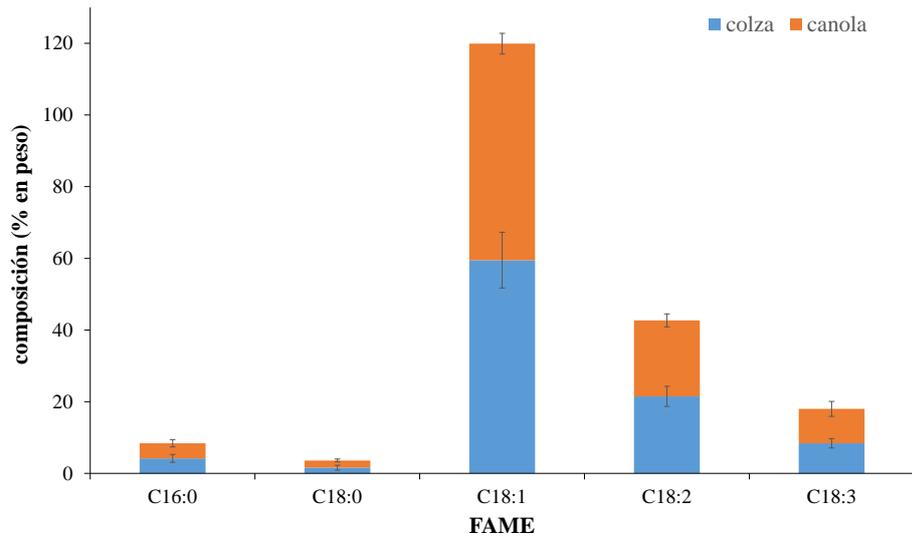


Figura 35. Perfil del biodiesel basado en colza y canola a partir de la composición de sus FAMEs mayoritarios.

IV.2.2.2 Determinación de las propiedades físico-químicas

La composición en FAMES del biodiesel tiene un espectacular efecto en sus propiedades físico-químicas. Pequeños cambios en su composición tienen un gran impacto, deseable o indeseable, en sus propiedades.

Algunas de las propiedades más relevantes para considerar a un biodiesel candidato para ser utilizado como combustible en motores diésel están directamente relacionadas con la longitud de la cadena carbonada de los FAMES y con el grado de insaturación de los mismos. Tal es su dependencia que se han desarrollado fórmulas matemáticas en las que conociendo la concentración y la estructura molecular de cada FAME presente en la muestra de biodiesel, es posible la determinación de las propiedades físico-químicas del mismo, sin hacer uso de los procedimientos habituales empleados en las Normas por las que se rige la calidad del biodiesel.

Estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa de un biodiesel está relacionada con el grado de insaturación de los FAMES que lo constituyen. La presencia de dobles enlaces implica una mayor reactividad con el O₂, especialmente cuando está en contacto con el aire o con el agua. Los productos primarios de la oxidación de los FAMES insaturados son hidroperóxidos alílicos inestables que se descomponen fácilmente en una amplia variedad de productos de oxidación secundarios. A medida que un biodiesel se oxida, se originan una serie de cambios en sus propiedades: el índice de acidez y la viscosidad aumentan, mientras que el índice de iodo y el contenido en FAMES disminuye. Estos cambios dan lugar a una disminución en la calidad del biodiesel, convirtiendo a la oxidación en un fenómeno de gran importancia en lo concerniente a la calidad del biodiesel.

Debido a la rica composición de FAMES mono- y poliinsaturados en la mayoría de los biodiesel, su estabilidad oxidativa suele ser menor que la recomendada por la legislación. Conociendo el grado de insaturación de un biodiesel dado es posible hacer una estimación aproximada de su estabilidad oxidativa. Para calcular el grado de insaturación de un biodiesel es necesario conocer la composición y estructura de los FAMES mono- y poliinsaturados del mismo. Una

vez calculada la concentración de los FAMES de la mezcla es posible conocer el grado de insaturación (DU) a través de la ecuación [40].

$$DU = MUFA + 2 \times DUFA + \dots + n \times nUFA \quad [40]$$

En donde *MUFA* y *DUFA* es la concentración expresada en porcentaje en peso de los FAMES monoinsaturados y diinsaturados presentes en el diésel, respectivamente; *n* se refiere al número máximo de insaturaciones presentes en los FAMES; y *nUFA* a la concentración de los FAMES insaturados con *n* número de insaturaciones. Un grado de insaturación por encima de 100, normalmente da lugar a una baja estabilidad oxidativa del biodiesel. El grado de insaturación calculado a partir de los datos registrados en la literatura para los biodiesel representativos de la producción mundial, basados en soja, colza y palma, fue de 149, 128 y 61, respectivamente. Estos datos indican que tan sólo el biodiesel de palma posee la estabilidad oxidativa requerida para su comercialización, debido a su alto contenido en los FAMES saturados C14:0 y C16:0. Por lo tanto, en la mayoría de los casos es necesario adicionar un antioxidante capaz de reaccionar con el O₂ más rápidamente que los FAMES insaturados constituyentes del biodiesel.

El índice de yodo (IV) es un parámetro que está íntimamente relacionado con el grado de insaturación total del biodiesel y por lo tanto, con la estabilidad oxidativa del mismo. Además, este parámetro, a diferencia del grado de insaturación, es uno de los parámetros presentes en la Norma EN 14214 por la que se rige la calidad del biodiesel, con un valor máximo de 120 g I/100 g muestra. La Norma empleada para la determinación del índice de yodo es la Norma EN 14111. La determinación de este parámetro se realiza a través de una valoración redox con tiosulfato potásico, donde se calculan los gramos de yodo que se consumen por cada 100 g de biodiesel. Sin embargo, también es posible su determinación a partir de la concentración de los ácidos grasos insaturados presentes en el biodiesel a partir de la ecuación [41].

$$IV = \sum \frac{(254 \times F \times D)}{MW} \quad [41]$$

En donde F, D y MW se refieren a la concentración, número de dobles enlaces, y peso molecular de cada FAME presente en la muestra de biodiesel. Los valores

del índice de yodo calculados para el biodiesel de soja, colza y palma fueron respectivamente de 128, 110 y 53 g I/100 g de biodiesel. Tan sólo el biodiesel de soja está fuera de las especificaciones de la norma.

Por último, la gran mayoría de los biodiesel basados en microalgas poseen un índice de yodo por debajo de 60 g I/100 g de biodiesel, debido a su bajo contenido en ácidos grasos insaturados en un perfil mucho más variado. Por lo tanto, el empleo de microalgas para la obtención de biodiesel es una muy buena alternativa para la producción de un biodiesel con una alta estabilidad oxidativa.

Número de cetanos

El número de cetanos (CN) está considerado un parámetro importante para la evaluación de las propiedades del biodiesel. Este parámetro sin dimensiones está relacionado con el tiempo de ignición tras la inyección del combustible en la cámara de combustión de un motor diésel. El número de cetanos es inversamente proporcional al tiempo de ignición y está relacionado con el grado de sustitución de la cadena carbonada de los principales compuestos de un combustible. Las largas cadenas lineales no sustituidas de los FAMES presentes en un biodiesel, químicamente similares a los n-alcenos de los combustibles diésel convencionales, explica la razón del empleo del biodiesel como combustible.

El número de cetanos de los ésteres grasos aumenta con el grado de saturación de las cadenas carbonadas. Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de los FAMES saturados de un biodiesel, mayor será su número de cetanos. En general, el biodiesel no requiere aditivos para aumentar el CN a pesar del característico grado de insaturación de los FAMES que lo constituyen. Generalmente, el biodiesel alcanza el valor mínimo establecido en las especificaciones técnicas internacionales. Una excepción puede ser el biodiesel basado en soja. Este biodiesel no alcanza el mínimo de 51 dictado por la Norma EN 14214. Sin embargo, normalmente llega al mínimo de 47 recomendado por la Norma americana ASTM D 6757.

La determinación del número de cetanos de un combustible se realiza por la comparación del retardo en la ignición en un motor de prueba con una mezcla de dos compuestos de referencia: el hexadecano y el heptametilnonano, según dicta la Norma EN 14214. Sin embargo, también es posible su determinación a partir de

la concentración de los FAMES insaturados de un biodiesel aplicando la ecuación [42].

$$CN = \left(46,3 + \frac{5458}{\sum \frac{560 \times F}{MW}} \right) - \left(0,225 \times \sum \frac{(254 \times F \times D)}{MW} \right) \quad [42]$$

En donde F, D y MW se refieren a la concentración, número de dobles enlaces, y peso molecular de cada FAME presente en la muestra de biodiesel. El número de cetanos calculado para el biodiesel de soja, colza y palma fue de 52, 54 y 91, respectivamente. Todos ellos están dentro de las especificaciones de la Norma EN 14214. Sin embargo, el biodiesel de palma, debido a su alto grado de saturación ofrece unas características de ignición muy similares a las de cualquier combustible diésel convencional.

Viscosidad cinemática

La viscosidad cinemática es una de las propiedades que más afecta al empleo del biodiesel como combustible debido a la alta dependencia de la combustión de los motores diésel con la viscosidad del combustible.

La determinación de este parámetro se realiza según la Norma EN ISO 3104 tal y como se especifica en la Norma EN 14212. Para ello, es necesario medir el tiempo que tarda un volumen fijo de combustible en fluir, bajo la acción de la gravedad, a través del tubo capilar de un viscosímetro calibrado a una temperatura cuidadosamente controlada. La viscosidad cinemática se calcula simplemente multiplicando el tiempo determinado por la constante de calibración del viscosímetro. El rango de la viscosidad cinemática especificado en la Norma es de 3,5-5 mm²/s.

El grado de viscosidad de un biodiesel aumenta con la longitud de la cadena y con el grado de saturación de los FAMES que lo constituyen. Por lo tanto, de nuevo es posible la determinación de este parámetro a través del perfil composicional del biodiesel a través de la ecuación [43].

$$\ln \mu = \sum y_i \ln \mu_i \quad [43]$$

En donde μ es la viscosidad cinemática del biodiesel, y_i es la fracción en masa de cada FAME constituyente del biodiesel, y μ_i es la viscosidad cinemática individual de cada FAME. μ_i se calcula a partir del peso molecular en el caso de los FAMEs saturados (ecuación [44]), mientras que para los FAMEs insaturados se observó una fuerte correlación con el número de dobles enlaces (ecuación [45]).

$$\mu_{sat} = (1,05E - 04) \times MW^2 - 0,0242 \times MW + 2,15 \quad [44]$$

$$\mu_{ins} = 0,153 \times D^2 - 1,15 \times D + 4,73 \quad [45]$$

El valor de la viscosidad cinemática para el biodiesel de soja, colza y palma calculado a partir de las ecuaciones 16, 17 y 18 es de 3,20, 3,25 y 3,38 mm²/s, respectivamente. Según la Norma europea ninguno de los biodiesel entraría dentro de las especificaciones marcadas. Sin embargo, el rango para la viscosidad cinemática es mucho más amplio para la Norma americana (1,9-6 mm²/s). En este caso, los tres biodiesel cumplirían con la viscosidad deseada para su empleo en motores diésel.

Idoneidad de un biodiesel para su utilización en motores diésel

El biodiesel puro como combustible para motores diésel presenta todavía algunas limitaciones. Su baja estabilidad oxidativa y la aparición de sólidos a bajas temperaturas (propiedades de flujo en frío) impide su empleo en su forma más pura. Es por ello por lo que se suele utilizar mezclado con destilados del petróleo. Estas mezclas se definen con la abreviatura BX, donde X se refiere al porcentaje en volumen del biodiesel en la mezcla. La mezcla más ampliamente utilizada se conoce como B20, mientras que el biodiesel puro se designa como B100.

Con el objetivo de hallar el biodiesel que proporcione las mejores características para ser utilizado como combustible, se han realizado algunos estudios basados en las propiedades de flujo en frío y en su estabilidad oxidativa. Se llegó a un consenso para la composición óptima de FAMEs en el biodiesel. Un biodiesel debe contener niveles relativamente bajos de FAMEs saturados para reducir los problemas de flujo en frío; niveles bajos de FAMEs poliinsaturados con el objetivo de minimizar la inestabilidad oxidativa; y altos niveles de FAMEs monoinsaturados. Los FAMEs C16:1 y C18:1 proporcionan el mejor compromiso

entre la estabilidad oxidativa y las propiedades de flujo en frío sin reducir excesivamente el número de cetanos. En la actualidad, se está invirtiendo mucho esfuerzo en la modificación genética de la composición natural de los FAMES en aceites vegetales para aumentar su capacidad como combustible, y la gran mayoría de los trabajos están enfocados en semillas de soja, con el objetivo de aumentar el contenido en el FAME C18:1 y disminuir el contenido en C18:2 y C18:3. De ahí que sea tan importante la cuantificación exacta de los diferentes FAMES presentes.

IV.2.2.3 Determinación de FAMES en biodiesel B100

IV.2.2.3.1 Normativa vigente: EN 14103

La Norma europea EN 14103 titulada “*Productos derivados de grasas y aceites. Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos. Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico del ácido linolénico*” fue aprobada en el año 2003 por el Comité Europeo de Normalización.

El objetivo de dicha Norma es determinar el contenido de los ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en un biodiesel destinado al uso como biocombustible puro, o como componente de una mezcla para su uso en calefacción o combustibles diésel. El contenido total de FAMES en un biodiesel de estas características debe ser mayor al 96,5% en masa, mientras que el contenido del FAME C18:3 no debe superar el 12%.

La metodología propuesta en la Norma emplea la cromatografía de gases como técnica de separación, acoplada a un detector FID. La GC ha sido la técnica por excelencia para la separación de FAMES en biocombustibles puros, y las fases estacionarias basadas en polietilenglicol han permitido resolver los principales isómeros posicionales de los FAMES de un biodiesel. La elección FID como detector se debe a su respuesta “independiente” del compuesto, que permite una cuantificación rápida y directa de los FAMES sin la necesidad de estándares específicos ni la realización de calibraciones externas. El patrón interno utilizado para la cuantificación es el heptadecanoato de metilo (C17:0).

El contenido de éster, C , expresado como fracción de masa en tanto por ciento, se calcula empleando la ecuación [44].

$$C = \frac{(\sum A) - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{m} \times 100 \quad [46]$$

En donde $\sum A$ es el área total de los picos desde el éster metílico C14:0 hasta el C24:0; A_{IS} es el área del pico correspondiente al patrón interno, C_{IS} es la concentración del patrón interno utilizada en mg/mL; V_{IS} es el volumen en mL de la disolución de patrón interno añadido a la muestra; y m es la masa de la muestra en mg.

El contenido del éster metílico del ácido linolénico (C18:3), L , expresado en las mismas unidades, se calcula a través de la ecuación [47].

$$L = \frac{A_L}{(\sum A) - A_{IS}} \times 100 \quad [47]$$

En donde A_L es el área del pico correspondiente al éster metílico del ácido linolénico.

Esta metodología es apropiada para los FAMES C14:0-C24:0, debido principalmente al programa cromatográfico empleado para la separación. Esta separación se lleva a cabo a una temperatura isotérmica de 200°C y la introducción de la muestra en el sistema se realiza a través de un inyector convencional split/splitless a 250°C.

Limitaciones de la Norma EN 14103:2003

Desde el punto de vista de la exactitud, la metodología de análisis utilizada en la Norma EN 14103:2003 no es la más adecuada para la determinación del contenido de FAMES en un biodiesel derivado de grasas y aceites. Esta norma debería permitir la determinación del contenido total de FAMES en cualquier tipo de biodiesel, independientemente de las materias primas utilizadas para su obtención. Sin embargo, existen ciertas limitaciones en la Norma que deberían ser corregidas.

En primer lugar, la temperatura isotérmica elegida para la elución de los FAMES tan sólo permite determinar los FAMES C14:0-C24:0. Sin embargo, el perfil composicional de un biodiesel contiene otros FAMES que no son tenidos en cuenta. En la Tabla 13 se muestra la composición de los FAMES individuales,

expresada como fracción de masa en tanto por ciento, para los tres biodiesel de origen vegetal de mayor producción, y para un biodiesel basado en aceite de coco. Mientras que para los biodiesel representativos el error que se comete no es significativo, para el biodiesel de coco este error aumenta hasta un 61%. Por lo tanto, la Norma no es aplicable a muestras de biodiesel en los que alguno de sus FAMES mayoritarios se encuentre fuera del rango C14:0-C24:0.

En segundo lugar, la estrategia de cuantificación elegida puede dar lugar a errores significativos por varias razones. Como ya se ha comentado, el detector FID puede hacer uso de la calibración independiente del compuesto para la cuantificación de los compuestos de una muestra, a través del empleo del número de carbonos efectivo para predecir los factores de respuesta relativos. Los FAMES constituyentes del biodiesel tienen una estructura química común, basada en una cadena carbonada lineal con un grupo éster. La elección de un patrón interno adecuado de la misma estructura (C17:0), dará lugar a menos errores relacionados con la variabilidad de los factores de respuesta predichos por el ECN. Sin embargo, la estrategia de calibración empleada en la Norma no utiliza el ECN para calcular los RRF.

Tabla 13. Contenido de los FAMES (%m/m) C6:0-C24:1 encontrados en los biocombustibles de origen vegetal más representativos. Resaltados en gris se encuentran los FAMES recogidos por la norma EN 14103:2003.

FAME	Soja	Colza	Palma	Coco
C6:0	-	-	-	0,6
C8:0	-	-	0,8	6,8
C10:0	-	0,6	0,5	5,4
C12:0	0,1	0,1	0,3	47,7
C14:0	0,1	-	1,1	18,5
C16:0	11,6	4,2	42,5	9,1
C16:1	0,2	0,1	0,2	0,1
C17:0	0,1	0,1	0,1	-
C18:0	3,9	1,6	4,2	2,7
C18:1	23,7	59,5	41,3	6,8
C18:2	53,8	21,5	9,5	2,1
C18:3	5,9	8,4	0,3	0,1
C20:0	0,3	0,4	0,3	0,1
C20:1	0,3	2,1	0,1	-
C20:2	-	0,1	-	-
C22:0	0,3	0,3	0,1	-
C22:1	0,1	0,5	-	-
C24:0	0,1	0,1	0,1	-
C24:1	0,3	0,1	-	1,0
C6:0-C24:1	100,8	99,9	101,2	101,0
C14:0-C24:0	100,4	99,1	99,6	39,5
Error %	0,4	0,8	1,6	60,9

La Norma EN 14103 utiliza el denominado “método del porcentaje de área” (ecuaciones 46 y 47) empleado tradicionalmente en la industria petroquímica para la cuantificación de compuestos que tienen los mismos grupos funcionales. Este método, no tiene en cuenta ni el número de átomos de carbono del compuesto ni el número de dobles enlaces, que también puede afectar al proceso de ionización en la llama. Por lo tanto, la cuantificación de los ésteres metílicos con un número de carbonos similar al del patrón interno se podrá realizar de manera exacta,

mientras que cuanto mayor sea la diferencia entre el número de carbonos del patrón interno y del compuesto a determinar, mayor error se cometerá. De manera general, los FAMES mayoritarios de un biodiesel son los FAMES C16 y C18, por lo que el empleo del C17:0 como patrón interno es adecuada para la cuantificación de estos compuestos mayoritarios. Sin embargo, el error cometido en los compuestos minoritarios, que representan un 5% en masa del contenido total de FAMES en un biodiesel, puede afectar a la exactitud de la medida. Además, un biodiesel de composición variada o cuyos FAMES mayoritarios tengan un número de carbonos muy diferentes al del patrón interno, no podrá ser cuantificado de manera exacta.

Por otro lado, la introducción de la muestra en el GC se realiza a través de un inyector convencional split/splitless. Como ya se ha demostrado en el capítulo anterior de la presente Tesis, este tipo de inyección da lugar a la discriminación de los compuestos en el inyector debido a la diferencia en sus puntos de ebullición. El patrón interno elegido tiene un punto de ebullición similar al de los compuestos mayoritarios C16 y C18. Por lo tanto, la transmisión de estos compuestos respecto a la del patrón interno será similar. Sin embargo, se puede cometer un gran error en los compuestos con puntos de ebullición muy diferentes. De nuevo, muestras de composición variada o con FAMES mayoritarios con un punto de ebullición muy diferente al del patrón interno no podrán ser determinadas con exactitud.

El error cometido sobre los compuestos minoritarios, debido al procedimiento de cuantificación y al modo de inyección, puede ser el responsable de dar falsos negativos o positivos en la calidad de un biodiesel respecto a este parámetro.

En 2006, Schober y col. desarrollaron una nueva metodología de análisis para la cuantificación de FAMES en biodiesel basada en la Norma EN 14103. Con el objetivo de aumentar el rango del número de FAMES permitido por la Norma, se realizó una modificación en el programa cromatográfico. En esta ocasión, una temperatura inicial de 150°C, y una rampa de 5°C/min hasta la temperatura final de 220°C durante 15 minutos, permitió cuantificar los FAMES desde el C6:0 hasta el C24:1. Esta modificación permitiría determinar el contenido total de FAMES en un biodiesel de manera más exacta, independientemente de su origen. Por otro lado, se realizó un estudio de estabilidad de la disolución de trabajo del patrón interno C17:0 disuelto en heptano. Se observó una degradación del patrón interno

con el tiempo que provocó un error de hasta un 40% en la determinación del contenido total de FAMES, siete días después de su preparación. Por lo tanto, es recomendable el uso de disoluciones frescas tanto de patrón interno como de muestra. Por último, se estudió el error cometido por el empleo del C17:0 como patrón interno en biodiesel obtenido de grasas animales. El biodiesel basado en grasas animales contiene un pequeño porcentaje del FAME C17:0 en su composición. Se observó un error del 2-7%, dependiendo de la materias primas utilizadas, respecto a la determinación realizada teniendo en cuenta el porcentaje de C17:0 presente en la muestra. Por lo tanto, la metodología desarrollada por la Norma EN 14103 no es adecuada para el biodiesel de origen animal.

Modificación de la Norma EN 14103:2003 en EN 14103:2011

En 2011, se realizó una modificación de la Norma EN 14103:2003 teniendo en cuenta los estudios realizados por Schober y col. 5 años atrás. La modificación en el programa cromatográfico permitió que la Norma EN 14103:2011 fuera adecuada para los FAMES C6:0-C24:0, y el empleo del nonadecanoato de metilo (C19:0) como patrón interno hizo posible la determinación exacta de los FAMES del biodiesel basado en grasas animales. Las ecuaciones empleadas para la determinación del contenido total de FAMES (ecuación [48]) y del linolenato de metilo (C18:3) (ecuación [49]) fueron ligeramente modificadas con el objetivo de simplificar los cálculos. Además, la determinación del C18:3 se realizó con el empleo del patrón interno, a diferencia de la Norma EN 14103:2003, dando lugar a una determinación más exacta.

$$C = \frac{(\sum A) - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{W_{IS}}{W} \times 100 \quad [48]$$

$$L = \frac{A_L}{A_{IS}} \times \frac{W_{IS}}{W} \times 100 \quad [49]$$

En ambas ecuaciones, W_{IS} y W se refieren al peso, en mg, del patrón interno y de la muestra, respectivamente.

Limitaciones de la Norma EN 14103:2011

A pesar de las modificaciones realizadas, el empleo del método del porcentaje de área puede causar pérdidas de exactitud en la determinación. Sin embargo, este procedimiento de cuantificación simplifica enormemente los cálculos, haciendo de éste un procedimiento sencillo para la determinación de FAMES en biodiesel.

Por otro lado, la Norma EN 14103 no tiene en cuenta la importancia de la cuantificación de los FAMES individuales de un biodiesel. Tan sólo limita el contenido del linolenato de metilo debido a la influencia indeseada de los altos contenidos de FAMES poliinsaturados en la calidad de un biodiesel. Como ya se ha comentado, la determinación individual de los FAMES mayoritarios de un biodiesel puede proporcionar información acerca de su origen biológico, así como de las principales propiedades físico-químicas que establecen la calidad del producto. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la cuantificación exacta de los principales FAMES constituyentes de un biodiesel, sin perder el carácter genérico del detector. Posiblemente, el empleo del ECN para predecir los RRF y la optimización de la inyección sea suficiente para una cuantificación exacta de los diferentes FAMES de un biodiesel.

IV.2.3 EVALUACIÓN DE LA NORMA EN-14103 EN LA DETERMINACIÓN DE LOS FAMES INDIVIDUALES DE UN BODIESEL USANDO GC-FID

IV.2.3.1 Determinación de los FAMES individuales de una mezcla estándar

La mezcla estándar de FAMES empleada para este estudio contiene los FAMES pares y saturados desde el C4:0 hasta el C24:0. Además, debido a que entre los FAMES mayoritarios de un biodiesel también se encuentran los FAMES C18 insaturados, se adicionaron a la mezcla estándar los FAMES C18:1, C18:2 y C18:3, con el objetivo de evaluar su comportamiento en el detector FID. En este caso el patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).

Las condiciones cromatográficas utilizadas se modificaron ligeramente respecto a la Norma para permitir la elución y cuantificación de todos los compuestos de la mezcla. La Tabla 5 (Sección Experimental) resume las condiciones cromatográficas finalmente utilizadas a lo largo de este estudio para la separación

de los FAMES y su cuantificación. La instrumentación GC-FID empleada dispone de un inyector convencional split/splitless, siendo éste el mismo tipo de inyector empleado en la Norma.

La Figura 36 muestra uno de los cromatogramas GC-FID obtenidos para la mezcla estándar de trabajo. Esta mezcla contiene alrededor de 180 µg/g para los FAMES pares y saturados, 143, 134 y 169 µg/g para los FAMES C18:1, C18:2 y C18:3, respectivamente, y 132 µg/g para el C17:0, utilizado como patrón interno. Los 15 FAMES presentes en la mezcla eluyeron en menos de 35 minutos, con un tiempo de retención de 0,67 minutos para el C4:0 y de 32 minutos para el C24:0. El largo tiempo del cromatograma se debe al lento programa de temperaturas recomendado por la Norma, que permite la separación de todos los FAMES bajo estudio, desde el C4:0 hasta el C24:0 con una excelente resolución cromatográfica.

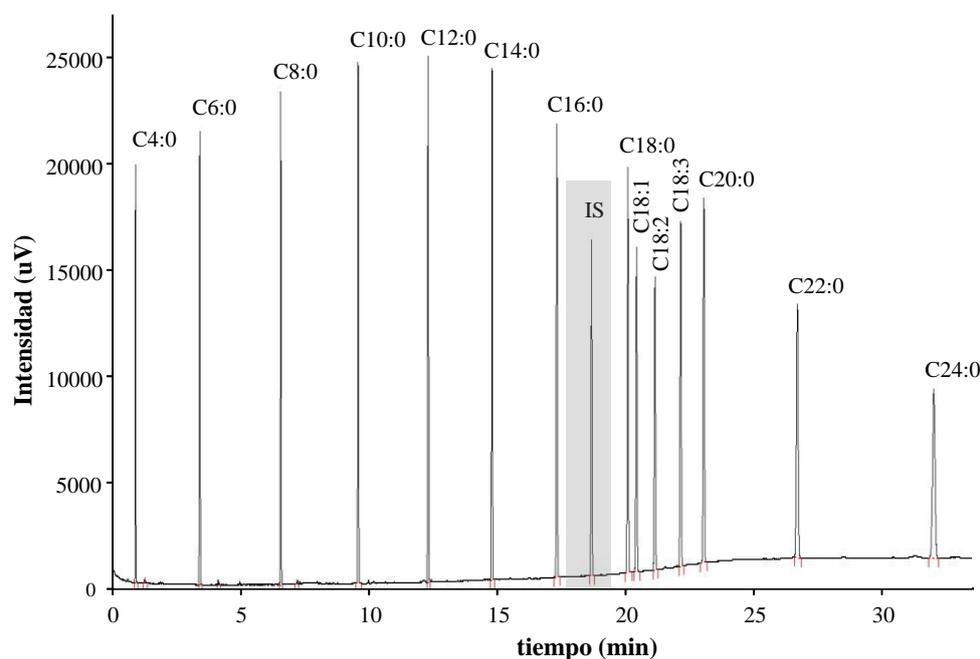


Figura 36. Cromatograma de la mezcla de FAMES constituida por los FAMES pares y saturados C4:0-C24:0 y los FAMES C18 insaturados C18:1, C18:2 y C18:3. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).

Las áreas de pico obtenidas se trataron empleando las ecuaciones 46 y 47 para la evaluación del método del porcentaje de área de la Norma EN 14103:2011. La ecuación [48] proporciona el contenido total de ésteres metílicos en la mezcla, mientras que la ecuación [49] permite la cuantificación de cada FAME individual. Los resultados cuantitativos, expresados como recuperación en tanto por ciento, están recogidos en la Tabla 14. Como se puede observar, las recuperaciones individuales están un rango de 54,4 a 102,2%, mientras que para el contenido total, la recuperación fue de un 90,4%. El mayor error se comete para los FAMES C4:0-C12:0. Los valores de recuperación aumentan a medida que el número de átomos de carbono de la especie a determinar se aproxima al número de átomos de carbono del patrón interno utilizado. Por lo tanto, el empleo del FAME C17:0 como patrón interno no es adecuado para la cuantificación de los FAMES con un número átomos de carbono de 4 a 12. El uso de un segundo patrón interno para los FAMES de menor peso molecular, podría compensar los errores obtenidos.

Tabla 14. Recuperaciones obtenidas para los compuestos individuales de la mezcla de FAMES empleando el C17:0 como patrón interno. La incertidumbre está calculada como la desviación estándar para $n=5$.

FAME	Recuperación (%)
C4:0	54,4 ± 1,7
C6:0	71,1 ± 1,9
C8:0	81,6 ± 1,8
C10:0	88,3 ± 0,8
C12:0	91,1 ± 0,2
C14:0	94,9 ± 0,4
C16:0	97,4 ± 0,1
C18:0	99,7 ± 0,1
C18:1	102,2 ± 0,1
C18:2	97,0 ± 0,1
C18:3	95,8 ± 0,2
C20:0	101,9 ± 0,4
C22:0	100,3 ± 0,7
C24:0	96,4 ± 0,8
Contenido total	90,4 ± 0,5

Teniendo en cuenta que el perfil composicional de un biodiesel suele estar dominado por los FAMES C16 y C18, se calculó la recuperación del contenido total de la mezcla tomando sólo las áreas de pico para estos cinco compuestos mayoritarios. En este caso las recuperaciones individuales obtenidas estuvieron en un rango de 97,4 a 102,2%, mientras que la recuperación del contenido total de FAMES fue del 98,4%. En este caso, el procedimiento del porcentaje de área ofrece una cuantificación exacta para los FAMES mayoritarios de un biodiesel. Sin embargo, aunque este procedimiento ofrece resultados cuantitativos satisfactorios en términos de exactitud, no dispone de un carácter universal. Muestras de biodiesel cuyos FAMES mayoritarios se encuentren fuera del rango C14:0-C20:0 no podrán ser cuantificadas con exactitud mediante este procedimiento.

La recuperación obtenida para los FAMES insaturados C18 indica que no existe ningún tipo de comportamiento anómalo en la respuesta del detector FID respecto al número de insaturaciones. La recuperación obtenida para el FAME C18:1 de 102,2% muestra una buena eficacia de hidrogenación e ionización en la llama para este compuesto, mientras que para los FAMES C18:2 y C18:3 se obtuvieron errores cuantitativos por defecto, que aumenta con el número insaturaciones. Sin embargo, las ligeras diferencias encontradas no son concluyentes.

IV.2.3.1.1 Evaluación del Número de Carbonos Efectivo para la determinación por GC-FID de los FAMES individuales en una mezcla estándar

El empleo del número de carbonos efectivo podría mejorar la exactitud de los datos cuantitativos obtenidos mediante el procedimiento del porcentaje de áreas. El ECN considera la contribución de los diferentes grupos funcionales y la estructura molecular del analito. Debido a que todos los FAMES presentes en la mezcla, incluido el patrón interno, tienen el mismo grupo funcional en su estructura, el empleo del ECN en esta ocasión debería corregir la respuesta del FID respecto al número de átomos de carbono del compuesto. Además, el número de dobles enlaces también es tenido en cuenta cuando se aplica este concepto.

En la Figura 37 se encuentran representadas las recuperaciones obtenidas cuando se emplea el ECN para predecir los factores de respuesta relativos, empleando la

ecuación [38]. Como se puede observar, los resultados cuantitativos mejoran considerablemente respecto al empleo del procedimiento del porcentaje de áreas, particularmente para los FAMES entre el C4:0 y el C14:0. En esta ocasión, las recuperaciones individuales están en un rango de 90,2 a 104,2%, obteniendo una recuperación media del 99%. En el caso del éster metílico del ácido linolénico (C18:3), la diferencia en las recuperaciones obtenidas no es significativa. Sin embargo, el empleo del ECN para la cuantificación de este FAME da lugar a una recuperación del 94,4% frente al 95,8% obtenido mediante la aplicación de la Norma.

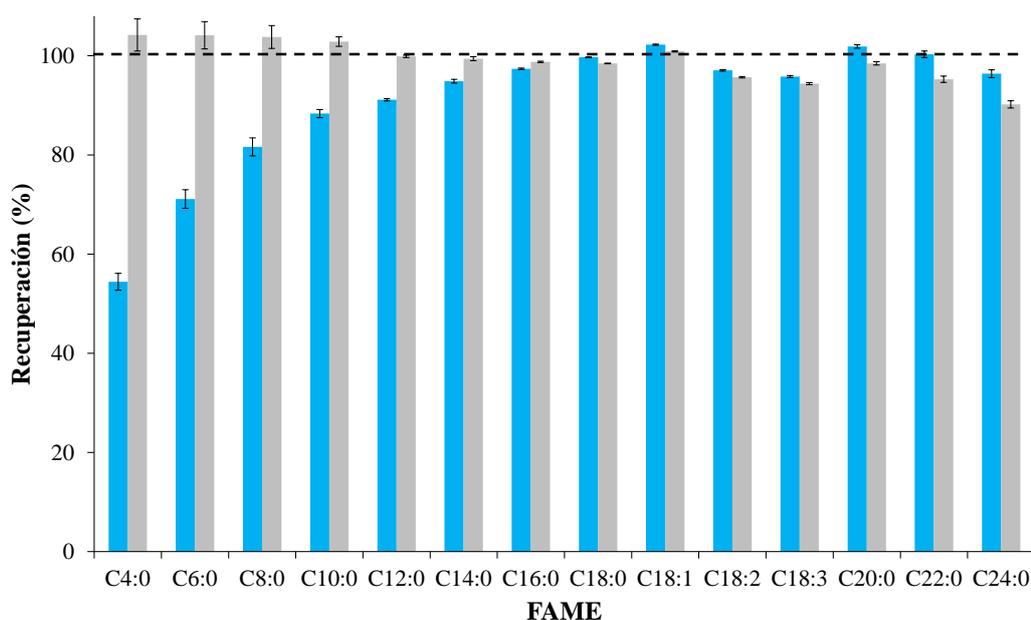


Figura 37. Comparación de las recuperaciones, expresadas en %, obtenidas mediante GC-FID, empleando el procedimiento del porcentaje de áreas (barras en azul) y tras su corrección por ECN (barras en gris). Las barras de error se corresponden a la desviación estándar obtenida para $n=5$.

Por tanto, la Figura 37 deja claro que una simple modificación en el procedimiento de cuantificación empleado por la Norma EN 14103:2011, como es el empleo del ECN, puede mejorar la exactitud de los resultados obtenidos para el contenido total de FAMES en una muestra de biodiesel. Además, el empleo del

ECN también le da un carácter más universal por la posibilidad de cuantificar de manera exacta cualquier biodiesel, independientemente de cual sea su origen biológico o su variabilidad composicional.

IV.2.3.2 Determinación por GC-FID de los FAMES individuales presentes en un biodiesel de soja B100 certificado

El material de referencia certificado SRM 2772 consiste en un biodiesel puro de origen vegetal basado en soja, recientemente disponible para la evaluación de los métodos analíticos desarrollados para determinar las propiedades físicas y químicas de un biodiesel B100. Este biodiesel está dominado por cinco FAMES mayoritarios (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3). En la Tabla 15 se muestra la concentración certificada o de referencia con su incertidumbre asociada, expresada en fracción de masa, de los FAMES del SRM 2772. Como se puede apreciar, el FAME C18:1 tiene dos isómeros de posición para los que se da la concentración de manera independiente. Por lo tanto, es necesaria una separación cromatográfica a línea de base que permita la cuantificación individual de ambos isómeros. El FAME C18:2 está formado por los isómeros cis y trans. El valor certificado sólo está referido al isómero cis, por lo que de nuevo será necesaria una resolución cromatográfica que permita su separación.

Tabla 15. Concentraciones certificadas o de referencia para los Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos del SRM 2772. *Valores de referencia.

FAME	Fracción de masa (mg/g)
C14:0	0,755 ± 0,089
C16:0	107 ± 2
C16:1, n-7	1,32 ± 0,18
*C17:0	1,03 ± 0,02
C18:0	46 ± 2,7
C18:1, n-9	233 ± 6
C18:1, n-7	14,3 ± 1,5
C18:2, cis-n-6	523 ± 17
*C18:3, n-3	69,3 ± 2,6
C20:0	3,66 ± 0,52
*C22:0	3,7 ± 1,1

Debido al origen vegetal del biodiesel fue posible su cuantificación empleando el C17:0 como patrón interno. La concentración del patrón interno fue de 250 $\mu\text{g/g}$. El biodiesel puro fue diluido en n-hexano en una relación 1:300 para su introducción en el GC. En el cromatograma de la Figura 38 se puede observar el perfil composicional del biodiesel basado en soja. En él se pueden observar los dos isómeros posicionales existentes para el C18:1 y los isómeros cis (n-6c) y trans (n-6t) del FAME C18:2. Mientras que los isómeros del C18:2 se resuelven cromatográficamente a línea de base, la separación de los isómeros del C18:1 no es completa. Aun así, su integración fue posible de manera independiente. El isómero trans representa un 0,5% en área respecto al isómero cis. Sin embargo, su concentración no se encuentra en el certificado de análisis. También se pueden observar los tres isómeros de posición del FAME C18:3. El valor certificado tan sólo está referido al isómero mayoritario C18:3 (n-3). De nuevo, existe una excelente separación cromatográfica que permite su cuantificación de manera individual.

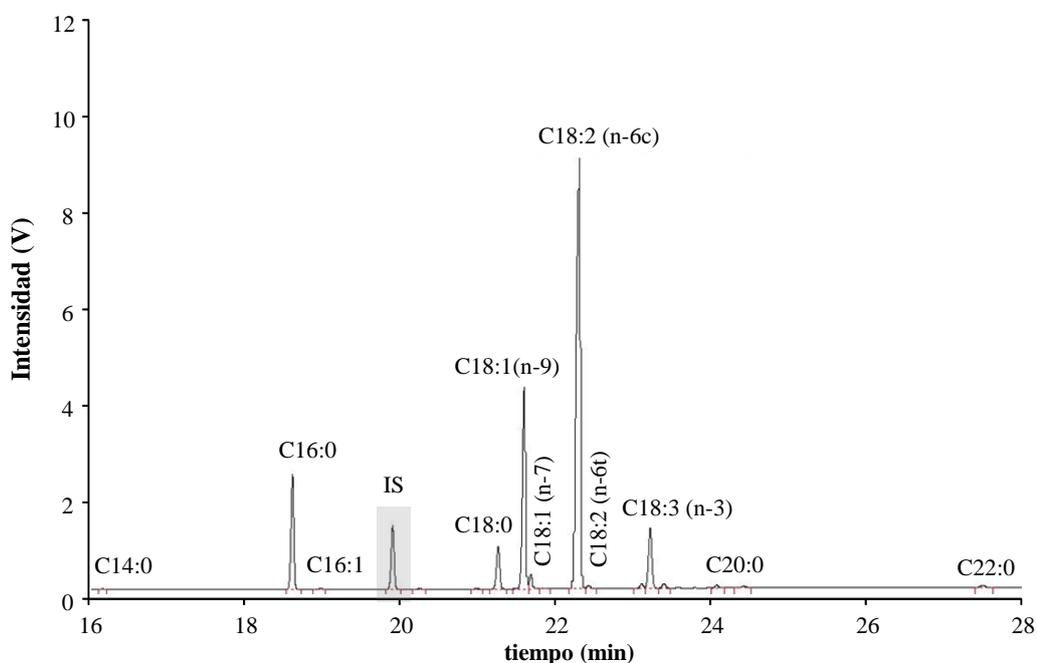


Figura 38. Perfil cromatográfico de los FAMEs presentes en el SRM 2772 basado en soja obtenido mediante GC-FID. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).

La Tabla 16 contiene las concentraciones encontradas y las recuperaciones correspondientes calculadas tras el análisis del SRM 2772, tanto a partir de la Norma EN 14103:2007 como teniendo en cuenta la contribución del ECN para cada FAME de la muestra. El empleo del ECN mejora considerablemente las recuperaciones obtenidas para los primeros FAMES eluidos en dicho biodiesel basado en soja. La recuperación calculada para el primer FAME eluido presente en el biodiesel, C14:0, mejora desde un 93,2%, cuando se emplea el método del porcentaje de áreas, hasta un 97,7% por la aplicación del ECN. Sin embargo, la recuperación calculada para los últimos FAMES eluidos empeora cuando se emplea la corrección del ECN. En este caso, el procedimiento del porcentaje de área compensa en cierta medida la pérdida de los últimos compuestos eluidos debido a la discriminación de los compuestos de alto punto de ebullición en el inyector. Por otro lado, mientras que la recuperación calculada para el C18:1,n-9 de la mezcla estándar de FAMES fue superior al 100% (ver Tabla 17), en el SRM 2772 tan sólo se obtuvo una recuperación aproximada del 96% por ambos procedimientos de cuantificación. Los isómeros de posición del FAME C18:1 no se resuelven cromatográficamente a línea de base y existe una pérdida de compuesto clara durante el proceso de integración. Esta pérdida es más acusada en el isómero minoritario, obteniendo una recuperación de tan sólo un 88%. El FAME C16:1 es uno de los compuestos minoritarios de la muestra, representando tan sólo un 0,1% de la composición total de FAMES. La recuperación obtenida para este compuesto es del 70%. Se podría pensar en una pérdida de exactitud debido a la baja concentración del FAME en el biodiesel. Sin embargo, para el FAME C14:0, que tiene una concentración similar, la recuperación obtenida es mayor del 90% para ambos procedimientos de cuantificación. Además, este FAME se resuelve cromatográficamente en línea de base, por lo que pérdidas durante la integración no son esperables.

Resultados y discusión

*Tabla 16. Comparación de las recuperaciones obtenidas de los FAMES individuales del SRM 2772 aplicando la norma EN 14103 y corregida por ECN. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar para n=5. *Valor de referencia.*

FAME	SRM 2772	EN 14103	ECN		
	Certificado (mg/g)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)
C14:0	0,76 ± 0,09	0,70 ± 0,02	93,2 ± 2,3	0,74 ± 0,02	97,7 ± 2,4
C16:0	107 ± 2	103,1 ± 0,1	96,4 ± 0,1	104,6 ± 0,1	97,7 ± 0,1
C16:1	1,3 ± 0,2	0,93 ± 0,03	70,6 ± 2,1	0,944 ± 0,028	71,5 ± 2,2
C18:0	43 ± 3	43,69 ± 0,03	101,6 ± 0,1	43,14 ± 0,03	100,3 ± 0,1
C18:1, n-9	233 ± 6	224,5 ± 0,2	96,4 ± 0,1	221,5 ± 0,2	95,1 ± 0,1
C18:1, n-7	14 ± 1	12,7 ± 0,6	88,7 ± 4,6	12,5 ± 0,6	87,6 ± 4,5
C18:2, n-6	523 ± 17	521 ± 2	99,6 ± 0,3	513 ± 2	98,2 ± 0,3
C18:3, n-3	*69 ± 3	66,4 ± 0,3	95,9 ± 0,4	65,4 ± 0,2	94,4 ± 0,3
C20:0	3,7 ± 0,5	3,38 ± 0,02	92,2 ± 0,5	3,26 ± 0,06	89,2 ± 0,4
C22:0	*3,7 ± 1,1	3,27 ± 0,05	88,4 ± 1,2	3,11 ± 0,04	84,0 ± 1,2

Ambas estrategias de cuantificación permiten la determinación de los FAMES presentes en el biodiesel. El empleo del ECN mejora los resultados cuantitativos de los FAMES C14:0-C18:0 en términos de exactitud. Sin embargo, existe una pequeña pérdida de exactitud para los FAMES mayoritarios del biodiesel C18:1-C18:3. Esta pérdida de exactitud es más acusada para los FAMES de mayor punto de ebullición eluidos en la parte final del cromatograma. A pesar de que la exactitud media mejora con el empleo del ECN, la débil pérdida de exactitud en los compuestos mayoritarios del biodiesel basado en soja produce un efecto indeseado en el resultado final.

La composición total de FAMES del SRM 2772, expresado como porcentaje en peso, es del 100,01%. En base a la Norma EN 14103, el contenido total de ésteres metílicos calculado es del 98,0%, mientras que empleando el ECN este parámetro disminuye hasta un 96,8%. En este caso particular, el método del porcentaje de área utilizado en la Norma da lugar a un menor error cuantitativo respecto al contenido total de FAMES que el obtenido cuando se emplea la corrección del ECN. Lo mismo ocurre para el FAME 18:3. Por lo tanto, la aplicación estricta de la Norma para biodiesel basado en soja, o para aquellos biodiesel cuyo perfil composicional esté dominado por los FAMES C18 da lugar a resultados cuantitativos más exactos. En este caso, el empleo del ECN no consigue mejorar la exactitud del procedimiento.

El contenido del FAME C17:0 utilizado como patrón interno representa un 0,1% de la composición total de los FAMES del SRM 2772. Con el objetivo de conocer el efecto de esta pequeña contribución en la cuantificación, se recalcularon las concentraciones para todos los FAMES de la muestra teniendo en cuenta el contenido del FAME C17:0 en el biodiesel. En esta ocasión, el porcentaje del contenido total de ésteres metílicos en el biodiesel fue del 99,6 y 98,5% cuando se aplica el método del porcentaje de áreas y el ECN, respectivamente. Por lo tanto, es muy importante resaltar que una contribución tan pequeña como de un 0,1% del FAME C17:0 en la muestra provoca un error en la cuantificación del 1,7%. La elección del patrón interno adecuado es fundamental para una cuantificación exacta tanto de los FAMES individuales de la muestra como del contenido total de ésteres metílicos en el biodiesel.

El empleo del SRM 2772 ha permitido validar la metodología utilizada por la Norma EN 14103 para la cuantificación individual de los FAMES de un biodiesel cuyo perfil composicional esté dominado por los FAMES C18. Sin embargo, la cuantificación de un biodiesel de composición más variada, cuyos FAMES mayoritarios sean los ésteres metílicos con un número de carbonos de 6 a 14, tendrá que realizarse empleando la contribución del ECN para cada átomo de carbono o grupo funcional si se precisan datos cuantitativos exactos.

IV.2.4 APLICACIÓN DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE CARBONO A LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

Por todo lo comentado en apartados anteriores, la determinación de los FAMES individuales de un biodiesel puede considerarse un campo de aplicación interesante para procedimientos de Dilución Isotópica en línea de carbono. Además, debido a la calidad de los resultados ofrecidos por el detector FID cuando se hace uso de su respuesta genérica, esta aplicación va a permitir comparar de manera experimental las características analíticas de ambos detectores para la cuantificación absoluta de alta calidad de compuestos orgánicos sin la necesidad de estándares individuales.

IV.2.4.1 Determinación de los FAMES individuales de una mezcla estándar

La separación GC se llevó a cabo empleando la misma columna cromatográfica que la utilizada en la Norma EN 14103. Con el objetivo de disminuir el tiempo del análisis cromatográfico se modificó el programa de temperaturas del horno. En la Tabla 5 se encuentran recogidas las condiciones cromatográficas utilizadas que permitieron la separación y cuantificación de los FAMES de la mezcla estándar en un tiempo de 17,2 min frente a los 32 minutos de la Norma. La mezcla estándar está constituida por los FAMES pares y saturados desde el C4:0 hasta el C24:0. La inyección de la muestra se realizó a través de un inyector PTV, a diferencia de la Norma que utiliza un inyector convencional split/splitless. Recordemos que la inyección PTV puede ofrecer una menor discriminación de los compuestos de la mezcla debido a la diferencia en los puntos de ebullición.

Tanto la concentración de los FAMES en la mezcla de trabajo como la del C17:0 utilizado como patrón interno fue un orden de magnitud menor que la utilizada en

GC-FID gracias a la sensibilidad más alta del equipo GC-combustión-IRMS. Además, de esta manera se alarga la vida útil del reactor de combustión e incluso se evitan posibles obturaciones.

En la Figura 39a se muestra un cromatograma modelo para los FAMES de la mezcla estándar tras la adición del trazador isotópico ($^{13}\text{CO}_2$) y la combustión de los analitos. La concentración de FAMES y de patrón interno en la mezcla estándar de trabajo fue de 15 y 10 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. La señal observada a m/z 44, procedente de los analitos de abundancia natural de la mezcla, da lugar al perfil cromatográfico, mientras que la señal constante a m/z 45 se corresponde con el $^{13}\text{CO}_2$ añadido en línea. Como ya se había observado en el capítulo anterior para otros compuestos orgánicos (alcanos, PAHs, PCBs, tiofenos) los picos cromatográficos obtenidos tienen un perfil gaussiano adecuado. Además, están bien resueltos a línea de base. Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 39a se empleó el modo backflush durante los primeros y últimos minutos del análisis para evitar la entrada del disolvente y de compuestos indeseados de alto peso molecular en el reactor de combustión, alargando así la vida útil del mismo. El butirato de metilo (C4:0) y el caproato de metilo (C6:0) no se pudieron resolver cromatográficamente bajo las condiciones experimentales utilizadas por su elución en la cola del disolvente y, por tanto, sólo los FAMES en el rango C8:0-C24:0 pudieron ser considerados.

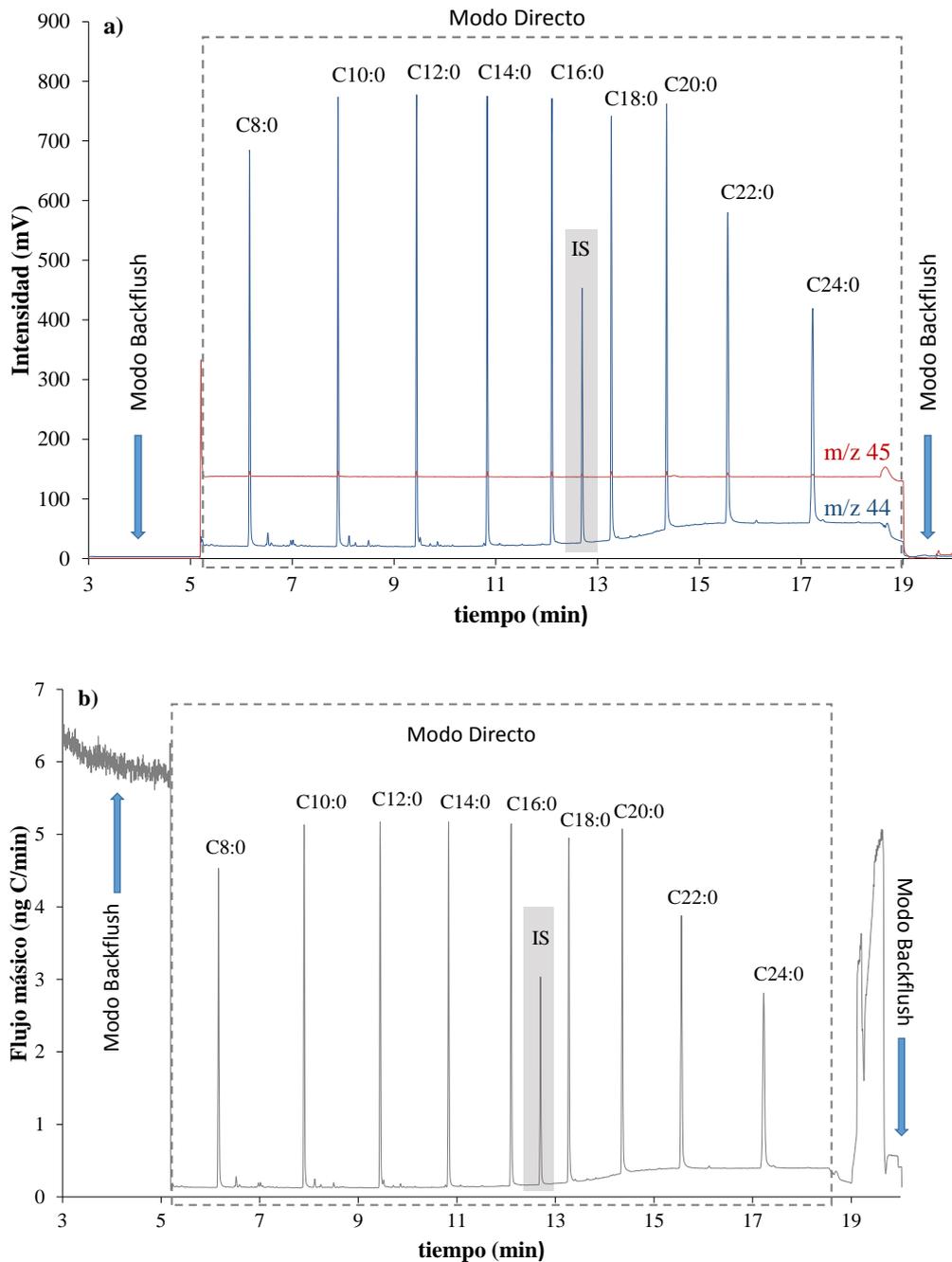


Figura 39. Cromatograma de intensidades (a) y de flujo másico (b) para la mezcla estándar de FAMES (15 $\mu\text{g C/g}$). El patrón interno empleado fue el heptadecanoato de metilo (10 $\mu\text{g C/g}$).

El cromatograma de intensidades mostrado en la Figura 39a se transformó en el cromatograma de flujo másico (Figura 39b) aplicando la ecuación de la Dilución Isotópica en línea (ecuación [24]). Tras la integración de los picos, se relacionó la concentración de patrón interno, expresada como concentración en carbono, con la concentración de compuesto a través de las áreas integradas en el cromatograma de flujo másico mediante la ecuación [25]. Este procedimiento permitió la cuantificación de los FAMES individuales en la mezcla estándar. Los resultados obtenidos se comparan en la Tabla 17 con los valores previos obtenidos mediante GC-FID. En esta tabla también se encuentran recogidos los resultados para los FAMES C18 insaturados que se cuantificaron en un análisis posterior. Como se puede observar, los valores de recuperación mejoran claramente respecto a los obtenidos por GC-FID incluso cuando se tiene en cuenta el ECN, obteniendo valores de recuperación desde un 96,4% para el FAME C24:0 hasta un 102,9% para el FAME insaturado C18:2. La recuperación media obtenida fue del 100,2%. Con ambas técnicas las concentraciones calculadas tuvieron una variabilidad menor del 1% RSD para la mayoría de los FAMES de la mezcla.

Tabla 17. Comparación de las recuperaciones obtenidas tras la determinación individual de los FAMES de una mezcla estándar (C4:0-C24:0) mediante GC-IRMS con Dilución Isotópica en línea de carbono y GC-FID, aplicando la norma EN 14103, y aplicando la corrección del ECN. La incertidumbre se da como la desviación estándar para $n=5$. El patrón interno utilizado fue el FAME C17:0.

FAME	Recuperación (%)		
	GC-C-IRMS	GC-FID EN 14103	GC-FID ECN
C4:0	----	54,4 ± 1,7	104,2 ± 3,2
C6:0	----	71,1 ± 1,9	104,1 ± 2,8
C8:0	99,2 ± 0,9	81,6 ± 1,8	103,8 ± 2,3
C10:0	100,2 ± 0,9	88,3 ± 0,8	102,8 ± 1,0
C12:0	101,3 ± 0,5	91,1 ± 0,2	99,9 ± 0,3
C14:0	100,9 ± 0,5	94,9 ± 0,4	99,4 ± 0,4
C16:0	101,4 ± 1,1	97,4 ± 0,1	98,7 ± 0,1
C18:0	100,2 ± 0,4	99,7 ± 0,1	98,4 ± 0,1
C18:1	102,9 ± 0,4	102,2 ± 0,1	100,9 ± 0,1
C18:2	102,6 ± 0,3	97,0 ± 0,1	95,7 ± 0,1
C18:3	98,1 ± 0,3	95,8 ± 0,2	94,4 ± 0,2
C20:0	101,0 ± 1,0	101,9 ± 0,4	98,5 ± 0,3
C22:0	98,6 ± 0,8	100,3 ± 0,7	95,3 ± 0,6
C24:0	96,4 ± 0,7	96,4 ± 0,8	90,2 ± 0,7

IV.2.4.2 Evaluación de la respuesta del inyector para la mezcla estándar de FAMES C8:0-C24:0

Una importante diferencia entre la instrumentación GC-FID y GC-IRMS utilizada es el tipo de inyectores disponibles. Mientras que el equipo GC-FID usado tan sólo dispone de un inyector convencional split/splitless (requerido por la Norma), el equipo GC-IRMS está equipado además con un inyector PTV. Basados en los resultados del capítulo anterior, donde quedó constatada la influencia del inyector en la discriminación de los compuestos por la diferencia en sus puntos de ebullición, el inyector PTV fue inicialmente seleccionado para la determinación de los FAMES de la mezcla estándar.

Los resultados mostrados en la Tabla 17 para la instrumentación GC-FID quizás podrían haberse mejorado si un inyector PTV hubiera estado disponible en este equipo. Con el objetivo de comparar las condiciones de inyección cromatográficas para los analitos en estudio se llevó a cabo un estudio comparativo entre la inyección convencional split/splitless y la inyección PTV, empleando la instrumentación GC-IRMS. Las condiciones de inyección para ambos inyectores se muestran en la Tabla 5. La Figura 40 ilustra la respuesta observada para cada FAME de la mezcla estándar de los FAMES pares y saturados desde el C8:0 hasta el C24:0, en ambos modos de inyección.

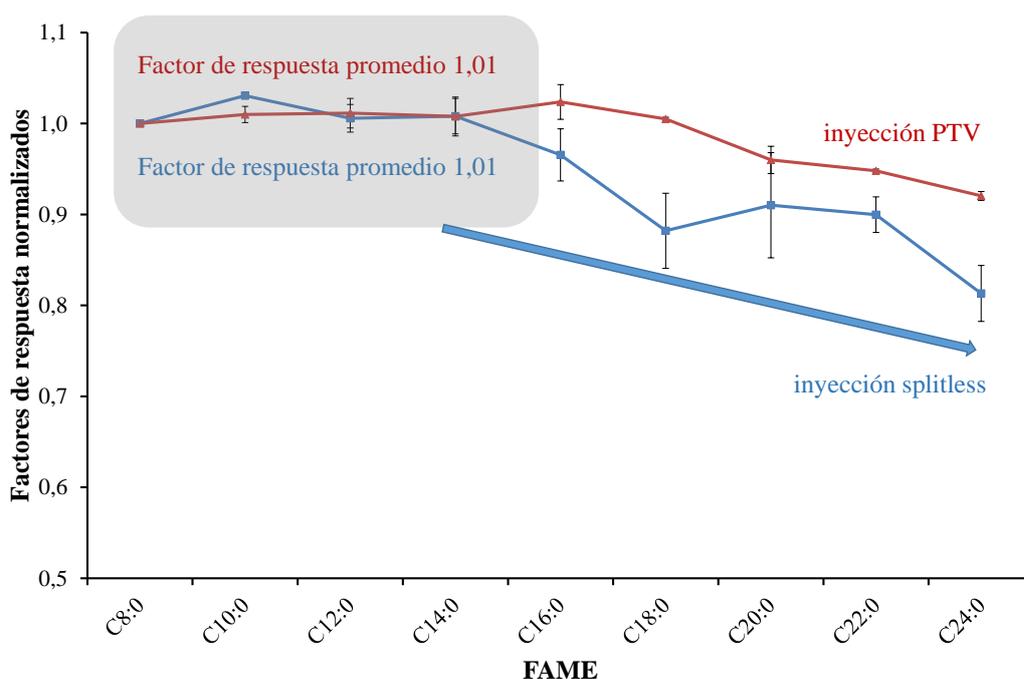


Figura 40. Comparación de los factores de respuesta normalizados (área por $\mu\text{g C/g}$ inyectado) de los 9 FAMES analizados, dados por orden de elución, empleando inyección splitless e inyección PTV y Dilución Isotópica de Carbono. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar para $n=5$.

Las áreas de pico para cada analito de la mezcla se calcularon a partir del cromatograma de intensidades para m/z 44. Estas áreas se dividieron por su concentración en carbono y se normalizaron frente al valor correspondiente para el primer compuesto eluido (C8:0) de la mezcla. Como se puede observar la

respuesta fue constante entre los FAMES C8:0 y C14:0 en ambos modos de inyección, obteniendo un factor de respuesta de 1,01. Sin embargo, la respuesta disminuye para los FAMES de mayor peso molecular cuando se emplea la inyección split/splitless, mientras que fue prácticamente constante para el inyector PTV. En comparación con el inyector split/splitless, la inyección PTV da lugar a una mejora en la respuesta de entre un 5 y 15% para los FAMES de peso molecular más alto. Por lo tanto, el inyector PTV reduce la discriminación en el inyector causada por los diferentes puntos de ebullición de los FAMES estudiados, en un rango de 195-420°C, proporcionando una transmisión prácticamente cuantitativa durante esta etapa. Este hecho podría explicar los resultados mostrados en la Tabla 17 para GC-FID cuando se emplea la corrección del ECN para los FAMES de alto peso molecular, donde las recuperaciones fueron sustancialmente más bajas respecto a las obtenidas cuando la corrección no fue aplicada debido probablemente a que la sobreestimación de los resultados producida por el número de C compensa su menor transmisión en el inyector. De nuevo, esta particularidad del inyector split/splitless no se toma en consideración en la Norma EN 14103.

IV.2.4.3 Características analíticas de la instrumentación GC-IRMS para la cuantificación de los FAMES individuales de un biodiesel

IV.2.4.3.1 Linealidad

Se evaluó la linealidad del método utilizando 5 concentraciones crecientes de la mezcla estándar de FAMES en un rango de 3 a 700 µg C/g (de 5 µg/g a 1 mg/g) con 5 réplicas por cada nivel de concentración. Los resultados no mostraron una desviación significativa de linealidad con un coeficiente de correlación mayor de 0,99. Sin embargo, fue necesario tener en cuenta que la precisión medida en las disoluciones estándar al nivel de concentración más alto (700 µgC/g) fue del 14%, mientras que la precisión a niveles intermedios fue aproximadamente del 1%. Para el nivel de concentración más bajo medido (3 µgC/g) se obtuvo una precisión del 4%. Estos valores indican que concentraciones de 700 µgC/g son demasiado altas para el horno de combustión, estando además muy cerca de la saturación del detector. Este rango lineal permitirá la cuantificación de los cinco FAMES mayoritarios en el SRM 2772 basado en soja tras una dilución mínima de 1:1000. Sin embargo, la cuantificación de los FAMES mayoritarios y minoritarios

utilizando un solo factor de dilución no será posible debido a la gran diferencia de concentración.

IV.2.4.3.2 Resolución Cromatográfica

En el equipo GC-IRMS, los analitos eluidos de la columna cromatográfica recorren una mayor distancia que en instrumentos GC-FID. Los analitos separados por GC pasan a través del reactor de combustión donde se oxidan a CO₂ y H₂O. A continuación, el agua se elimina por el paso de la corriente de gas a través de una membrana de Nafion permeable al agua, y finalmente el CO₂ se introduce en la fuente de ionización del espectrómetro de masas a través del sistema amortiguador de presión. Esta trayectoria más larga es la causante del ensanchamiento de los picos cromatográficos, especialmente el paso por la membrana de Nafion. La Figura 41 muestra el perfil de pico obtenido para el FAME C16:0 (53,25 µg/g de compuesto y 40,17 µg C/g) mediante GC-IRMS.

Como se puede observar, el ancho de pico a mitad de altura fue de 2,1 segundos. Por otro lado, para una disolución similar del FAME C16:0 (177 µg/g de compuesto y 133 µgC/g) analizada mediante GC-FID, el ancho de pico a mitad de altura fue de 1,3 segundos. Por lo tanto, el GC-FID proporciona una mayor eficacia cromatográfica que el GC-IRMS. La cuantificación individual de los isómeros de los FAMES C18:1, C18:2 y C18:3 del biodiesel certificado basado en soja puede no ser posible debido a la pérdida de resolución de la instrumentación empleada.

IV.2.4.3.3 Límites de detección

El límite de detección se calculó a partir de tres veces la desviación estándar de la señal obtenida para el fondo a m/z 44 en la medida de la mezcla estándar de FAMES a un bajo nivel de concentración. La desviación estándar del fondo se midió justo antes de la elución del pico de interés. De esta manera, el límite de detección calculado para el FAME C16:0 fue de 10,16 ng C/g. Teniendo en cuenta el volumen de inyección (1 µL) y el ancho de pico en línea de base (9s) fue posible el cálculo del límite de detección independientemente de la columna utilizada y del flujo de gas portador. El límite de detección calculado para el FAME C16:0 fue de 0,8 pg/s. Este límite de detección fue un orden de magnitud menor que el normalmente encontrado en GC-FID (10 pg C/s).

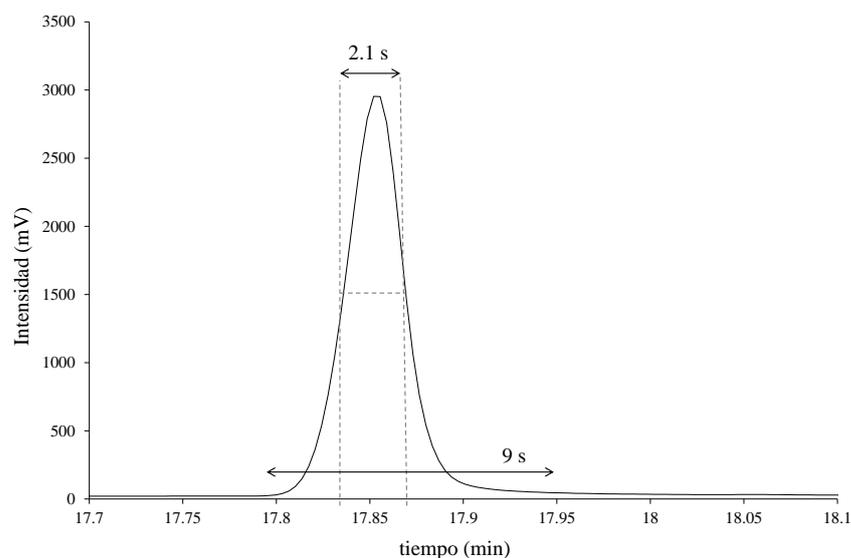


Figura 41. Cromatograma de intensidad obtenido para el hexanoato de metilo (C16:0) mediante GC-IRMS.

IV.2.4.4 Determinación de los FAMEs individuales presentes en un biodiesel B100 certificado

La validación del método propuesto se realizó a través del análisis del material de referencia certificado SRM 2772. La dilución de la muestra necesaria para entrar en el rango de linealidad del método fue de 1:2500 en hexano. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0) y la concentración empleada fue de 20 $\mu\text{gC/g}$. La Figura 42 muestra el cromatograma de flujo másico obtenido correspondiente al SRM 2772 mediante GC-IRMS. Debido al bajo rango lineal de la metodología no fue posible la cuantificación de los FAMEs mayoritarios y minoritarios en un mismo análisis. Puesto que los principales FAMEs del biodiesel certificado basado en soja representan un 99,3% de la composición en FAMEs del biodiesel analizado, sólo se presentarán los resultados obtenidos para los FAMEs C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3. Además, debido al ensanchamiento de los picos por el paso de la corriente del gas a través de la membrana de Nafion los isómeros de los FAMEs C18:1 y C18:2 no se separaron a línea de base, produciéndose la pérdida de información posicional debido a sus condiciones de resolución más pobres.

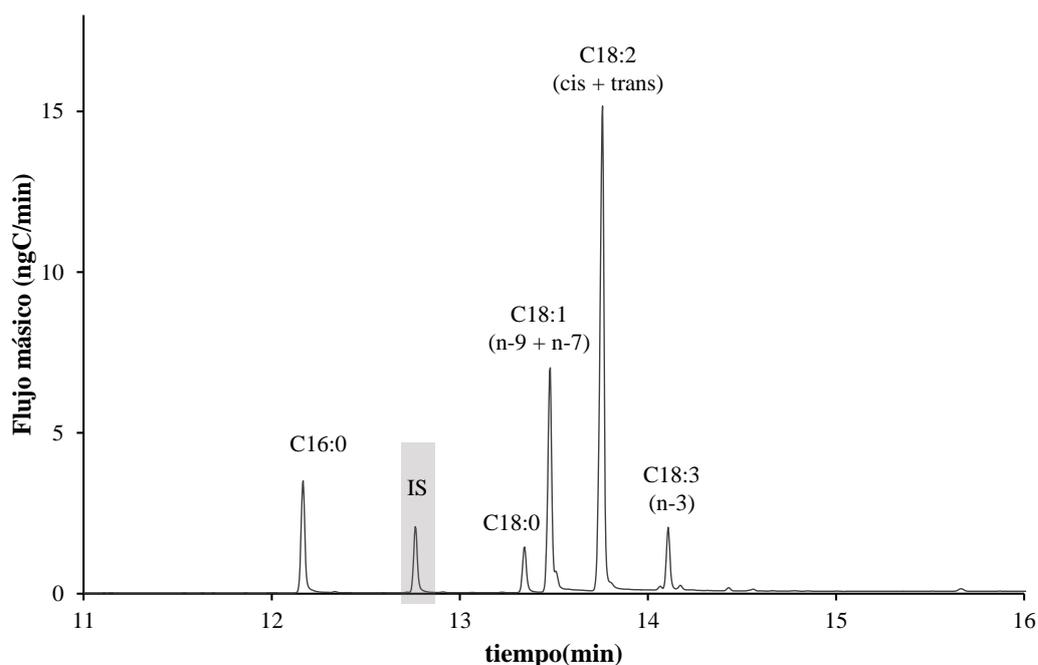


Figura 42. Perfil cromatográfico de los FAMEs presentes en el SRM 2772 a través del cromatograma de flujo másico obtenido mediante GC-combustión-IRMS. El patrón interno utilizado fue el heptadecanoato de metilo (C17:0).

La Tabla 18 recoge las concentraciones encontradas y sus correspondientes recuperaciones calculadas tras el análisis del SRM 2772 mediante GC-IRMS con Dilución Isotópica en línea de carbono. Además, estos datos se compararon con los obtenidos mediante GC-FID cuando se aplicó la Norma EN 14103. No se han incluido aquí los datos correspondientes a la corrección del ECN mediante GC-FID ya que los resultados para los compuestos certificados fueron muy similares a los obtenidos cuando sí fue tenido en cuenta. Cabe señalar que los datos correspondientes al FAME C18:1 corresponden a la suma de sus dos isómeros de posición C18:1 (n-9) y C18:1 (n-6) ya que el método no permite la resolución entre ambos compuestos tal y como se mencionó antes. Además, el FAME C18:2 también se dará como la suma de los isómeros cis y trans aunque el certificado de análisis sólo refleja la concentración para el isómero cis. Debido al bajo porcentaje que representa, el error que se comete en la cuantificación se puede considerar despreciable. El contenido total de FAMEs encontrado, dado como

fracción de masa en tanto por ciento, fue de un 98,1% y de un 97,4% mediante GC-IRMS y GC-FID, respectivamente. Además, los valores de recuperación encontrados mediante GC-IRMS estuvieron en concordancia con las recuperaciones esperadas recomendadas por la AOAC (98-102%) a este nivel de concentración.

Al igual que mediante GC-FID, se recalcularon las concentraciones encontradas y las recuperaciones calculadas teniendo en cuenta el porcentaje del FAME C17:0 presente en la muestra de biodiesel certificada, ya que este FAME es utilizado como patrón interno. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 19. En este caso, el contenido total de los FAMEs mayoritarios del SRM 2772 fue de un 99,7% mediante GC-IRMS frente al 99,1% obtenido mediante GC-FID. El empleo de un patrón interno adecuado que no esté presente en la muestra mejorará por tanto la exactitud de los resultados cuantitativos. La buena concordancia obtenida entre los valores certificados y encontrados para los FAMEs cuantificados utilizando ambas técnicas demuestra que la metodología propuesta GC-IRMS se puede utilizar también de manera fiable en la determinación de FAMEs en muestras de biodiesel empleando el C17:0 como patrón interno y sin la necesidad de calibraciones externas.

IV.2.4.5 Evaluación de patrones internos alternativos para GC-IRMS

La cuantificación absoluta sin estándares específicos ni calibraciones externas necesita la comparación del área del pico de los analitos con el área de pico de un patrón interno. La selección del patrón interno adecuado es crítica cuando se emplea GC-FID ya que el patrón interno ideal debería tener una naturaleza química y un número de átomos de carbono similares a los de los analitos, lo que obliga a emplear un FAME próximo a los que se cuantifican. Sin embargo, en GC-IRMS la naturaleza del patrón interno y su número de carbonos debería ser irrelevante a priori mientras el patrón interno no se encuentre presente en la muestra y no aparezca solapado con ninguno de los compuestos de la misma. Para examinar la influencia del compuesto utilizado como patrón interno en la respuesta genérica del detector se llevó a cabo un análisis mediante GC-IRMS.

Resultados y discusión

Tabla 18. Comparación de las recuperaciones cuantitativas obtenidas de los FAMES individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID sin el empleo del ECN. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno.

FAME	SRM 2772	GC-combustión-IRMS		GC-FID EN 14103	
	Certificado (mg/g)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)
C16:0	107 ± 2	105,8, ± 0,7	98,9 ± 0,7	103,1 ± 0,1	96,4 ± 0,1
C18:0	43 ± 3	42,8 ± 0,2	99,5 ± 0,5	43,69 ± 0,03	101,6 ± 0,1
C18:1, n-9	233 ± 6	**245 ± 2	**98,9 ± 0,9	224,5 ± 0,2	96,4 ± 0,1
C18:1, n-7	14 ± 1	---	---	12,7 ± 0,6	88,7 ± 4,6
C18:2, n-6***	523 ± 17	517 ± 2	98,9 ± 0,4	524 ± 2	99,8 ± 0,3
C18:3, n-3	*69 ± 3	70,5 ± 1,0	101,8 ± 1,6	66,4 ± 0,3	95,9 ± 0,4

*Valor de referencia

** Suma de los isómeros C18:1(n-9) y C18:1(n-6)

*** Suma de los isómeros C18:2 (cis) y C18:2 (trans)

Resultados y discusión

Tabla 19. Comparación de las recuperaciones cuantitativas obtenidas de los FAMES individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID sin el empleo del ECN teniendo en cuenta el porcentaje del FAME C17:0 presente en el biodiesel. El FAME C17:0 se utilizó como patrón interno.

FAME	SRM 2772	GC-combustión-IRMS		GC-FID EN 14103	
	Certificado (mg/g)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)	Encontrado (mg/g)	Recuperación (%)
C16:0	107 ± 2	107,7, ± 0,8	100,6 ± 0,7	104,9 ± 0,1	98,0 ± 0,1
C18:0	43 ± 3	43,5 ± 0,2	101,2 ± 0,5	44,44 ± 0,03	103,3 ± 0,1
C18:1, n-9	233 ± 6	**248 ± 2	**100,6 ± 1,1	228,4 ± 0,2	98,2 ± 0,1
C18:1, n-7	14 ± 1	---	---	12,9 ± 0,6	92,1 ± 4,1
C18:2, n-6***	523 ± 17	526 ± 2	100,6 ± 0,5	533 ± 2	101,3 ± 0,3
C18:3, n-3	*69 ± 3	71,8 ± 1,1	103,5 ± 1,6	67,6 ± 0,2	97,5 ± 0,4

*Valor de referencia

** Suma de los isómeros C18:1(n-9) y C18:1(n-6)

*** Suma de los isómeros C18:2 (cis) y C18:2 (trans)

Resultados y discusión

Se preparó una disolución de trabajo que contiene aproximadamente 40 µgC/g de los FAMES pares y saturados C4:0-C24:0, y 20 µgC/g de los tres FAMES insaturados C18, en n-hexano. Se evaluaron tres patrones alternativos. El FAME empleado en la Norma (heptadecanoato de metilo, C17:0) se comparó con dos hidrocarburos lineales: el heptadecano (C17) con el mismo número de átomos de carbono y el tridecano (C13) de bajo peso molecular. Los tres patrones internos se añadieron en una concentración de 20 µgC/g. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla 20. Como se puede observar, la recuperación de todos los FAMES estudiados fue cuantitativa y similar para los tres candidatos a patrón interno. La recuperación media obtenida fue de 99,1% para el FAME C17:0, y de 99,0 y 99,8% para los n-alcenos heptadecano y tridecano, respectivamente.

Tabla 20. Recuperaciones calculadas de los FAMES individuales de la mezcla estándar de los FAMES pares y saturados C4:0-C24:0 y de los FAMES C18 insaturados obtenidos mediante GC-IRMS examinando diferentes compuestos como patrón interno. Las incertidumbres indican las desviaciones estándar para n=5.

FAME	Añadido, µgC/g	Recuperación %		
		C17:0	C17	C13
C8:0	37,07	99,4 ± 0,9	99,4 ± 0,6	100,2 ± 0,4
C10:0	38,18	101,1 ± 1,2	100,9 ± 1,0	101,8 ± 1,2
C12:0	39,22	99,9 ± 0,5	99,8 ± 0,3	100,7 ± 0,7
C14:0	39,42	100,6 ± 0,7	100,6 ± 0,5	101,4 ± 0,9
C16:0	40,17	100,1 ± 0,1	100,0 ± 0,5	100,8 ± 1,1
C18:0	40,59	97,5 ± 1,2	97,5 ± 0,8	98,3 ± 0,7
C18:1	18,36	99,0 ± 1,3	98,9 ± 0,9	99,7 ± 0,6
C18:2	24,38	100,2 ± 0,7	100,2 ± 0,6	101,0 ± 0,8
C18:3	16,84	99,4 ± 0,5	99,4 ± 0,2	99,8 ± 0,6
C20:0	41,05	98,7 ± 0,4	98,6 ± 0,5	99,4 ± 1,1
C22:0	41,11	97,5 ± 0,4	97,4 ± 0,3	98,2 ± 0,7
C24:0	41,54	95,8 ± 0,6	95,8 ± 0,9	96,6 ± 1,1

Estos datos sugieren que la metodología propuesta permite la cuantificación de los FAMES individuales de un biodiesel, o por extensión cualquier otro compuesto

orgánico volátil, utilizando un patrón interno genérico, con un número de C y una naturaleza tanto similar como diferente a la de los analitos estudiados. Este comportamiento completamente genérico para el patrón interno se debe a la oxidación cuantitativa de los compuestos eluidos a CO₂ en el reactor de combustión y a la selección de un inyector cromatográfico que no da lugar a la discriminación de los compuestos con puntos de ebullición muy diferentes, como es el caso del inyector PTV.

La validación de la metodología con el patrón interno C17 fue realizada a través de la determinación de los FAMEs individuales del SRM 2772. A diferencia del FAME C17:0, el C17 eluye en una zona limpia del cromatograma. Por lo tanto, los valores cuantitativos obtenidos no se verán afectados por la presencia de compuestos minoritarios que coeluyan con el patrón interno. Los valores de recuperación obtenidos para los cinco FAMEs mayoritarios del biodiesel certificado basado en soja estuvieron en el rango de 98,0-100,7%, estando de nuevo en concordancia con las recomendadas por la AOAC.

Con el fin de comparar el carácter genérico de este nuevo detector para GC con el detector FID, se analizó el SRM 2772 empleando el C17 como patrón interno mediante GC-FID. En la Tabla 21 están recogidas las recuperaciones encontradas tanto por GC-IRMS como por GC-FID empleando el C17:0 y el C17 como patrón interno. Además, en el caso del análisis mediante GC-FID también se calcularon las recuperaciones obtenidas empleando la corrección del ECN cuando se utilizó el C17 como patrón interno.

Como se puede observar en la Tabla 21, la aplicación directa de la Norma EN 14103 no permite la cuantificación genérica de los FAMEs individuales del biodiesel basado en soja cuando se utiliza el alcano C17 como patrón interno. El principal motivo radica en la diferente naturaleza existente entre el patrón interno y los FAMEs analizados. Las recuperaciones obtenidas se encuentran en un rango de 78,3-83,7%, estando muy lejos de proporcionar una cuantificación exacta. Sin embargo, el empleo del ECN para predecir los factores de respuesta relativos de los analitos respecto al patrón interno, mejora la exactitud de los datos cuantitativos obtenidos (98,0-103,9%). Las recuperaciones calculadas pueden competir ahora con las encontradas cuando se emplea el C17:0 como patrón interno para la cuantificación. Por lo tanto, el empleo del ECN permite el uso de

patrones internos de diferente naturaleza a la de los analitos para la cuantificación absoluta de los FAMES mayoritarios de un biodiesel, aunque con un nivel de exactitud menor que el que proporciona el modo de detección completamente genérico que es la dilución isotópica de C y GC-IRMS.

Tabla 21. Comparación de las recuperaciones obtenidas para los FAMES individuales del SRM 2772 mediante GC-IRMS y GC-FID empleando patrones internos de diferente naturaleza.

FAME	Recuperación (%)				
	GC-combustión-IRMS		GC-FID		
	C17:0	C17	C17:0	C17	C17 ECN
C16:0	100,6 ± 0,7	100,1 ± 0,7	98,0 ± 0,1	78,5 ± 0,8	100,1 ± 0,4
C18:0	101,2 ± 0,5	99,1 ± 0,3	103,3 ± 0,1	83,7 ± 0,7	103,9 ± 0,4
*C18:1	100,6 ± 1,1	98,4 ± 0,9	97,6 ± 0,3	78,3 ± 0,5	98,0 ± 0,6
**C18:2	100,6 ± 0,5	99,3 ± 0,5	101,3 ± 0,3	82,0 ± 0,2	101,6 ± 0,3
C18:3	103,5 ± 1,6	100,8 ± 1,0	97,5 ± 0,4	79,0 ± 0,2	97,8 ± 0,1

* Suma de los isómeros C18:1(n-9) y C18:1(n-6)

** Suma de los isómeros C18:2 (cis) y C18:2 (trans)

IV.3 CAPÍTULO III

Combinación de la Dilución Isotópica en Línea de Carbono y el Análisis Isotópico Específico del Compuesto en GC-IRMS para la discriminación por el origen en muestras de biodiesel.

La metodología propuesta para la cuantificación individual de los principales FAMES de un biodiesel mediante IDMS en línea de carbono con GC-IRMS se desarrolló dentro del marco del proyecto europeo JRP-EN09 “*Metrology for Biofuels*”. El grupo de investigación tuvo la oportunidad de formar parte de este proyecto gracias a las características analíticas que proporciona la Dilución Isotópica en línea de carbono. La posibilidad de la caracterización química de un biodiesel sin la necesidad de estándares específicos ni calibraciones externas a través de metodologías de análisis que proporcionan resultados de alta calidad supone una gran ventaja sobre otras metodologías analíticas.

Las tareas asignadas por el proyecto fueron las siguientes:

- TAREA 1: Desarrollo de un procedimiento para la evaluación de la pureza de estándares de calibración del glicerol mediante LC-oxidación-IRMS.
- TAREA 2: Desarrollo de un procedimiento absoluto para la caracterización química de biodiesel basado en GC-Combustión-IRMS.

- TAREA 3: Empleo del Análisis Isotópico Específico del Compuesto (CSIA) en combinación con la Dilución Isotópica en línea de carbono para la discriminación por el origen del biodiesel.

Las dos últimas tareas forman parte de la presente Tesis Doctoral y en este último capítulo se abordarán los éxitos y fracasos de las tareas encomendadas. Para la realización de las mismas, el proyecto proporcionó cuatro muestras de biodiesel B100 de diferente origen vegetal y geográfico: (i) SME-mx, un biodiesel mejicano basado en soja; (ii) SME-b, un biodiesel brasileño basado en soja; (iii) CME-us, un biodiesel americano basado en canola; y, (iv) RME-de, un biodiesel alemán basado en colza. Además, durante los estudios realizados también se utilizó una muestra de biodiesel con un origen vegetal desconocido proporcionada por una empresa anónima española a lo que se denominó UME-es.

IV.3.1 DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO ABSOLUTO PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BODIESEL (TAREA 2)

La caracterización química de un biodiesel implica la cuantificación de todos los componentes, mayoritarios y minoritarios, constituyentes del mismo. El biodiesel está formado principalmente por una mezcla de FAMEs, y el perfil composicional de los mismos está dominado generalmente por los FAMEs C16 y C18. Sin embargo, existen otros componentes minoritarios del biodiesel que también están involucrados en su caracterización como los mono-, di-, y triglicéridos sin reaccionar del proceso de transesterificación que transforma el aceite vegetal en el biodiesel, las trazas de metanol y catalizador empleados en dicho proceso, el agua contenida en el biodiesel empleada en el proceso de purificación del biodiesel o absorbida por el mismo debido a su carácter higroscópico, el glicerol libre, y otras impurezas generadas debido a la baja estabilidad oxidativa que presenta.

El procedimiento IDMS en línea de carbono desarrollado sólo permite la caracterización del biodiesel a través de la cuantificación de los principales FAMEs que lo constituyen debido al bajo rango lineal que presenta. La cuantificación de los componentes minoritarios, aptos para su determinación mediante GC, sólo podría realizarse a través de procesos de extracción o preconcentración específicos para los compuestos de interés, o mediante la inyección del biodiesel de manera directa en el sistema cromatográfico. Los

procesos de extracción o preconcentración suelen dar lugar a la discriminación de los compuestos dependiendo de la naturaleza de los mismos. Por lo tanto, sería necesario el empleo de un patrón interno adecuado para las diferentes familias de compuestos a determinar. Por otro lado, la inyección del biodiesel sin una dilución previa del mismo, o con la mínima dilución daría lugar a una saturación del reactor de combustión y del detector debido a la gran cantidad inyectada de los FAMES mayoritarios del mismo. En este sentido, el empleo del sistema backflush podría ser una buena alternativa para evitar la entrada a la interfase de combustión de estos compuestos. Sin embargo, se perdería información de los compuestos minoritarios eluidos en el mismo rango de tiempo. Por lo tanto, la caracterización de las diferentes muestras del biodiesel proporcionadas sólo puede llevarse a cabo a través de la cuantificación de los principales FAMES constituyentes del biodiesel. Esta cuantificación se realizó tanto por Dilución Isotópica en línea de carbono, empleando los dos patrones genéricos utilizados durante el desarrollo de la metodología, como por GC-FID. Las propiedades físicas del biodiesel dependen claramente de la longitud de la cadena de cada FAME individual, su número de insaturaciones y su concentración. En este sentido cabe resaltar que también fue posible calcular algunos de estos parámetros que definen la calidad del un biodiesel a través de los datos cuantitativos obtenidos tras la aplicación de los diferentes procedimientos.

IV.3.1.1 Cuantificación de los principales FAMES constituyentes en muestras reales de biodiesel

Todas las muestras proporcionadas por el proyecto JRP-EN09 fueron de origen vegetal, por lo que el FAME C17:0 fue adecuado para su uso como patrón interno genérico. Además, el n-alcano C17 también se empleó como patrón interno cuando se realizó la cuantificación mediante Dilución Isotópica en línea de carbono por su carácter genérico, claramente demostrado en el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral.

Las muestras se diluyeron en n-hexano para su introducción en el GC. La dilución realizada para GC-FID fue de 1:300, mientras que para GC-IRMS fue de 1:2500. Recordar que el rango lineal del metodología cuando se aplica la dilución isotópica en línea de carbono no permite la introducción de muestras de elevada concentración, debido principalmente a la saturación del detector y a la interfase

de combustión. La concentración del patrón interno C17:0 fue de 210 $\mu\text{g/g}$ cuando se empleó la instrumentación GC-FID, mientras que la concentración de los patrones genéricos utilizados en GC-IRMS fue de 60 $\mu\text{g/g}$ para el FAME 17:0 y de 15 $\mu\text{g/g}$ para el n-alcano C17. Las condiciones cromatográficas utilizadas por ambas metodologías fueron las mismas que las empleadas para la cuantificación de FAMEs en el SRM 2772 B100 basado en soja y están recogidas en la Tabla 5 de la Sección Experimental.

En la Figura 43 se muestra el perfil cromatográfico de las dos muestras de biodiesel basado en soja a través de los cromatogramas de flujo másico obtenidos tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono, empleando el FAME C17:0 como patrón interno. La resolución de la instrumentación GC-FID permite la diferenciación de los isómeros C18, mientras que el ensanchamiento producido en GC-IRMS, debido principalmente a la membrana de Nafion, no permite una separación en línea de base de los isómeros de posición del FAME C18:1 y de los isómeros cis y trans del FAME C18:2. Por lo tanto, los análisis realizados mediante GC-FID permitieron la confirmación de la presencia o ausencia de los isómeros de los FAMEs C18.

Debido al origen vegetal común que presentan ambas muestras, su composición en FAMEs es prácticamente idéntica. Los perfiles obtenidos están dominados por los FAMEs C18:1 y C18:2 en una proporción aproximada de 1:2. A diferencia del SRM 2772 basado en soja, las muestras analizadas no contienen dos de los isómeros de posición del FAME C18:3, observando tan sólo el FAME 18:3 (n-3) en los cromatogramas obtenidos. Los análisis realizados mediante GC-FID confirman la ausencia de estos isómeros en las muestras de biodiesel basados en soja. Los dos isómeros de posición del FAME C18:1 aparecen solapados. Sin embargo, sí fue posible su diferenciación mediante GC-FID, por lo que se puede confirmar su presencia en ambas muestras. Por último, el FAME C18:2 aparece como un solo pico. Los análisis realizados por GC-FID confirman la ausencia del isómero trans del FAME C18:2.

En la Figura 44 se muestran los cromatogramas de flujo másico obtenidos para las muestras de biodiesel basadas en canola y colza.

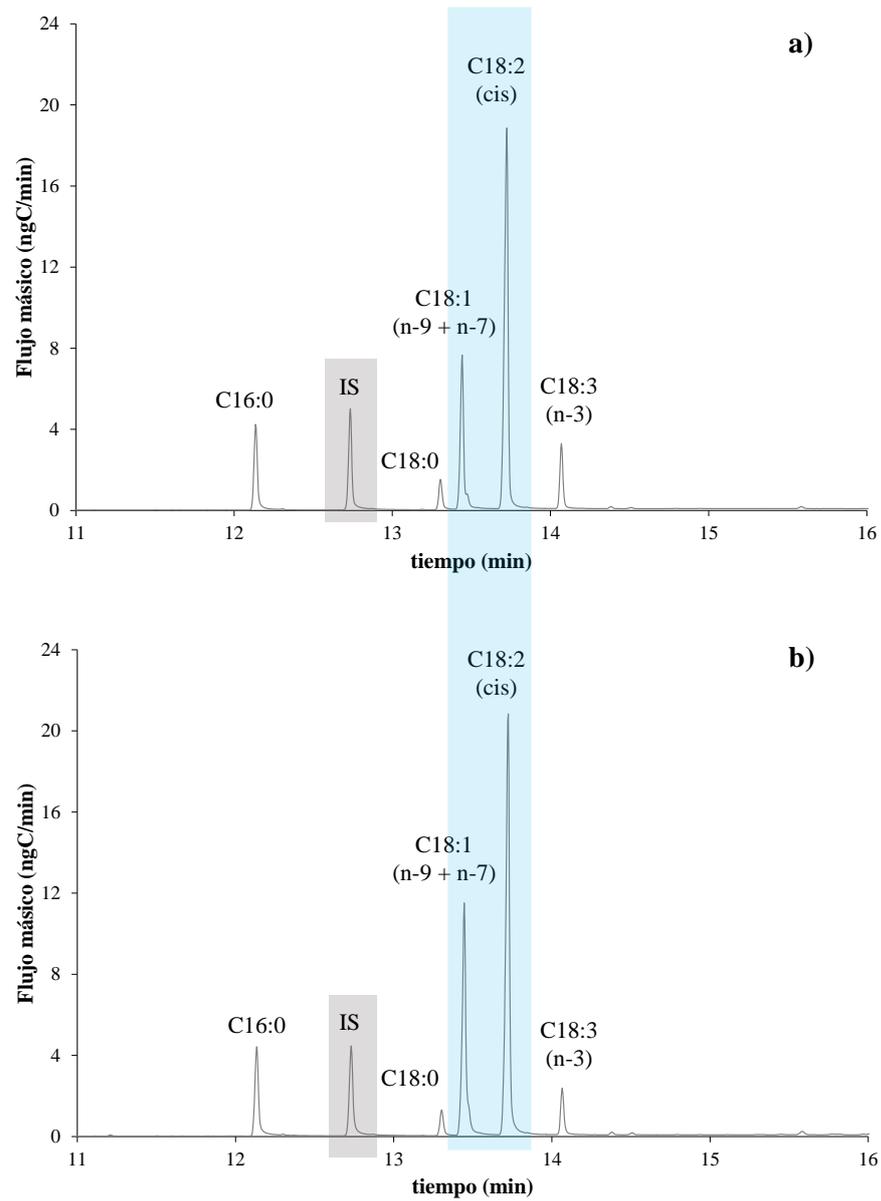


Figura 43. Perfil cromatográfico de los biodiesel basados en soja (a) biodiesel mejicano SME-mx y (b) biodiesel brasileño SME-br, obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.

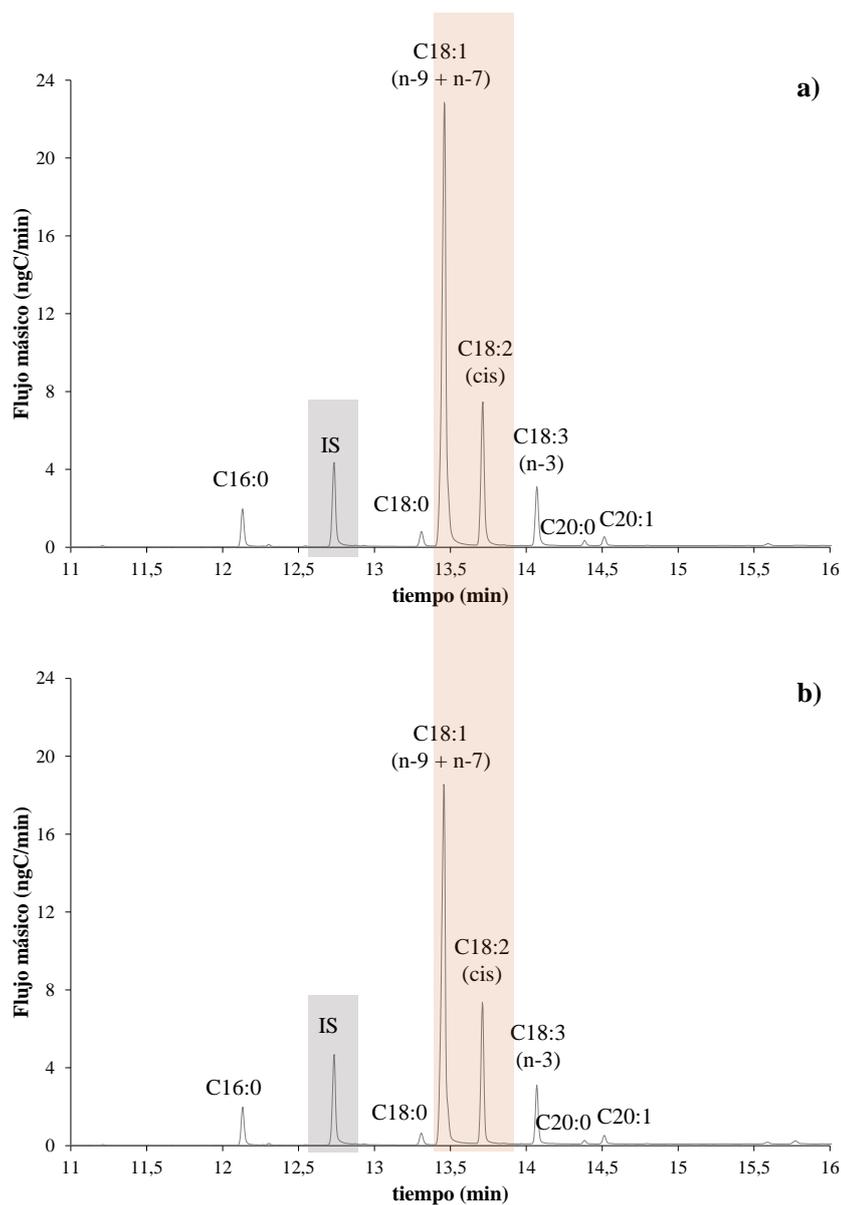


Figura 44. Perfil cromatográfico de los biodiesel basados en canola (a) biodiesel americano CME-us y (b) biodiesel alemán RME-de, obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.

Ambas muestran un perfil composicional similar. Al igual que las muestras de biodiesel basadas en soja, éstas están dominadas por los FAMES C18. Sin

embargo, la proporción de los FAMES C18:1 y C18:2 es opuesta a la observada en los biodiesel basados en soja, siendo en este caso de 2:1.

Además, en los cromatogramas de la Figura 44 se puede observar la presencia de los FAMES C20:0 y C20:1 en ambos casos. De nuevo, los análisis realizados por GC-FID confirmaron la presencia de los dos isómeros del FAME 18:1, y la ausencia del isómero trans del C18:2 y los isómeros de posición del FAME C18:3. Se puede confirmar que el perfil de FAMES en las muestras de biodiesel permiten diferenciar los biodiesel basados en soja de los basados en colza y canola, debido principalmente a la composición de los FAMES 18:1 y C18:2 y a la presencia de los FAMES C20:0 y C20:1. Sin embargo, una diferenciación entre ambas parejas requiere la cuantificación exacta de los FAMES individuales.

Una vez conocido el perfil de FAMES de las muestras de biodiesel con un origen vegetal y geográfico conocido, se analizó la muestra de biodiesel desconocida UME-es proporcionada por una empresa española productora de biodiesel. El cromatograma de flujo másico obtenido empleando el FAME C17:0 como patrón interno se muestra en la Figura 45. El análisis realizado mediante GC-FID confirmó la presencia de los dos isómeros de posición del FAME C18:1, y la ausencia de los isómeros minoritarios de posición del FAME C18:3 y del isómero trans del FAME C18:2. El perfil de los FAMES C18 es similar al de los obtenidos para colza o canola. Sin embargo, este biodiesel está claramente dominado por el FAME C16:0, a diferencia del resto de los biodiesel estudiados.

Los resultados cuantitativos obtenidos están recogidos en la Tabla 22, donde sólo se muestran los cinco FAMES relevantes de las cuatro muestras de biodiesel de origen vegetal y de la muestra de biodiesel desconocida. Los datos obtenidos mediante GC-IRMS se obtuvieron empleando el FAME C17:0 y el n-alcano C17 como patrones internos genérica. Para los análisis realizados por GC-FID se utilizó el FAME C17:0 como patrón interno. La cuantificación mediante GC-FID se llevó a cabo tal y como dicta la norma EN-14103:2011 (a excepción del patrón interno).

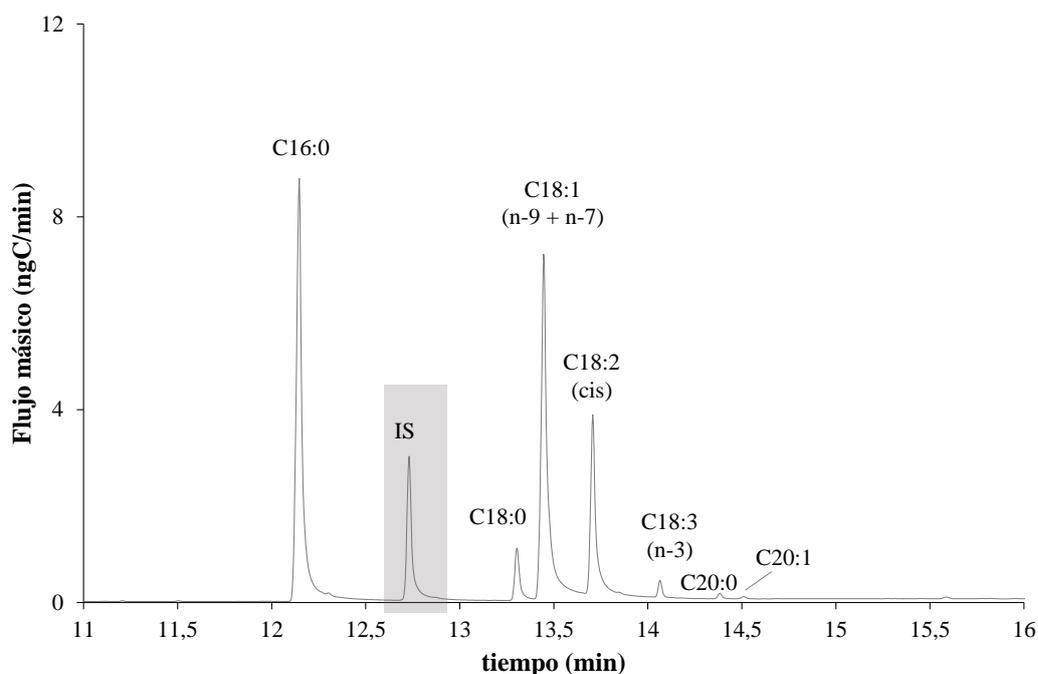


Figura 45. Perfil cromatográfico del biodiesel desconocido UME-es obtenido tras la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono en línea. El FAME C17:0 fue el patrón interno utilizado.

Los resultados presentados en la Tabla 22 se compararon estadísticamente por el test-t de Student. Para ello se enfrentaron gráficamente las concentraciones obtenidas para los FAMES mayoritarios de todas las muestras analizadas, tomando como referencia los resultados obtenidos mediante GC-FID. Como se puede observar en la Figura 46 existe una buena correlación entre las concentraciones obtenidas mediante Dilución Isotópica en línea de carbono y las obtenidas mediante GC-FID, empleando como patrón interno genérico el FAME C17:0. Los datos obtenidos tras la comparación estadísticas no exceden de los valores teóricos, indicando que no existen diferencias significativas entre los métodos comparados. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio mediante GC-IRMS indican que la metodología propuesta es una buena alternativa al método GC-FID de referencia empleado en la norma EN 14103.

Tabla 22. Concentración de los FAMES individuales, expresada en mg/g, de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparada con la obtenida mediante GC-FID.

FAME	GC-FID C17:0 IS	GC-C-MS C17:0 IS	GC-C-MS n-C17 IS
SME-mx			
Methyl palmitate (C16:0)	102,84 ± 0,24	107,7 ± 1,4	104,3 ± 0,7
Methyl stearate (C18:0)	39,02 ± 0,03	40,7 ± 0,2	43,2 ± 0,5
Methyl oleate (C18:1)	211,18 ± 0,76	209,8 ± 2,4	211,4 ± 1,3
Methyl linoleate (C18:2)	552,53 ± 3,21	540,8 ± 19,3	527,9 ± 1,1
Methyl linolenate (C18:3)	85,01 ± 0,47	85,4 ± 3,4	90,1 ± 2,5
SME-br			
Methyl palmitate (C16:0)	104,08 ± 0,07	107,0 ± 1,2	107,8 ± 1,4
Methyl stearate (C18:0)	29,68 ± 0,02	31,6 ± 0,6	35,6 ± 0,5
Methyl oleate (C18:1)	278,22 ± 1,10	279,0 ± 1,4	283,1 ± 1,1
Methyl linoleate (C18:2)	489,51 ± 3,27	500,7 ± 7,4	486,2 ± 2,5
Methyl linolenate (C18:3)	50,81 ± 0,20	57,9 ± 2,2	59,0 ± 2,5
RME-de			
Methyl palmitate (C16:0)	44,96 ± 0,04	51,7 ± 0,2	48,0 ± 0,2
Methyl stearate (C18:0)	16,78 ± 0,03	20,6 ± 0,4	23,1 ± 0,7
Methyl oleate (C18:1)	601,12 ± 1,31	602,8 ± 6,4	594,7 ± 7,8
Methyl linoleate (C18:2)	186,75 ± 0,45	205,3 ± 8,4	210,4 ± 2,4
Methyl linolenate (C18:3)	79,07 ± 0,20	87,4 ± 2,7	87,1 ± 1,6
CME-us			
Methyl palmitate (C16:0)	40,00 ± 0,04	45,6 ± 0,2	43,0 ± 0,3
Methyl stearate (C18:0)	19,03 ± 0,04	22,4 ± 0,3	25,0 ± 0,4
Methyl oleate (C18:1)	632,65 ± 0,98	639,4 ± 6,0	615,2 ± 2,7
Methyl linoleate (C18:2)	171,82 ± 1,11	202,5 ± 9,1	194,3 ± 2,0
Methyl linolenate (C18:3)	71,36 ± 0,17	83,2 ± 4,0	88,9 ± 1,3
UME-es			
Methyl palmitate (C16:0)	370,72 ± 0,34	376,4 ± 8,1	374,7 ± 2,0
Methyl stearate (C18:0)	40,89 ± 0,01	45,8 ± 0,6	47,2 ± 0,7
Methyl oleate (C18:1)	362,8 ± 0,33	362,6 ± 4,5	368,5 ± 5,9
Methyl linoleate (C18:2)	160,82 ± 0,17	217,2 ± 10,9	180,0 ± 3,3
Methyl linolenate (C18:3)	11,10 ± 0,03	25,5 ± 2,1	17,1 ± 0,5

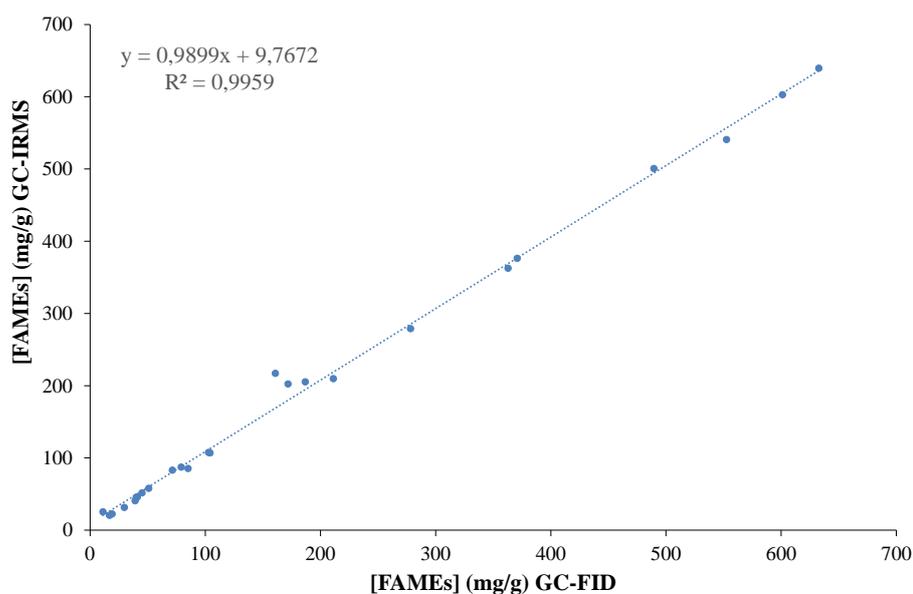


Figura 46. Comparación estadística del test-t de Student de la concentración de FAMES encontrada en las muestras reales de biodiesel. El método EN 14103 GC-FID fue considerado como referencia.

IV.3.1.2 Caracterización química: determinación del contenido total de ésteres y del éster metílico del ácido linolénico

La Norma 14214 recoge el contenido total de ésteres metílicos (>96,5%) y del éster metílico del ácido linolénico (<12%) como parámetros por los que se rige la calidad de un biodiesel. En la Tabla 23 se muestran los valores obtenidos para las cinco muestras analizadas, expresados como porcentaje en masa. Para la mayoría de las muestras, el procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono dio lugar a un mayor contenido de FAMES. Estos valores concuerdan con los obtenidos para el SRM 2772 B100 basado en soja cuando se tuvo en cuenta el contenido del FAME C17:0 presente en la muestra, por lo que se puede intuir que este FAME no se encuentra en las muestras reales de biodiesel analizadas como compuesto minoritario. Una excepción es el biodiesel basado en soja SME-mx. En este caso el contenido total de FAMES fue menor utilizando GC-IRMS que mediante GC-FID. Por lo tanto, cabe pensarse que la presencia del FAME C17:0 puede estar influenciando los resultados.

Tabla 23. Contenido total de los ésteres metílicos y del éster metílico de ácido linolénico, expresado en porcentaje en masa, de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica de carbono en línea (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparada con la obtenida mediante GC-FID.

Muestra	GC-FID C17:0 IS		GC-C-MS C17:0 IS		GC-C-MS n-C17 IS	
	Total	C18:3	Total	C18:3	Total	C18:3
	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)
SME-mx	99,1 ± 0,3	8,50 ± 0,05	98,4 ± 2,0	8,5 ± 0,3	97,7 ± 0,3	9,0 ± 0,3
SME-br	95,2 ± 0,3	0,51 ± 0,02	97,6 ± 0,8	5,8 ± 0,2	97,2 ± 0,4	5,9 ± 0,3
RME-de	92,9 ± 0,1	7,91 ± 0,02	96,8 ± 1,1	8,7 ± 0,3	96,3 ± 0,8	8,7 ± 0,2
CME-us	93,5 ± 0,1	7,14 ± 0,02	99,3 ± 1,2	8,3 ± 0,4	96,6 ± 0,4	8,9 ± 0,1
UME-es	94,6 ± 0,1	1,11 ± 0,01	102,7 ± 1,4	2,6 ± 0,2	98,7 ± 0,7	1,7 ± 0,1

Las diferentes concentraciones encontradas para los FAMES individuales de las muestras analizadas obtenidas a partir de las distintas metodologías de análisis empleadas para la cuantificación, pueden ser discriminatorios en la calidad del biodiesel. Los resultados obtenidos mediante GC-FID indican que tan sólo el biodiesel de soja SME-mx tendría un contenido en FAMES apropiado, ya que según la Norma 14212 el contenido total de FAMES debe ser superior al 96,5%. Por otro lado, el contenido total de ésteres obtenido mediante GC-IRMS, empleando tanto el C17:0 como el C17 como patrones internos, fue superior al fijado por la Norma, por lo que todos los biodiesel tendrían la calidad adecuada respecto a este parámetro. Todas las muestras mostraron un contenido en el éster metílico del ácido linolénico inferior al marcado por la Norma por cualquier metodología de análisis empleada.

IV.3.1.3 Caracterización “física” de un biodiesel a partir de la cuantificación de sus principales FAMES constituyentes

La determinación de los FAMES individuales de un biodiesel puede proporcionar información acerca de sus propiedades físico-químicas. Pequeños cambios en la composición de los principales FAMES constituyentes del biodiesel pueden

afectar de manera significativa a sus propiedades. Como ya se ha mencionado, existen ecuaciones matemáticas capaces de relacionar los principales parámetros que afectan a la calidad de un biodiesel con su composición en FAMES. Por lo tanto, es posible calcular algunos de los parámetros recogidos en la Norma EN 14214 a partir de la concentración de los FAMES individuales para las 4 muestras de biodiesel de origen vegetal proporcionadas por el proyecto JRP-ENG09 y para la muestra de biodiesel desconocida. Debido a las diferentes concentraciones encontradas tras la aplicación de las distintas metodologías analíticas, se calcularon los valores de los parámetros que afectan a la calidad de un biodiesel utilizando los datos proporcionados tanto por GC-FID como por GC-Combustión-IRMS y empleando los dos patrones genéricos escogidos para la cuantificación.

IV.3.1.3.1 Índice de iodo

El índice de iodo es uno de los parámetros presentes en la Norma EN 14214 por la que se rige la calidad del biodiesel, con un valor máximo de 120 g I/100 g muestra. La determinación de este parámetro se realiza a partir de una valoración redox. Sin embargo, también es posible su cálculo conociendo la concentración de los principales FAMES individuales presentes en el biodiesel (% m/m), el número de dobles enlaces y el peso molecular de cada FAME implicado (ecuación [41]). En la Tabla 24 se recogen los valores del índice de iodo encontrados a partir de la concentración de los FAMES mayoritarios del biodiesel dados en la Tabla 23.

Tabla 24. Índice de iodo de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenido mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparado con el obtenido mediante GC-FID.

Muestra	Índice de Iodo (g I/100g muestra)		
	GC-FID C17:0 IS	GC-C-MS C17:0 IS	GC-C-MS n-C17 IS
SME-mx	135,6	133,5	132,7
SME-br	121,5	125,4	123,5
RME-de	104,3	109,8	109,9
CME-us	102,4	111,4	109,4
UME-es	61,7	75,2	67,1

Los biodiesel basados en soja (SME-mx y SME-br) no cumplen con las especificaciones de la Norma 14214 para este parámetro. Sin embargo, el resto de las muestras están por debajo del límite marcado. Cabe destacar que el índice de iodo obtenido para la muestra de biodiesel desconocida es muy inferior al resto de muestras analizadas. Uno de los FAMES mayoritarios de este biodiesel es el FAME C16:0, por lo que es normal que el índice de iodo, relacionado con el número de insaturaciones de los FAMES mayoritarios, sea menor para esta muestra.

Los valores calculados para el índice de iodo presentan una variación significativa dependiendo de la metodología empleada para la determinación del contenido de los FAMES individuales del biodiesel. Para las muestras proporcionadas por el proyecto la diferencia máxima encontrada fue para el biodiesel basado en canola, llegando a obtener un error del 8,8% entre los datos obtenidos mediante GC-FID y GC-IRMS cuando se emplea el C17:0 como patrón interno. El error aumenta hasta un 22% para la muestra desconocida. Este error se debe principalmente a la diferencia de concentración encontrada para el FAME 18:2 mediante ambas metodologías. Sería necesario el empleo de la metodología recomendada por la Norma EN 14214 para poder discutir los resultados obtenidos.

IV.3.1.3.2 Número de cetanos

El número de cetanos es un parámetro sin unidades que está relacionado con el tiempo de ignición de un combustible en un motor diésel. Cuanto mayor sea el número de cetanos de un combustible menor será su tiempo de ignición, por lo que un combustible ideal será aquel que presente un alto número de cetanos. Este parámetro aumenta con el grado de saturación de los FAMES constituyentes de un biodiesel. Generalmente, el biodiesel alcanza el valor mínimo establecido en las especificaciones de la Norma EN 14214, la cual recomienda un número de cetanos superior a 51. Sin embargo, el biodiesel puro basado en soja no siempre cumple con las especificaciones.

En la Tabla 25 se muestra el número de cetanos calculado a partir de la concentración de los principales FAMES individuales de las cinco muestras de biodiesel analizadas (ecuación [42]). Los biodiesel basados en soja no cumplen con las especificaciones de la Norma EN 14214 para este parámetro. Sin embargo, el biodiesel basado en soja procedente de Brasil SME-br si llega al mínimo de 47

recomendado por la norma americana ASTM D6757. De nuevo, la variabilidad existente en las concentraciones calculadas a partir de las diferentes metodologías empleadas condiciona la calidad del biodiesel. Por ejemplo, el biodiesel basado en canola CME-us no llega al mínimo de 51 recomendado por la Norma EN 14214 cuando se emplea el procedimiento de la dilución isotópica de carbono en línea utilizando el FAME C17:0 como patrón interno, mientras que sí lo hace cuando se utiliza el patrón interno C17 o mediante GC-FID. Por lo tanto, sería recomendable utilizar un método de referencia estándar para el cálculo de este parámetro.

Tabla 25. Número de cetanos de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparados con los obtenidos mediante GC-FID.

Muestra	Número de Cetanos		
	GC-FID C17:0 IS	GC-C-MS C17:0 IS	GC-C-MS n-C17 IS
SME-mx	44,5	45,2	45,6
SME-br	48,9	47,3	47,8
RME-de	53,7	51,2	51,4
CME-us	54,0	50,1	51,4
UME-es	61,8	56,5	59,4

De todos los biodiesel analizados, la muestra desconocida es la que ofrece un mayor número de cetanos, por lo que sería la mejor elección como combustible para motores diésel.

IV.3.1.3.3 Viscosidad cinemática

El grado de viscosidad de un biodiesel aumenta con la longitud de la cadena y con el grado de saturación de los FAMES que lo constituyen. Por lo tanto, de nuevo es posible la determinación de este parámetro a través del perfil composicional del biodiesel (ecuación [43]). El rango especificado por la Norma 14214 para este parámetro es de 3,5-5 mm²/s. En la Tabla 26 se encuentran recogidos los valores calculados de la viscosidad cinemática para las cinco muestras de biodiesel analizadas, a partir de la concentración de los FAMES individuales constituyentes de cada biodiesel. Según la Norma europea ninguno de los biodiesel entraría

dentro de las especificaciones marcadas. Sin embargo, el rango para la viscosidad cinemática es mucho más amplio para la norma americana (1,9-6 mm²/s). En este caso, todos los biodiesel analizados cumplirían con la viscosidad deseada para su empleo en motores diésel.

Tabla 26. Viscosidad cinemática de las cinco muestras de biodiesel analizadas, obtenida por la cuantificación de los FAMES mayoritarios mediante Dilución Isotópica en línea de carbono (utilizando dos patrones internos diferentes) y comparados con los obtenidos mediante GC-FID.

Muestra	Viscosidad cinemática (mm ² /s)		
	GC-FID C17:0 IS	GC-C-MS C17:0 IS	GC-C-MS n-C17 IS
SME-mx	3,2	3,2	3,1
SME-br	3,1	3,2	3,2
RME-de	3,2	3,3	3,3
CME-us	3,2	3,3	3,3
UME-es	3,2	3,4	3,4

Las diferencias encontradas en la concentración de los FAMES individuales, dependiendo de la metodología empleada, no afectaron significativamente al valor de la viscosidad. Esto se debe a que este parámetro está más influenciado por la longitud de la cadena y por el número de insaturaciones de los FAMES individuales que por su concentración.

IV.3.2 DISCRIMINACIÓN DEL BIODIESEL POR SU ORIGEN (TAREA 3)

La combinación de los datos cuantitativos obtenidos para los principales FAMES del biodiesel con los datos proporcionados por el Análisis Isotópico Específico del Compuesto (CSIA) se puede convertir en una útil herramienta multidisciplinar para la discriminación del biodiesel por su origen. La realización del CSIA requiere el cálculo de deltas mediante GC-IRMS. Puesto que las modificaciones realizadas sobre este equipo para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono no evitan el uso del equipo para su verdadero fin, fue posible la

realización de esta tarea a través del cálculo de los deltas de carbono de los principales FAMES constituyentes del biodiesel empleando el mismo instrumento.

IV.3.2.1 El Análisis Cuantitativo como factor discriminante

Con el objetivo de corroborar los datos cuantitativos obtenidos de las diferentes muestras de biodiesel analizadas y proporcionar información adicional sobre el origen vegetal de la muestra de biodiesel desconocido recurrimos a la base de datos proporcionada por Hoekman y col. obtenida tras una extensa revisión bibliográfica en la caracterización de biodiesel. (ref)

Teniendo en cuenta que los FAMES C18:1 y C18:2 son los de mayor abundancia en la mayoría de los biodiesel estudiados, la relación existente entre ambos FAMES podría ser el primer paso para la discriminación del biodiesel por su origen vegetal. Para ello, se representó la concentración del FAME 18:1 frente a la del C18:2 haciendo uso de los datos bibliográficos para diferentes tipos de biodiesel: camelina, canola, maíz, jatropha, palma, colza, cártamo, soja y girasol. La Figura 47 recoge los datos obtenidos a partir de dicho enfrentamiento con su incertidumbre asociada. Además, también se añadieron los datos obtenidos para las muestras reales de biodiesel analizadas empleando los tres procedimientos de cuantificación. Los marcadores circulares representan los datos existentes en la literatura, y los marcadores romboides los obtenidos de las muestras reales de biodiesel analizadas.

Como se puede observar en la Figura 47 la relación existente entre los FAMES C18:1 y C18:2 diferencia todos los biodiesel representados, a excepción de los basados en colza y canola. El perfil composicional de ambos es muy similar para cualquiera de los FAMES mayoritarios, por lo que su diferenciación no fue posible. Además, los biodiesel basados en cártamo y girasol también mostraron un pequeño solapamiento. Por otro lado, los datos experimentales obtenidos para las muestras de biodiesel basados en soja, colza y canola estuvieron en concordancia con los datos recogidos en la literatura. Sin embargo, el biodiesel basado en soja SME-b no entra en la relación $[C18:1]/[C18:2]$ proporcionada por la literatura a pesar de su proximidad. La diversidad en el origen geográfico de las materias primas, los procesos de transesterificación, distribución y almacenaje del biodiesel, y las metodologías empleadas para la cuantificación pueden provocar

grandes cambios en el perfil composicional de un biodiesel. Por lo tanto, la desviación observada para el biodiesel basado en soja SME-b no se consideró significativa.

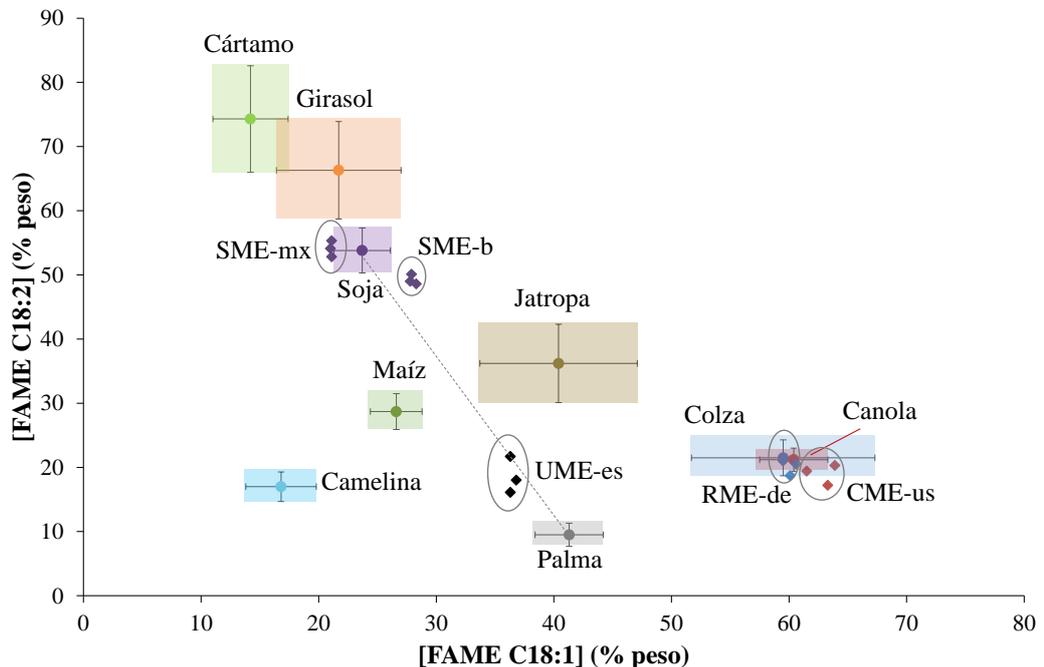


Figura 47. Representación gráfica de la correlación entre las concentraciones de los FAMES C18:1 y C18:2 como parámetro para la discriminación del biodiesel por su origen vegetal.

Por último, los datos obtenidos para la muestra desconocida no se pudieron asociar a ningún origen vegetal concreto. Por lo tanto, este biodiesel podría ser el resultado de la mezcla de dos biodiesel de diferente origen vegetal. Debido a su alto contenido en el FAME C16:0, uno de los biodiesel utilizados en la mezcla podría haber sido el biodiesel basado en palma, que se caracteriza por su alto contenido en este FAME (42,5%). Si se traza una línea recta entre los datos de correlación obtenidos para el biodiesel basado en palma y los obtenidos para el biodiesel desconocido, esta línea desemboca en los datos de correlación obtenidos para el biodiesel basado en soja. Evidentemente, la posición del biodiesel desconocido en la línea que une a cada uno de los dos biodiesel candidatos a estar formando parte de la mezcla, pudo proporcionar información sobre la cantidad

relativa de cada uno de los biodiesel en la muestra desconocida. La relación teórica obtenida fue de 80:20 para el biodiesel basado en palma y en soja, respectivamente. En la Figura 48 se muestra el perfil de los FAMES mayoritarios del biodiesel desconocido (mg/g) comparado con el perfil virtual de un biodiesel obtenido a partir de la mezcla de un biodiesel basado en palma y en soja en una proporción 80:20. Tal y como se puede observar, los datos están en perfecta concordancia, lo que parece corroborar la suposición. Sin embargo, no se pueden descartar otras posibles mezclas, o la simple adición del FAME 16:0 para mejorar la capacidad oxidativa del biodiesel.

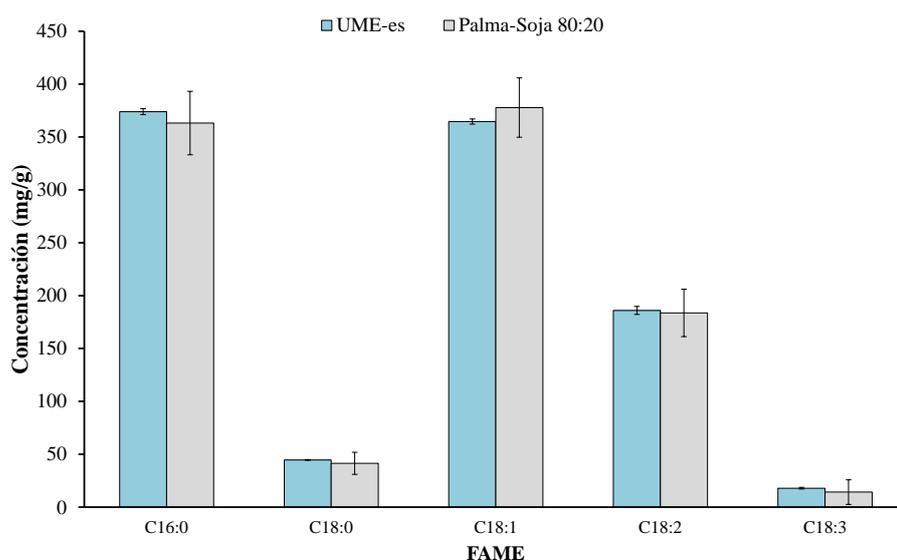


Figura 48. Comparación de la concentración de los FAMES mayoritarios del biodiesel desconocido UME-es con los de un biodiesel virtual formado a partir de la mezcla de un biodiesel basado en palma y soja en una proporción 80:20.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una herramienta estadística muy empleada en la discriminación de las diferentes muestras analizadas a partir de una serie de variables estudiadas. Esta herramienta permite agrupar las diferentes variables cuantitativas numéricas de un estudio en grupos de variables, de manera que cada agrupación contiene variables correlacionadas entre sí y cada uno de dichos grupos es entre sí independiente, es decir, aporta diferente tipo de

información. A cada grupo de variables se le denomina componente o factor principal.

Para realizar el análisis de componentes principales se tomaron cinco variables. Estas variables se correspondieron con la concentración de los FAMES individuales de las cinco muestras analizadas mediante los tres procedimientos de cuantificación, junto con los datos proporcionados por la literatura. El tratamiento estadístico de los datos permitió agrupar las cinco variables en dos componentes principales que recogieron el 75% de la información proporcionada por las cinco variables objeto de estudio. La concentración de los FAMES C18:0, C18:1 y C18:3 se asignó al componente principal 1, mientras que la concentración de los FAMES C16:0 y C18:2 se asignó al componente principal 2. En la Figura 49 se muestra la representación gráfica obtenida. De nuevo, los marcadores circulares representan los datos recogidos en la literatura para los biodiesel de diferente origen vegetal, mientras que los marcadores romboides se corresponden con los obtenidos de las muestras reales de biodiesel analizadas en este estudio.

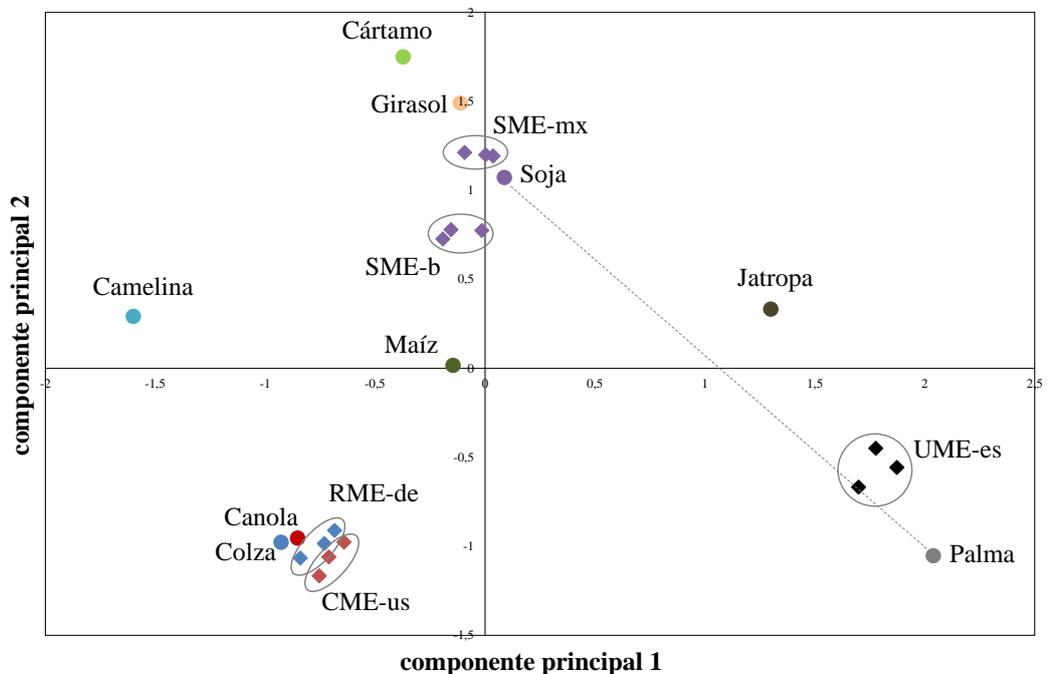


Figura 49. Análisis de componentes principales realizado a partir de la concentración de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen

vegetal y geográfico. Los marcadores circulares representan los datos recogidos en la literatura y los marcadores romboides las muestras analizadas en este estudio.

La estadística aplicada al análisis de componentes principales no permitió extraer información adicional acerca del origen biológico o geográfico de las diferentes muestras estudiadas, más allá de la proporcionada por el análisis de regresión lineal realizado para la concentración de los FAMES 18:1 y C18:2. La similitud del perfil composicional de los biodiesel basados en colza y canola sigue sin permitir su discriminación. Por otro lado, los datos experimentales obtenidos para las muestras de biodiesel basados en soja permiten la discriminación por su origen geográfico, aunque sería necesario una mayor cantidad de datos para poder confirmar esta diferenciación. Por último, la muestra de biodiesel desconocida sigue mostrando el mismo comportamiento, sin poder asociarla a ningún origen vegetal concreto. Además, la composición de este biodiesel de nuevo vuelve a encontrarse entre la composición del biodiesel basado en palma y el basado en soja, aunque otras combinaciones también serían posibles.

IV.3.2.2 Análisis Isotópico Específico del Compuesto como factor discriminante

En este estudio nos centraremos en la determinación de los deltas de carbono de los principales FAMES del biodiesel para las cuatro muestras proporcionadas por el proyecto JRP-EN09 y para la muestra desconocida de biodiesel. El equipo GC-IRMS vino configurado de fábrica tan sólo para la medida de las relaciones isotópicas de carbono, por lo que la determinación de los deltas de hidrógeno y oxígeno, elementos también presentes en los FAMES, no fue posible a pesar de que proporcionarían información adicional y posiblemente discriminatoria.

El primer paso para llevar a cabo el análisis isotópico específico del compuesto fue desconectar la entrada del flujo del trazador isotópico del sistema, conectado a través del soporte para la división de flujos localizado en el interior del horno cromatográfico (ver Figura 17). Una vez desconectado se cambió la configuración de trabajo. En este caso, la amplificación para m/z 45 debe ser 100 veces mayor que para m/z 44 debido a la relación de las abundancias naturales del carbono. Sorprendentemente, tan sólo fue necesaria una hora de purga para eliminar completamente la señal para m/z 45 procedente del trazador isotópico $^{13}\text{CO}_2$.

En este estudio se empleó un estándar de referencia formado por una mezcla de los n-alcenos C11, C15 y C20 certificados en delta de carbono y adicionados a la muestra antes del análisis cromatográfico. El estándar de referencia se adicionó a las muestras en una concentración adecuada para obtener una señal similar a la de los analitos. Además, se introdujeron pulsos de CO₂ a lo largo del análisis cromatográfico para comprobar la variación del delta durante el análisis. En la Figura 50 se muestra un cromatograma modelo para la determinación de deltas de carbono empleando la estrategia propuesta en este estudio. El perfil cromatográfico de FAMEs se corresponde con la muestra de biodiesel basado en soja SME-mx. Es necesario comentar que el programa cromatográfico fue ligeramente modificado debido a la introducción de los pulsos de CO₂ a lo largo del análisis. El tiempo isotérmico inicial del horno fue de tres minutos en lugar de uno. La dilución de la muestra en n-hexano fue de 1:1700 y la concentración del patrón de referencia fue de 15 µg/mL.

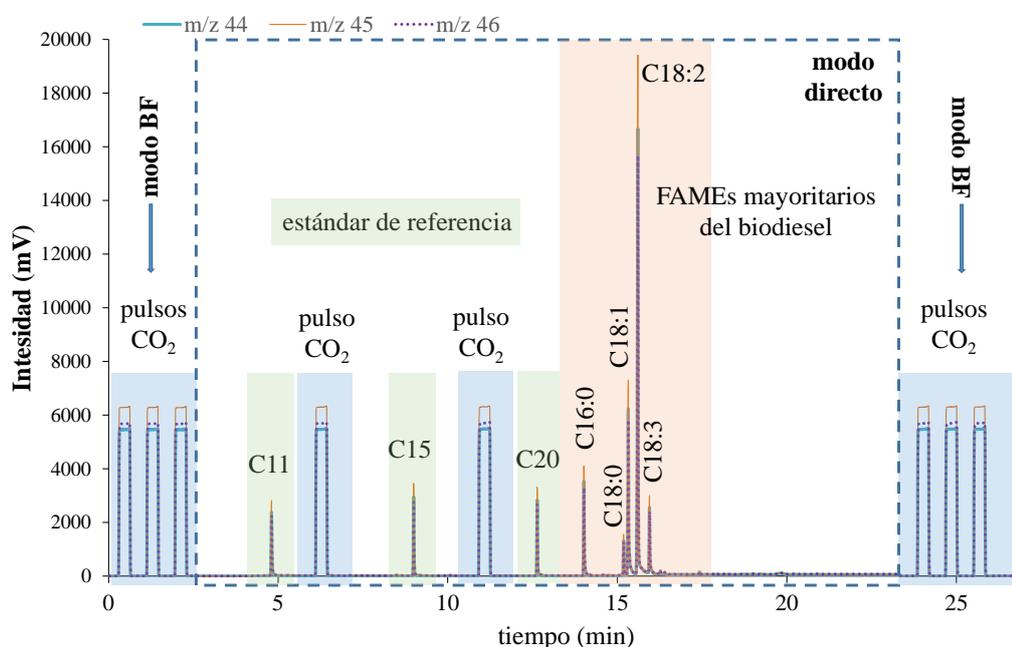


Figura 50. Cromatograma modelo obtenido mediante GC-IRMS para el cálculo de $\delta^{13}\text{C}$ de los FAMEs mayoritarios del biodiesel basado en soja SME-mx.

En el cromatograma de la Figura 50 se puede observar cómo la intensidad de la señal para las tres masas medidas (44, 45 y 46), necesarias para el cálculo de deltas de carbono, es prácticamente la misma debido a la configuración de copas utilizada. Al igual que en la estrategia seguida para la cuantificación mediante IDMS en línea de carbono se trabajó en modo backflush durante los primeros y últimos minutos del análisis para evitar la entrada del disolvente y de los compuestos eluidos durante el sangrado de la columna en el reactor de combustión. Los compuestos presentes en el estándar de referencia eluyen próximos a los FAMES mayoritarios del biodiesel. Además, su elución tiene lugar en una zona limpia del cromatograma por lo que no se produce ningún tipo de interferencia cromatográfica que podría dar lugar a valores de delta erróneos. También se pueden observar los pulsos de CO₂ introducidos a lo largo del análisis. Tres pulsos fueron introducidos al comienzo y al final del análisis durante el modo de trabajo backflush, y dos durante el modo de trabajo directo con la intención de observar posibles variaciones durante los diferentes modos de trabajo utilizados.

IV.3.2.2.1 Elección del estándar de referencia para el cálculo de $\delta^{13}\text{C}$

Como ya se ha mencionado, el estándar de referencia contiene tres n-alcanos certificados en $\delta^{13}\text{C}$. Uno de ellos actuará como verdadero referente para el cálculo de deltas, mientras que los otros dos se emplearán para confirmar la ausencia de discriminación de los diferentes compuestos durante el análisis y la idoneidad de los parámetros del procesador de datos para el cálculo del delta. Así, cuando se introduce en el software el valor del delta para el compuesto elegido como referencia, el valor calculado por el equipo para los otros dos compuestos debe estar en perfecta concordancia con el valor certificado. En la Tabla 27 están recogidos los valores de delta calculados para los n-alcanos presentes en el estándar de referencia y para los pulsos de CO₂ cuando cada uno de los compuestos certificados en delta fue escogido como referencia.

La desviación estándar obtenida está dentro de los valores normales para el $\delta^{13}\text{C}$ de $\pm 0,5\%$ cuando el cálculo del delta se realiza en estándares. La desviación estándar en muestras reales puede aumentar hasta un $\pm 1,5\%$. El error cometido en los valores de delta calculados fue menor del 1,4% en todos los casos. Este error da lugar a una incertidumbre menor de 0,5% en el valor del delta por lo que

cualquiera de los compuestos puede ser utilizado como referencia. Además, el delta de carbono para los pulsos de CO₂ fue estable a lo largo de todo el análisis, lo que confirma la idoneidad de la metodología para la determinación de deltas. El estándar utilizado como referencia fue el n-alcano C15 y su elección se realizó de manera arbitraria.

Tabla 27. $\delta^{13}\text{C}$ calculado para el estándar de referencia (C11, C15, y C20) y para los pulsos de CO₂ tomando cada uno de los compuestos certificados como referencia. La incertidumbre asociada se da como la desviación estándar para $n=10$.

Referencia	$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$			
	C11	C15	C20	pulso CO ₂
C11	*-26,11	-29,84 ± 0,31	-32,84 ± 0,20	-40,22 ± 0,17
C15	-26,49 ± 0,31	*-30,22	-33,21 ± 0,20	-40,60 ± 0,35
C20	-26,29 ± 0,20	-30,02 ± 0,26	*-33,06	-40,40 ± 0,24

*Valor de delta certificado

IV.3.2.2.2 Determinación del $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES en muestras reales de biodiesel

En la Tabla 28 se muestran los resultados de los $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos para los principales FAMES de las cinco muestras de biodiesel analizadas.

Tabla 28. $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES de las muestras de biodiesel de origen vegetal, calculados mediante GC-IRMS. La incertidumbre asociada se corresponde con la desviación estándar para $n=5$.

FAME	$\delta^{13}\text{C}$				
	SME-mx	SME-br	RME-de	CME-us	UME-es
C16:0	-31,55 ± 0,03	-31,09 ± 0,08	-30,56 ± 0,13	-30,72 ± 0,08	-32,39 ± 0,72
C18:0	-31,99 ± 0,11	-31,66 ± 0,16	-30,99 ± 0,12	-31,24 ± 0,47	-33,67 ± 0,39
C18:1	-30,56 ± 0,09	-30,45 ± 0,16	-30,09 ± 0,10	-30,44 ± 0,27	-30,92 ± 0,56
C18:2	-31,20 ± 0,18	-30,79 ± 0,05	-29,97 ± 0,25	-28,47 ± 0,99	-30,07 ± 0,40
C18:3	-30,70 ± 0,48	-31,36 ± 0,43	-30,69 ± 0,36	-29,31 ± 0,96	-28,18 ± 2,21

Ninguno de los valores obtenidos supera la incertidumbre máxima de 1,5‰ en muestras reales. Los valores de delta encontrados, por sí solos, no permiten una diferenciación clara de los biodiesel analizados debido a la proximidad en los valores encontrados. Sin embargo, fue posible la construcción de la huella dactilar de cada una de las muestras de biodiesel a partir de los deltas calculados para cada FAME individual de la muestra. Estos valores de delta se normalizaron respecto al $\delta^{13}\text{C}$ del FAME 18:1 para reducir posibles efectos de discriminación relacionados con el clima, la distribución o el almacenamiento. En la Figura 51 se muestran las huellas dactilares obtenidas para las distintas muestras de biodiesel analizadas. A pesar de obtener una huella dactilar representativa para cada biodiesel basado en un origen vegetal y geográfico determinado, la incertidumbre asociada a cada valor del delta de carbono normalizado no permite una discriminación clara entre las diferentes muestras.

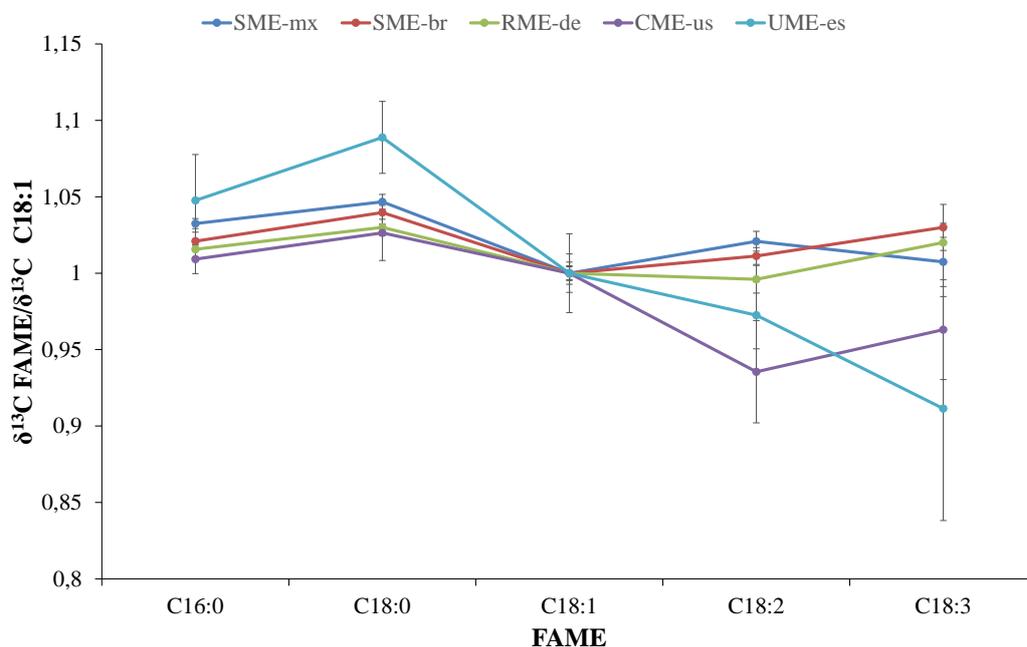


Figura 51. Huella dactilar de $\delta^{13}\text{C}$ para las cinco muestras de biodiesel analizadas. El $\delta^{13}\text{C}$ del FAME C18:1 fue utilizado como estándar interno de referencia.

A través del análisis de componentes principales se logró una mayor discriminación de las muestras por su origen vegetal y geográfico a través de los deltas de carbono calculados para cada FAME individual de las muestras de biodiesel. La representación gráfica del ACP se muestra en la Figura 52. Las variables objeto de estudio se pudieron clasificar en dos componentes principales que recogen el 98% de la información proporcionada por todo el conjunto de datos. Los deltas de carbono de los FAMES C16:0, C18:0, C18:1 y C18:3 se asignaron al componente principal 1, mientras que el deltas de carbono del FAME C18:2 se asignó al componente principal 2. En la Figura 52 se puede observar la discriminación tanto por el origen vegetal como geográfico de los diferentes biodiesel. Sin embargo, es necesario el análisis de una mayor cantidad de muestras de diferente naturaleza y origen para crear una base de datos que permita su diferenciación.

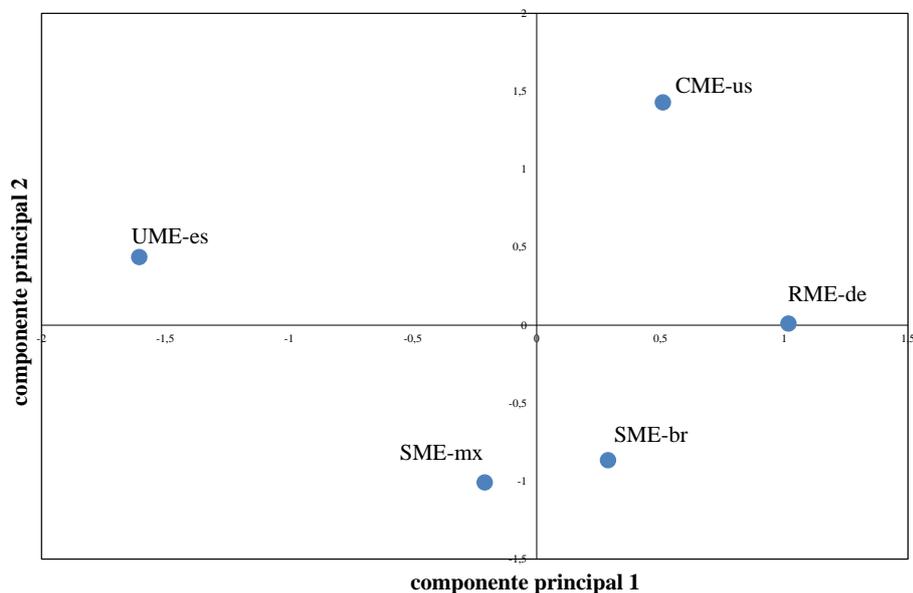


Figura 52. Análisis de componentes principales realizado a partir de los $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen vegetal y geográfico.

IV.3.2.3 Combinación de la IDMS en línea de carbono con CSIA para la discriminación del biodiesel por su origen

Con el objetivo de obtener una mayor discriminación del biodiesel por su origen se realizó un análisis de componentes principales tomando como variables tanto las concentraciones obtenidas de los 5 FAMES mayoritarios del biodiesel como el valor del $\delta^{13}\text{C}$ para las cinco muestras analizadas. En esta ocasión sólo se tuvieron en cuenta los datos cuantitativos obtenidos mediante GC-IRMS empleando el FAME C17:0 como patrón interno, como metodología de referencia.

El ACP permitió agrupar las diez variables estudiadas en dos componentes principales que recogieron el 94% de la información proporcionada por el conjunto de variables evaluadas.

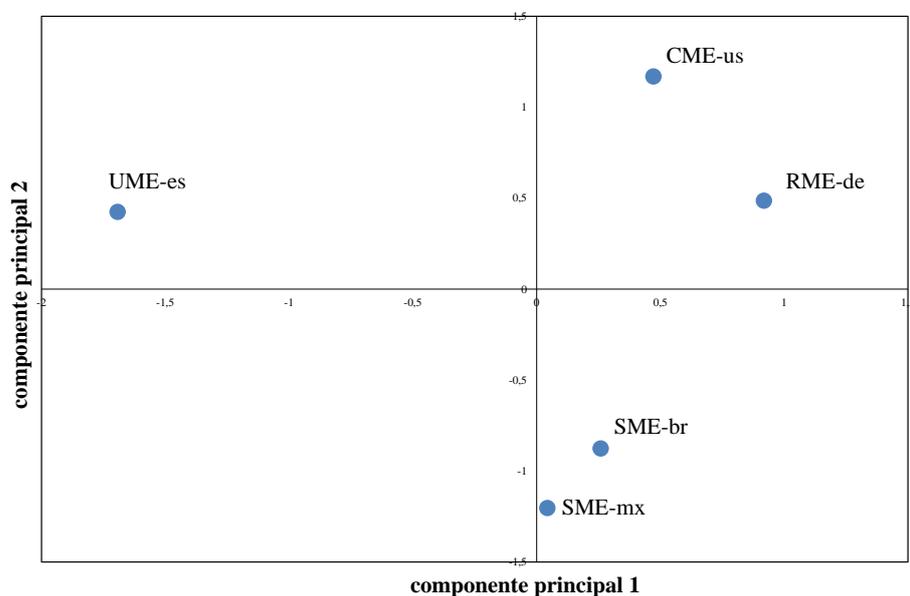


Figura 53. Análisis de componentes principales realizado a partir de la concentración y los $\delta^{13}\text{C}$ de los principales FAMES individuales del biodiesel en diferentes muestras de origen vegetal y geográfico.

Las variables agrupadas en el componente principal 1 fueron la concentración de los FAMES C16:0, C18:0 y C18:3, y el delta de carbono de los FAMES C16:0,

C18:0 y C18:1, y las agrupadas en el componente principal 2, la concentración de los FAMES C18:1 y C18:2, y el delta de los FAMES C18:2 y C18:3. La Figura 53 muestra la discriminación obtenida cuando se emplea esta herramienta estadística. La discriminación proporcionada es muy similar a la obtenida cuando sólo se tienen en cuenta los deltas de carbono como variables cuantitativas numéricas. Por lo tanto, parece que la gran influencia de los deltas de carbono para la diferenciación del biodiesel por su origen minimiza el poder de discriminación de la concentración de los FAMES individuales. Evidentemente, este tipo de estudios requeriría una mucha mayor población para obtener resultados más sólidos.

Resultados y discusión

V Conclusiones

Como conclusión general del trabajo desarrollado en la Presente Tesis Doctoral se puede decir que la Dilución Isotópica en línea de carbono representa el primer sistema de detección verdaderamente genérico y universal de compuestos orgánicos para cromatografía de gases, tan añorado y buscado en la Química Analítica.

A continuación se resumen las principales conclusiones concretas que se derivan del trabajo realizado:

1. Por primera vez, la Dilución Isotópica en línea de carbono en combinación con un equipo modificado GC-IRMS e inyección PTV ha demostrado proporcionar una cuantificación exacta y precisa de cualquier compuesto orgánico, independientemente de su punto de ebullición, estructura y presencia de heteroátomos, sin la necesidad de estándares específicos o estrategias de calibración. Por lo tanto, se puede considerar un detector independiente del compuesto verdaderamente universal, donde la señal depende exclusivamente del número de átomos de carbono del compuesto. Este hecho abre las puertas a su aplicación en diferentes campos tales como la determinación de la pureza de estándares orgánicos sin la necesidad de patrones específicos de calibración, y el control de calidad de productos petroquímicos donde un gran número de compuestos puede ser cuantificado con un solo patrón genérico.

2. La búsqueda de la instrumentación adecuada para extender la metodología a un mayor número de compuestos orgánicos permitió comparar las características analíticas del prototipo inicialmente desarrollado con las ofrecidas por los equipos GC-IRMS empleados para las medidas de alta precisión de las variaciones isotópicas naturales de los isótopos estables de los elementos ligeros. Se observó que en comparación con el prototipo instrumental GC-combustión-(Q)-MS, el nuevo sistema proporcionó una resolución cromatográfica y límites de detección ligeramente peores. Sin embargo, el uso de un analizador de masas de sector magnético de tipo multicolector proporcionó una precisión en la relación isotópica de un orden de magnitud menor, a expensas de sacrificar la capacidad de caracterización de un cuadrupolo convencional trabajando en modo full scan. Por supuesto, los instrumentos GC-IRMS pueden ofertar la posibilidad de trabajar con un segundo detector de MS para fines tanto cuantitativos como de identificación, pero esto lleva asociado un coste adicional elevado en la instrumentación.

3. El desarrollo de una instrumentación que se adecúe a las necesidades del procedimiento de la Dilución Isotópica en línea de carbono, proporcionando un menor ensanchamiento de los picos cromatográficos, y una mayor transmisión de la corriente iónica, con el fin de aumentar la sensibilidad instrumental sin perder la capacidad de elucidación estructural para poder asegurar así la pureza de pico cromatográfico, aumentaría sin duda el campo de aplicación de la metodología. Así como los avances en la instrumentación GC-IRMS dieron lugar a una mayor aplicación de la técnica por el gran interés de los resultados que proporcionaba, dejando así de ser una técnica muy restringida para convertirse en una técnica más universal, la posibilidad de obtener un equipo que proporcione las mejores características analíticas para la aplicación de la Dilución Isotópica en línea de carbono sería, sin duda, un gran avance para la extensión de la metodología tanto en análisis de rutina como en laboratorios de investigación.

4. La Dilución Isotópica en línea de carbono ha demostrado poseer un carácter verdaderamente genérico y universal en comparación con el detector más universal y establecido en GC, el detector de ionización de llama (FID). Ha resultado ser una alternativa al método de referencia establecido (norma EN14103) para la determinación del contenido de los ésteres metílicos de ácidos grasos en biodiesel, proporcionando la cuantificación absoluta de los FAMES saturados e insaturados en un amplio rango de puntos de ebullición y números de átomos de carbono.

5. Además, el procedimiento propuesto no muestra limitaciones en la selección del patrón interno como sí lo hace el detector FID cuando la corrección del número de carbonos efectivo (ECN) no es aplicada, ya que su respuesta no es totalmente independiente de la estructura del compuesto. Aun así, dicha corrección ECN es limitada y además no proporciona la exactitud que se alcanza con la IDMS en línea de carbono debido principalmente debido a la discriminación de los FAMES de alto peso molecular en el inyector split/splitless que es necesaria tener en cuenta ya que no se produce la compensación de una mayor respuesta con el mayor número de carbonos. El inyector PTV es una buena alternativa ya que muestra una discriminación mínima entre los diferentes compuestos y ha mostrado ser ideal para la aplicación del método GC-Combustión-MS.

6. Otra ventaja de la metodología propuesta respecto al detector FID es que cualquier posible fuente de inestabilidad en la señal analítica debida a la deriva instrumental o efectos de matriz, se corrige en tiempo real por el trazador, por lo que se obtienen resultados de mayor calidad analítica en cuanto a exactitud y precisión. Sin embargo, al igual que con el detector FID, es necesaria una resolución cromatográfica completa entre todos los compuestos analizados. Así, este método sería de difícil aplicación en muestras muy complejas como las medioambientales, clínicas o alimentarias. En estos casos, el desarrollo de nuevas columnas cromatográficas que ofrezcan la resolución adecuada, el empleo de estrategias de cromatografía bidimensional (GC x GC, LC x GC), y el desarrollo de detectores que permitan tanto una detección como un registro rápido de la señal, serían algunos puntos clave para el desarrollo de la metodología en este tipo de aplicaciones.

7. Por último, las modificaciones instrumentales realizadas sobre la instrumentación GC-IRMS para la aplicación de la IDMS en línea de carbono no repercuten en el funcionamiento del equipo para realizar el análisis isotópico específico del compuesto (CSIA), característico de esta instrumentación. Se demostró que la eliminación del fondo para la señal m/z 45 procedente del trazador isotópico $^{13}\text{CO}_2$ se puede realizar muy fácilmente (tan sólo una hora fue necesaria). Por ello fue posible determinar las pequeñas variaciones en las abundancias isotópicas naturales de los FAMES de un biodiesel a través del cálculo de los deltas de carbono con la exactitud y precisión adecuadas. Dicha información, junto con el perfil cuantitativo exacto y preciso de los FAMES presentes en el biodiesel obtenido por la Dilución Isotópica en línea de C, parece poseer un gran potencial para estudios de discriminación por el origen y de fraude en muestras de biodiesel.

VI Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

VI.1 . Publicación científica 1

Modification of a comercial gas chromatography isotope ratio mass spectrometer for on-line carbon isotope dilution: Evaluation of its analytical characteristics for the quantification of organic compounds

Journal of Chromatography A, 1419 (2015) 99-108

Laura Alonso Sobrado, Mario Robledo Fernández, Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, J. Ignacio García Alonso

VI.2 Publicación científica 2

Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards

Journal of Chromatography A,

Accepted manuscript, doi:10.1016/j.chroma.2016.06.033

Laura Alonso Sobrado, Laura Freije-Carrello, Mariella Moldovan, Jorge Ruiz Encinar, J. Ignacio García Alonso



Modification of a commercial gas chromatography isotope ratio mass spectrometer for on-line carbon isotope dilution: Evaluation of its analytical characteristics for the quantification of organic compounds



Laura Alonso Sobrado, Mario Robledo Fernández, Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar*, J. Ignacio García Alonso*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2015

Received in revised form

16 September 2015

Accepted 21 September 2015

Available online 26 September 2015

Keywords:

Gas chromatography

Combustion

Mass spectrometry

On-line isotope dilution

Compound-independent calibration

ABSTRACT

We describe the instrumental modification of a commercial gas chromatography isotope ratio mass spectrometer (GC–IRMS) and its application for on-line carbon isotope dilution. The main modification consisted in the addition of a constant flow of enriched ^{13}C diluted in helium after the chromatographic column through the splitter holder located inside the chromatographic oven of the instrument. In addition, and in contrast to the conventional mode of operation of GC–IRMS instruments where the signal at m/z 45 is amplified 100-fold with respect to the signal at m/z 44, the same signal amplification was used in both Faraday cups at m/z 44 and 45. Under these conditions isotope ratio precision for the ratio 44/45 was around 0.05% RSD ($n = 50$). The evaluation of the instrument was performed with mixtures of organic compounds including 11 *n*-alkanes, 16 PAHs, 12 PCBs and 3 benzothiophenes. It was observed that compounds of very different boiling points could be analysed without discrimination in the injector when a Programmable Temperature Vaporizer (PTV) injector was employed. Moreover, the presence of heteroatoms (Cl or S) in the structure of the organic compounds did not affect their combustion efficiency and therefore the trueness of the results. Quantitative results obtained for all the analytes assayed were excellent in terms of precision (<3% RSD) and accuracy (average relative error \leq 4%) and what is more important using a single and simple generic internal standard for quantification.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

GC–MS and GC–MS/MS with electron ionization (EI) have become one of the most widely used techniques in laboratories all over the world for the quantification of volatile or semivolatile compound (directly or after chemical derivatization) in a wide variety of samples. Of course, as EI is a molecular-ion source, its response is molecule-specific for each single molecule to be analysed [1]. Therefore, traceable analytical standards for every analyte are needed to carry out external calibrations or standard additions when quantification is sought [2]. Additionally, and for more than sixty years now, analytical procedures for the determination of organic compounds by mass spectrometry have made also use of isotopically labelled compounds (deuterated or ^{13}C -labelled internal standards) for accurate quantification, based on the isotope

dilution (ID) concept [3,4]. This method relies on the fact that the instrumental response is identical for both, the natural abundance and the isotopically labelled compound and that the recoveries for non-chromatographic separation procedures are also identical. Therefore it can provide excellent sensitivity, accuracy and precision. Unfortunately, a limited number of isotopically labelled internal standards are commercially available.

In the search for quantitative estimation of various compounds lacking standards or surrogates using GC–MS, predictive equations have been derived for many Volatile Organic Compounds (VOCs) from the linear regression analysis between their actual response factors and their physicochemical parameters, mostly the number of carbons [5]. The use of such predictive statistical approaches has been further refined using the effective carbon number, which takes into account the functional groups present [6,7], providing adequate levels of reliability for some limited mixtures of compounds (10–17% percentage difference between predicted and actual values). Of course, the nature and number of these functional groups and the number of carbons present determine such deviation, which can increase up to 20–30% in more complex mixtures.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: ruizjorge@uniovi.es (J. Ruiz Encinar), jiga@uniovi.es (J.I. García Alonso).

The on-line carbon isotope dilution concept, introduced in 2009 [8], opened the door to the generic quantification of any organic compound present in a sample without resorting to specific standards. A constant flow of a non-specific isotopic tracer (i.e. $^{13}\text{CO}_2$) was added continuously to the sample after the chromatographic separation. Isotopic equilibration was obtained using a combustion furnace located after the GC column which converted all compounds into CO_2 . The continuous measurement of the isotope ratio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (obtained by measuring the signals at m/z 44 and 45 corresponding to $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$, respectively) in a quadrupole mass spectrometer after electron ionization was the basis of the on-line carbon IDMS procedure developed [8]. Later, the same authors applied this concept to the evaluation of Solid Phase Micro Extraction (SPME) procedures as the absolute amount of an organic compound fixed to the SPME fibre could be evaluated accurately by this method [9]. However, there is one important limitation to this on-line carbon IDMS procedure: any loss of substance occurring before isotopic equilibration could lead to biased results. Isotopic equilibration occurs here after the combustion furnace where all organic compounds are converted into carbon dioxide. So, losses of substance before or at the combustion oven will be problematic. When working with GC, recoveries from the column are typically quantitative [2], however fractionation effects during injection are likely to occur in standard GC injectors if mixtures of compounds with very different boiling points are analysed [10]. Moreover, the presence of heteroatoms in the structure of the organic compounds could negatively affect their combustion efficiency and therefore the trueness of the results [11]. Obviously, losses occurring before the injection in the gas chromatograph will not be corrected for unless a suitable internal standard is employed.

On the other hand, natural variations in carbon isotope compositions of volatile compounds are measured routinely with GC-combustion-IRMS instruments [12] in which a combustion oven is employed to transform all organic compounds into carbon dioxide. Modern GC-IRMS instruments, such as the Delta V Advantage from Thermo Scientific, employ a $\text{CuO}/\text{NiO}/\text{Pt}$ tube at ca. 1000°C for combustion. Additionally, a Nafion membrane tube is employed to eliminate water vapour from the combustion gases reducing potential isobaric interferences at m/z 45 from proton transfer reactions. These instruments are ideal to evaluate the ultimate potential of the on-line carbon isotope dilution procedure as, in contrast to previous home-made instruments [8,9], they provide highly precise isotope ratios and have been optimized for the elimination of potential interferences.

Therefore, in the present study a commercial GC-IRMS instrument has been modified for the first time to evaluate its applicability for on-line carbon isotope dilution. In addition, the use of a Programmed Temperature Vaporizer (PTV) has demonstrated to be ideal to prevent fractionation in the GC injector and thus any loss of compounds before isotopic equilibration with the non-specific isotopic tracer ($^{13}\text{CO}_2$) had taken place. In this way, the concept of on-line carbon isotope dilution could be extended to mixtures of compounds with very different boiling points (*n*-alkanes and PAHs) and heteroatom-containing organic compounds (PCBs and benzothiophenes). The analytical characteristics of the proposed compound-independent quantification procedure are described.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Solid enriched NaHCO_3 (99% ^{13}C enrichment) was purchased as a high purity chemical reagent (purity > 98%) from Cambridge Isotopes Laboratories (Andover, Massachusetts, USA). Phosphoric

acid (99% puriss.), *n*-hexane and dichloromethane for organic trace analysis grade, benzo(b)fluorene (BbF, 99.4% puriss.) and 3-methylbenzothiophene (3-Me-BT, certified purity 96%) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). QTM PAHs Mix ($2000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ each in dichloromethane) and CEN PCBs Mix ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ each in *n*-heptane) were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). QTM PAHs Mix contains: acenaphthene (Ac), acenaphthylene (Ap), anthracene (A), benzo(a)anthracene (BaA), benzo(a)pyrene (BaP), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(g,h,i)perylene (BgHiP), chrysene (Ch), dibenz(a,h)anthracene (DBaA), fluoranthene (Fl), fluorene (F), indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP), naphthalene (Na), phenanthrene (Pa), pyrene (P) and 2-bromonaphthalene (BrNa). CEN PCBs Mixture is made up of 12 congeners: 194, 180, 138, 149, 44, 153, 101, 18, 52, 118, 28 and 31. A standard mixture of *n*-alkanes ($\text{C}_8\text{--C}_{20}$, $40\ \mu\text{g mL}^{-1}$ each in *n*-hexane) and pure standards of octadecane and pentadecane (purity $\geq 99.8\%$), were purchased from Fluka (Seelze, Germany). The compounds 1-benzothiophene (BT, 97% certified purity) and dibenzothiophene (DBT, 98% certified purity) were obtained from Acros (Springfield, NJ, USA). Chemical structure and abbreviations of the PAHs, PCBs and thiophenes used are given in [supplementary Tables S1–S3](#).

All working standard solutions were prepared by dilution in *n*-hexane. Thiophenes, octadecane and pentadecane were dissolved in *n*-hexane and were diluted in the same solvent. A stock solution of benzo(b)fluorene ($2000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in dichloromethane. All solutions were stored in capped amber vials at 4°C .

2.2. Instrumentation

2.2.1. GC-combustion-IRMS instrument

Gas chromatography was performed with a Thermo (Bremen, Germany) Trace GC Ultra chromatograph equipped with a GC Triplus Autosampler, PTV and split/splitless injectors, a GC-Isolink interface and a ConFlo IV universal interface coupled to a Delta V Advantage sector field mass-spectrometer. The energy applied at the EI source was 124 eV. Isodat 2.0 was used as data processor.

The GC-IRMS instrument was modified by adding a flow of $^{13}\text{CO}_2$ diluted in He after the chromatographic separation through a splitter holder located inside the chromatographic oven. The post-column spike was stored in a 5 L stainless-steel container (Iberfluid Instruments, Barcelona, Spain) pressurized at 5 bar. The container was equipped with a mass flow controller (Bronkhorst High-Tech, Ruurlo, Netherlands) for precise supply of the post-column flow tracer ($0.5\ \text{mL } ^{13}\text{CO}_2\ \text{min}^{-1}$). Fig. 1 shows the scheme of the set-up. Organic compounds are separated by GC and then continuously mixed with the $^{13}\text{CO}_2$ flow. The mixture passes through a combustion reactor at 1000°C where it is transformed into CO_2 and H_2O . Then, a Nafion semi-permeable membrane removes water and avoids formation of $^{12}\text{CO}_2\ \text{H}^+$ in the ion source that may interfere with the signal of $^{13}\text{CO}_2$. A second modification was the use of a $3 \times 10^8\ \Omega$ resistor for amplification at mass 45 instead of the usual $3 \times 10^{10}\ \Omega$. This resulted in equal amplification at masses 44 and 45. The amplification employed in the Faraday cup at mass 45 could be selected by software so the original configuration of the instrument could be still used if required.

2.2.2. Chromatographic conditions

Separation of the compounds was achieved with a DB-XLB column of $30\ \text{m} \times 0.32\ \text{mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$ film thickness (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, USA). The sample volume injected in the GC was $1\text{--}2\ \mu\text{L}$. The split/splitless and PTV injectors were both operated in splitless mode. Helium was used as carrier gas at a flow rate of $1\ \text{mL min}^{-1}$ for all samples and conditions. Silcosteel® and glass liners, with 2 mm of internal diameter, empty for both

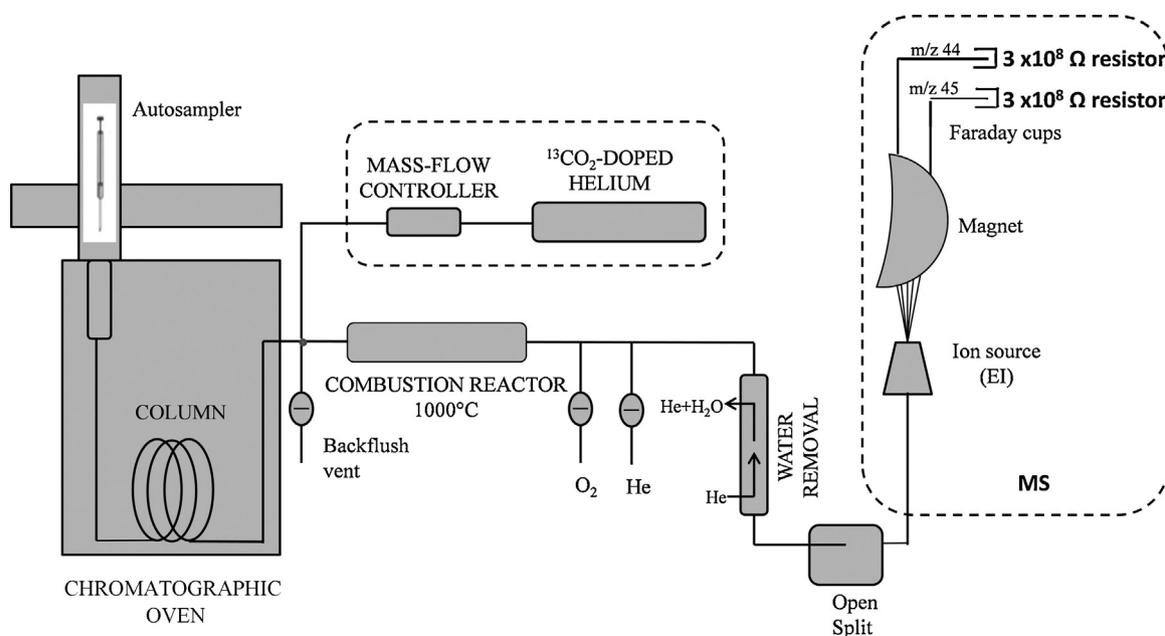


Fig. 1. Schematic illustration of the setup showing the modifications made in the GC-IRMS instrument.

Table 1
Optimized PTV parameters.

Parameter	Optimization range	Optimum value
Injector heating rate	1–14.5 °C s ⁻¹	10 °C s ⁻¹
Injection speed	10–100 μL s ⁻¹	30 μL s ⁻¹
Split flow	10–60 mL min ⁻¹	50 mL min ⁻¹
Splitless time	0.5–6 min	0.8 min
Injector isothermal time	0.10–0.50 min	0.10 min
Oven isothermal time	1–6 min	1.5 min

PTV and splitless injection, were purchased from Thermo (Bremen, Germany). Microliter™ Syringes of 10 μL were obtained from Hamilton (Bonaduz, Switzerland). Instrumental conditions used for PAHs standard solution (both PTV and hot splitless injections) as well as for the mixture of PAHs and alkanes, PCBs and thiophenes for PTV injections are detailed in [supplementary Table S4](#). The optimized parameters and range studied for PTV injection are listed in [Table 1](#).

2.2.3. Parallel GC-MS analysis

Identification of the compounds under study was performed with a standard GC (6890N, Agilent Technologies) MS (5975B, Agilent Technologies) fitted with a split/splitless injector and operated in EI mode at 70 eV. The *m/z* range was 50–600 amu. Dwell time was 100 ms. Transfer line, ion source and quadrupole temperatures were maintained at 280 °C, 230 °C and 150 °C, respectively. Compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the Wiley 275 Mass spectral library database. Chromatographic conditions were the same as those used with GC-combustion-MS using splitless injection.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of ¹³C₂

The ¹³C₂ spike diluted in He was prepared from ¹³C enriched sodium hydrogen carbonate, with an isotopic enrichment of 99%, as described elsewhere [9]. In brief, 200 mg of NaH¹³CO₃ were placed in a 25 mL three-necked round-bottomed flask, previously purged with He. Then, 300 μL of concentrated H₃PO₄ were injected into the flask through a septum cap. After the acid-base reaction, 4 mL of the gaseous phase, containing ¹³CO₂ were removed using a gas-tight

syringe and injected into the 5-L stainless-steel container. Finally, the container was pressurized to 5 bar with He from a high pressure cylinder.

2.3.2. Quantification using GC-combustion-IRMS with on-line isotope dilution

¹²C/¹³C isotope ratios were obtained by simultaneous measurement of the signals at *m/z* 44 and 45 (¹²CO₂ and ¹³CO₂) in two Faraday cups at the same amplification. Applying the on-line isotope dilution equation to every point in the chromatogram, the mass-flow chromatogram (ng of C min⁻¹ vs time) was obtained [3]. Then, the integration of the mass flow chromatogram directly provided the amount of carbon (in ng) eluted in each chromatographic peak. An internal standard (IS) was employed in all cases to avoid the difficult computation of the actual mass flow of the gaseous enriched spike [13]. The peak areas of the analyte and the IS in the mass flow chromatogram are both related to the unknown mass flow of spike. However, the ratio of peak areas (analyte/IS) will be equal to the actual ratio of concentrations in the injected sample and independent of the mass flow of spike used in the calculations. Thus, quantification of the amount of carbon under each peak can be determined just by calculating the areas of the IS and those corresponding to the other organic compounds under study in the mass flow chromatogram. Therefore, the knowledge of the spike mass flow is not needed, provided, of course, that there is not discrimination between analytes and IS in the chromatographic injector. The other usual advantages of the use of internal standards in gas chromatography are kept in this mode of application (variability of injection volume, recovery for non-chromatographic separations, etc.).

3. Results and discussion

3.1. Modification of the GC-combustion-IRMS instrument

The GC-combustion-IRMS instrument at the University of Oviedo was factory configured only for the measurement of carbon isotope ratios. After the combustion oven no reduction oven was installed (required for nitrogen isotope ratios) and the output of the oven was directly connected to the Nafion membrane tube for water removal. Also, no liquid nitrogen trap was installed in our

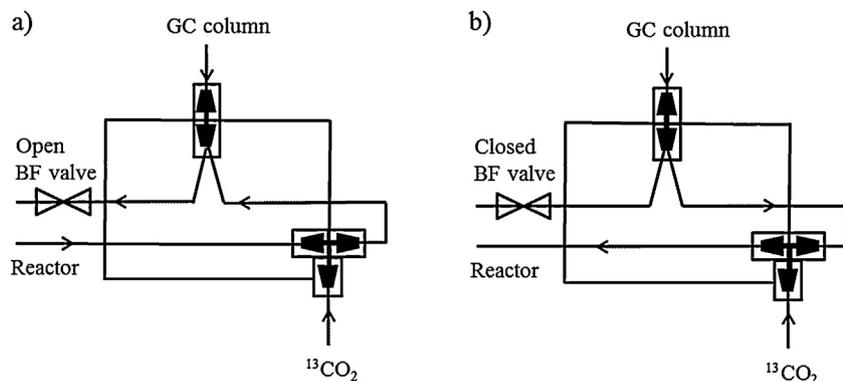


Fig. 2. Detail of the modifications performed in the splitter holder inside the chromatographic oven in order to add the $^{13}\text{CO}_2$ flow and operate the system in: (a) backflush (BF) mode and (b) direct mode.

system. In our previous quadrupole home-made system for on-line IDMS [8,9] we added the spike flow just after the combustion oven and before the open split connected to the mass spectrometer as no Nafion membrane was employed. In this system, and because of the Nafion membrane tube, this configuration was not possible (small carbon dioxide losses in the Nafion membrane would not be compensated) and we opted for adding the small flow of $^{13}\text{CO}_2$ diluted in He (ca. 0.5 mL min^{-1}) after the chromatographic column and before the combustion oven. For that purpose, we used the splitter located inside the chromatographic oven which is normally employed to backflush the system and avoid the solvent to reach the combustion oven. Fig. 2 shows a schematic of the connections inside the chromatographic oven after the instrumental modification that allows the continuous addition of the $^{13}\text{CO}_2$ and the operation of the instrument in backflush and direct mode. The instrument could then be operated in backflush mode for the first minutes of the chromatogram in order to prevent the solvent from entering the combustion unit and therefore enlarged its catalytic activity. The original procedure for reoxidation of the combustion oven was kept in the new configuration.

In addition, our instrument was also factory configured in order to have 2 amplification possibilities available at m/z 45. In this way, and in contrast to the conventional mode of operation of GC-combustion-IRMS instruments where the signal at m/z 45 is amplified 100-fold with respect to the signal at m/z 44, the same signal amplification ($3 \times 10^8 \Omega$ resistors) could be used in both Faraday cups. Fig. 3a shows a zoom of the typical chromatogram obtained with the modified instrument for the analysis of tetradecane using split/splitless injection with a post-column spike flow of 0.5 mL min^{-1} . Both m/z 44 and 45 are shown. As can be observed, the signal at m/z 45 is mostly constant while the signal at m/z 44 follows the chromatographic profile with a peak width at half height of ca. 2.3 s. Fig. 3b shows the same peak profile obtained with our previous GC-combustion-MS instrument which employed a quadrupole analyser. The peak width was narrower but the signal was noisier.

It is interesting to note that the addition of the $^{13}\text{CO}_2$ did not produce a long-term and difficult to remove contamination at m/z = 45 that could interfere with the use of the GC-combustion-IRMS instrument in its standard configuration for compound-specific isotope analysis. In fact, after removal of the connection to the splitter from the $^{13}\text{CO}_2$ deposit and restoring the amplification at mass 45 in the software, the background signal at m/z = 45 returned back to its typical background value in less than 10 h (overnight).

3.2. Critical comparison with a standard GC-combustion-QMS instrument

In comparison with our previous quadrupole GC-combustion-MS instrument [8,9] no identification capabilities are possible in the

new system. Previously, a six-way valve allowed the direct connection of the chromatographic column with the EI source, by-passing the combustion oven, for regular scanning in order to identify the different compounds under analysis by their fragmentation pattern and to assess peak purity for each compound [8,9]. This can be considered an important drawback of the new system, which will prevent its direct application to samples containing unknown compounds. However, there are many applications in which an accurate determination by GC-MS is required for a small number of known compounds on a routine basis (e.g. in the petrochemical industry).

On the other hand, the expected isotope ratio precision for the modified GC-IRMS should be much better. In order to confirm that, we computed the background ratio 44/45 when using a post-column spike flow of 0.5 mL min^{-1} . The relative standard deviation was around 0.05% ($n = 50$), which is one order of magnitude lower than that attainable with our previous quadrupole GC-MS instrument [8]. This much better precision is clearly shown in the stability of the isotope ratio chromatogram shown in Fig. 3c. For comparison, Fig. 3d shows the same results for our older GC-combustion-MS instrument [5] with much higher baseline noise.

Unfortunately, a noticeable extra column peak broadening was observed (0.038 min peak width at half height) in comparison with our previous system (0.022 min) [9] and those typically found when operating regular GC-MS or GC-FID instruments. This effect is likely due to the extra components used in the commercial GC-combustion-IRMS instrument, particularly the Nafion membrane.

The detection limit obtained for tetradecane was 8 ppb (ng C g^{-1}) based on three times the standard deviation of the baseline. If we take into account the injection volume and the peak width at the baseline (6.6 s approximately in this particular case, Fig. 3c), then we can make our detection limit independent of the column employed and the carrier gas flow rate. The value found was 1.6 pg C s^{-1} , being a bit higher than those provided by a mass spectrometer in full scan mode (1 pg C s^{-1}) and clearly better than those of a flame ionization detector (10 pg C s^{-1}). Interestingly, this detection limit was slightly worse than that obtained using the same on-line C isotope dilution concept but operating a standard quadrupole-based MS (0.8 pg C s^{-1}) [9], likely due to the wider peaks obtained.

3.3. Evaluation of injector fractionation effects

As indicated before, one of the few requisites for the application of the on-line carbon isotope dilution procedure is the quantitative transmission of the analytes (including the IS) from the syringe to the combustion oven. Once the mixture between the natural $^{12}\text{CO}_2$ and the continuously added $^{13}\text{CO}_2$ is produced, losses or

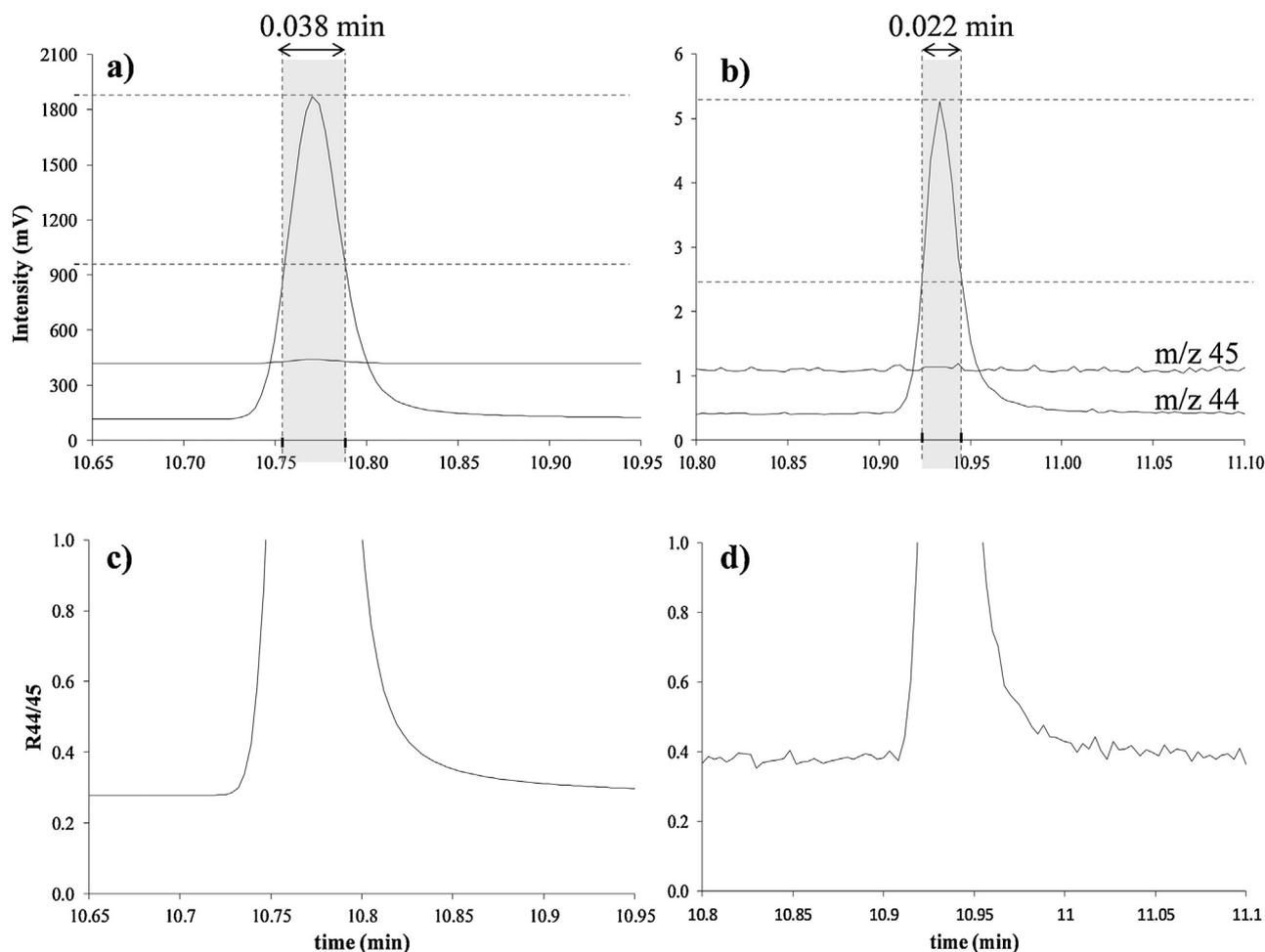


Fig. 3. Typical intensity (a and b) and 44/45 ratio (c and d) chromatograms obtained with the modified GC-IRMS (a and c) and the previous GC-QMS (b and d) instruments for tetradecane ($8 \mu\text{g C g}^{-1}$) using a post-column $^{13}\text{CO}_2$ spike flow of 0.5 mL min^{-1} .

ionization suppression events would not affect the quantitative results. On the other hand, the isotope dilution procedure is ideal to study injector fractionation effects as losses during injection can be easily quantified. In order to assess the possible fractionation during the injection step we resorted to a certified standard mixture of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which covers both, a very wide interval of boiling points ($218\text{--}525^\circ\text{C}$) and number of carbons (10–22 C) (see [supplementary Table S1](#)). This mixture contains most of the PAHs present in the Environmental Protection Agency (EPA) list as priority contaminants [14]. It is worth stressing that it is difficult to carry out such fractionation assessments at the GC injector using alternative detection techniques such as FID or EI-MS where the signal is slightly dependent on the chemical formulae and structure of the compounds under study [1,15].

The gas chromatograph used is equipped with a conventional split/splitless injector and a PTV injector. Optimum injector conditions for PAH analysis using the PTV mode of injection have been described [16] and were used as starting point. In brief, PTV injection is extremely flexible and combines the benefits of split/splitless and on-column inlets. The sample is usually injected into a cool liner, so no syringe needle discrimination can occur. Then, the inlet temperature is increased to vaporize the sample minimizing the inlet fractionation as well [17]. In our case, different parameters were optimized to obtain the minimal fractionation in the injector and their optimum values are given in [Table 1](#). The most important

parameters affecting fractionation were related to the temperature ramp (initial and final temperature and the heating rate). It was observed that the conventional split/splitless injection caused severe fractionation for the heavier PAHs while no fractionation was detected under the optimized PTV conditions. [Fig. 4](#) shows the results obtained for the 16 PAHs analysed using both injection modes. Therein, the corresponding response factors (signal per $\mu\text{g C g}^{-1}$ injected) were calculated for every compound and normalized against the first PAH eluting from the column. The results for 2-bromonaphthalene and acenaphthene, on the one hand, and dibenz(a,h)anthracene and benzo(g,h,i)perylene, on the other, are presented together because they were not completely resolved in the chromatographic column employed. The split/splitless injection led to a significant drop in the transmission of the heavier PAHs eluting at the end of the chromatogram in comparison to the lighter ones. The first eluting nine PAHs provided very similar normalized responses, 0.96 on average. For the heavier PAHs the transmission decreases abruptly to 0.58 (average of the last four eluting peaks). When using the PTV injector, the normalized response factors were almost identical for the 16 PAHs analysed (average value 1.00 with a standard deviation of 0.04). Therefore, by selecting the adequate conditions at the injection port no discrimination was observed and the on-line carbon isotope dilution procedure implemented in the GC-IRMS instrument could be applied to provide a generic response exclusively dependent on the amount of C injected for each organic compound.

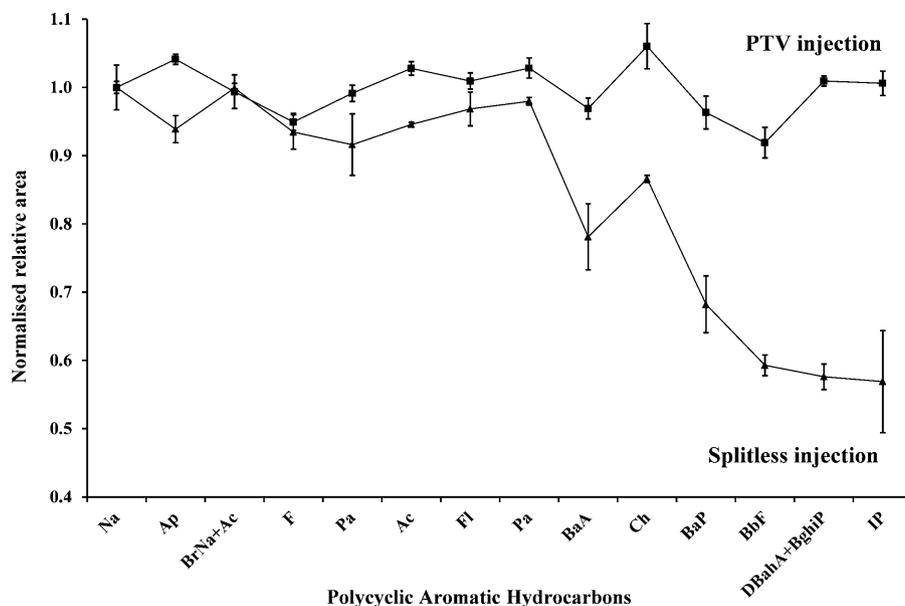


Fig. 4. Comparison of the normalized response factors (signal per $\mu\text{g C g}^{-1}$ injected) of the 16 PAHs analysed, given in elution order, using splitless and PTV injection modes. Uncertainty bars correspond to 1 standard deviation ($n = 3$).

3.4. Evaluation of on-line carbon isotope dilution for the quantification of organic compounds containing only carbon and hydrogen without specific standards

A synthetic mixture containing 16 PAHs and 12 alkanes ($\text{C}_9\text{--C}_{20}$) was prepared to evaluate the capabilities of the proposed approach to quantify a complex mixture of organic compounds without the need for specific calibration procedures. In this case the boiling point interval ranged from 126 to 525 °C. A single generic internal standard, benzo(b)fluorene (not present in the PAHs mixture), was selected to correct for injection variability and for the computation of the mass flow of enriched carbon dioxide. In this case, the only requisite was that the internal standard was chromatographically resolved from the rest of compounds under study.

Fig. 5a shows one of the chromatograms obtained at m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2$) and 45 ($^{13}\text{CO}_2$) for this mixture. As can be observed, most of the compounds are well resolved chromatographically but, when two compounds elute simultaneously, no quantification can be performed for the individual compounds. This is clearly one of the drawbacks of the proposed procedure (the same as for FID). In this particular case, and apart from the four PAHs which could not be resolved in this column, the alkane pentadecane and the PAH acenaphthene could not be fully resolved. We have opted to provide quantitative results for the sum of both compounds. The mass flow chromatogram obtained after the application of the on-line isotope dilution equation is given in Fig. 5b. The integration of the peaks in the mass flow chromatogram and the use of benzo(b)fluorene as internal standard provided the quantitative results given in Table 2. As can be seen, the recovery can be considered quantitative as values close to 100% were obtained for most compounds (range between 91 and 106%, average recovery 99.5%). Please note that the only compound with a significant error (91% recovery) was nonane, likely due to slight losses during the solvent removal after the splitless time in the PTV injection or integration errors. Additionally, the repeatability of the results was always below 4% RSD ($n = 5$)

3.5. Application to heteroatom-containing compounds

So far the on-line C isotope dilution approach has been successfully tested with organic compounds that cover a broad range of

Table 2

Absolute quantification results for the PAHs and n -alkanes mixture. Benzo(b)fluorene was used as a generic internal standard. The uncertainty is expressed as the standard deviation for $n = 5$ injections.

Compound	Added ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	Recovery (%)
Nonane	9.93	9.0 ± 0.2	91 ± 2
Decane	9.95	9.4 ± 0.2	95 ± 2
Undecane	9.96	9.7 ± 0.2	97 ± 2
Dodecane	9.97	9.8 ± 0.3	99 ± 3
Naphtalene	8.45	8.0 ± 0.1	95 ± 3
Tridecane	9.98	10.0 ± 0.2	100 ± 2
Tetradecane	9.99	9.9 ± 0.2	99 ± 2
Pentadecane + acenaphthylene	18.5	18.7 ± 0.4	101 ± 2
2-Bromonaphtalene + acenaphthene	13.6	13.6 ± 0.3	100 ± 2
Hexadecane	10.0	10.0 ± 0.2	100 ± 2
Fluorene	8.41	8.2 ± 0.2	98 ± 3
Heptadecane	10.0	10.2 ± 0.2	102 ± 2
Heptadecane	10.0	10.3 ± 0.2	102 ± 2
Phenanthrene	8.52	8.5 ± 0.2	100 ± 2
Anthracene	8.50	8.7 ± 0.1	102 ± 2
Nonacosane	10.0	10.3 ± 0.2	104 ± 2
Eicosane	10.0	10.3 ± 0.2	103 ± 2
Fluoranthene	8.45	8.6 ± 0.2	101 ± 2
Pyrene	8.36	8.8 ± 0.2	105 ± 2
Benzo(a)anthracene	8.39	8.1 ± 0.2	96 ± 3
Chrysene	8.56	9.1 ± 0.1	106 ± 2
Benzo(a)pyrene	8.88	8.8 ± 0.2	98 ± 3
Benzo(b)fluoranthene	8.45	7.9 ± 0.1	93 ± 3
Dibenzo(a,h)anthracene + indeno(1,2,3-cd)pyrene	17.4	17.5 ± 0.3	101 ± 4
Benzo(g,h,i)pyrene	8.76	8.9 ± 0.1	101 ± 4

boiling points and different chemical configurations, but are made exclusively of C, H and O [8,9]. Therefore, it is clear that under the condition of the complete transmission of the organic compounds in the injection using a PTV, this generic quantitative approach becomes accurate because the combustion of such pure organic compounds seems to be complete. Of course, it is still necessary to check if the presence of typical heteroatoms, such as halogens and sulfur, can affect negatively the combustion efficiency. We have chosen here PCBs and benzothiophenes as models for such assessment.

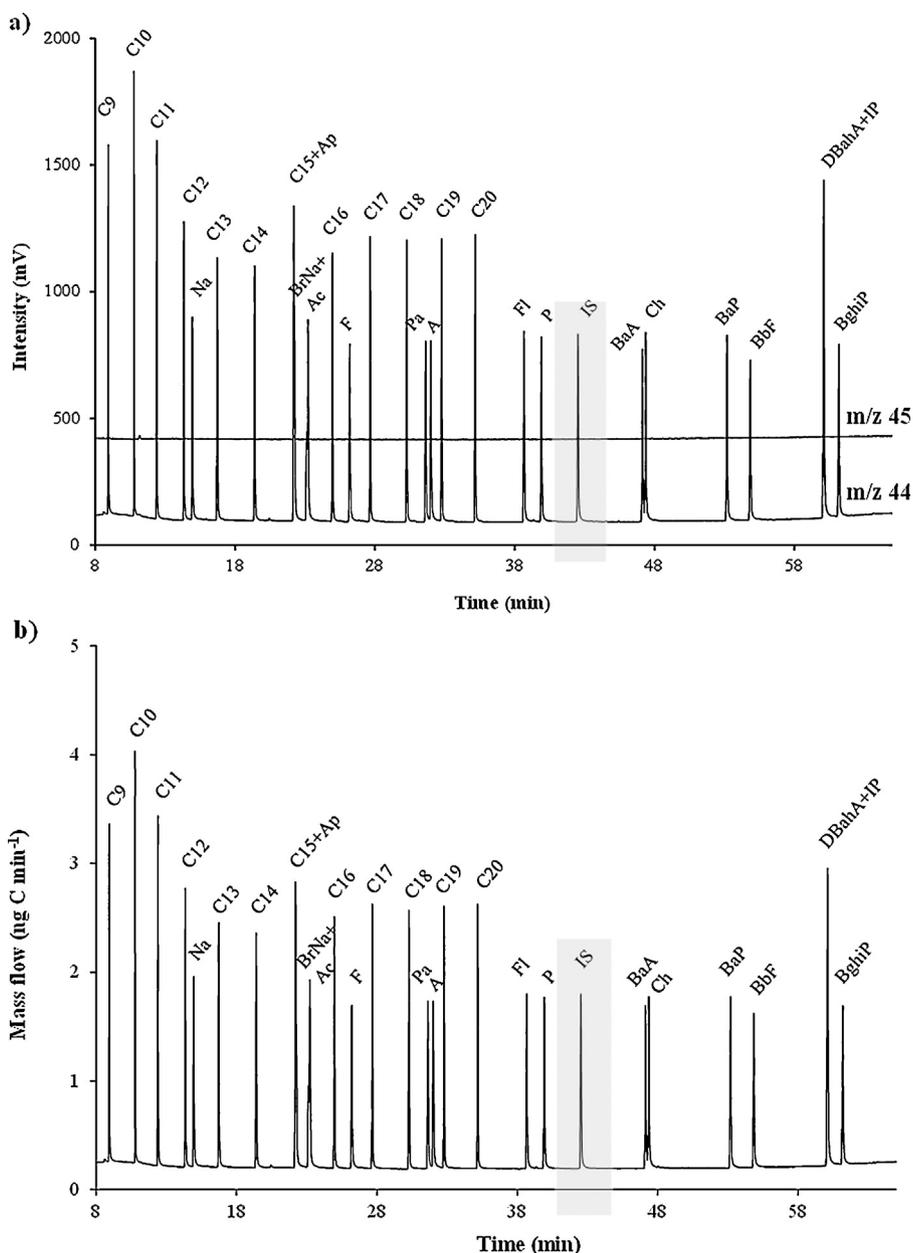


Fig. 5. Intensity (a) and mass flow (b) chromatogram for the PAHs ($8.5 \mu\text{g C g}^{-1}$) and *n*-alkanes ($10 \mu\text{g C g}^{-1}$) mixture. Benzo(b)fluorene was added as internal standard (IS).

3.5.1. PCBs

Polychlorinated biphenyl compounds (PCBs) are synthetic compounds where up to 10 chlorine atoms can be attached to two benzene rings. They were largely used in industrial applications (i.e. coolants, plasticizers). We have used here a mixture of 12 congeners (see [supplementary Table S2](#)), which contain a range from 3 to 8 atoms of chlorine. This mixture includes the six congeners considered as indicators for food contamination monitoring by the European Food Safety Agency (EFSA): PCB-28, 52, 101, 138, 153 and 180 [18] and six other congeners relevant due to their presence in the environment: PCB-18, 31, 44, 149, 170 and 194 as listed in the EN Norm 61619 [19]. The mass flow chromatogram obtained is shown in [Fig. 6a](#). The generic internal standard used in this case was octadecane. As can be seen, the signal of the PCBs decreases with the retention time as the number of chlorine atoms in the molecule increases. Since all of them are present in the same mass concentration, their carbon concentration will decrease as the number of chlorines increases. Chromatographic peaks for the congeners PCB

31 and 18 are not completely resolved so their results are presented together. Quantitative results, expressed as recovery of the theoretical values, are given in [Fig. 7](#). Again, precision observed was excellent ($<1\%$ RSD, $n=3$). Recovery results for all the PCBs ranged from 96 to 107% with a random variation around the true value. Therefore, it can be concluded that the presence of Cl atoms, even at a large scale, does not hamper the quantitative combustion of the compounds.

3.5.2. Thiophenes

Thiophene is a heterocyclic compound consisting of a flat five-membered aromatic ring with a sulfur atom. Related to thiophene are benzothiophenes and dibenzothiophenes, containing the thiophene ring fused with one and two benzene rings, respectively (see [supplementary Table S3](#)). They occur naturally as a constituent of petroleum-related materials. We have used here benzothiophene, 3-methylbenzothiophene and dibenzothiophene for evaluation. The mass flow chromatogram obtained is shown in [Fig. 6b](#). The internal

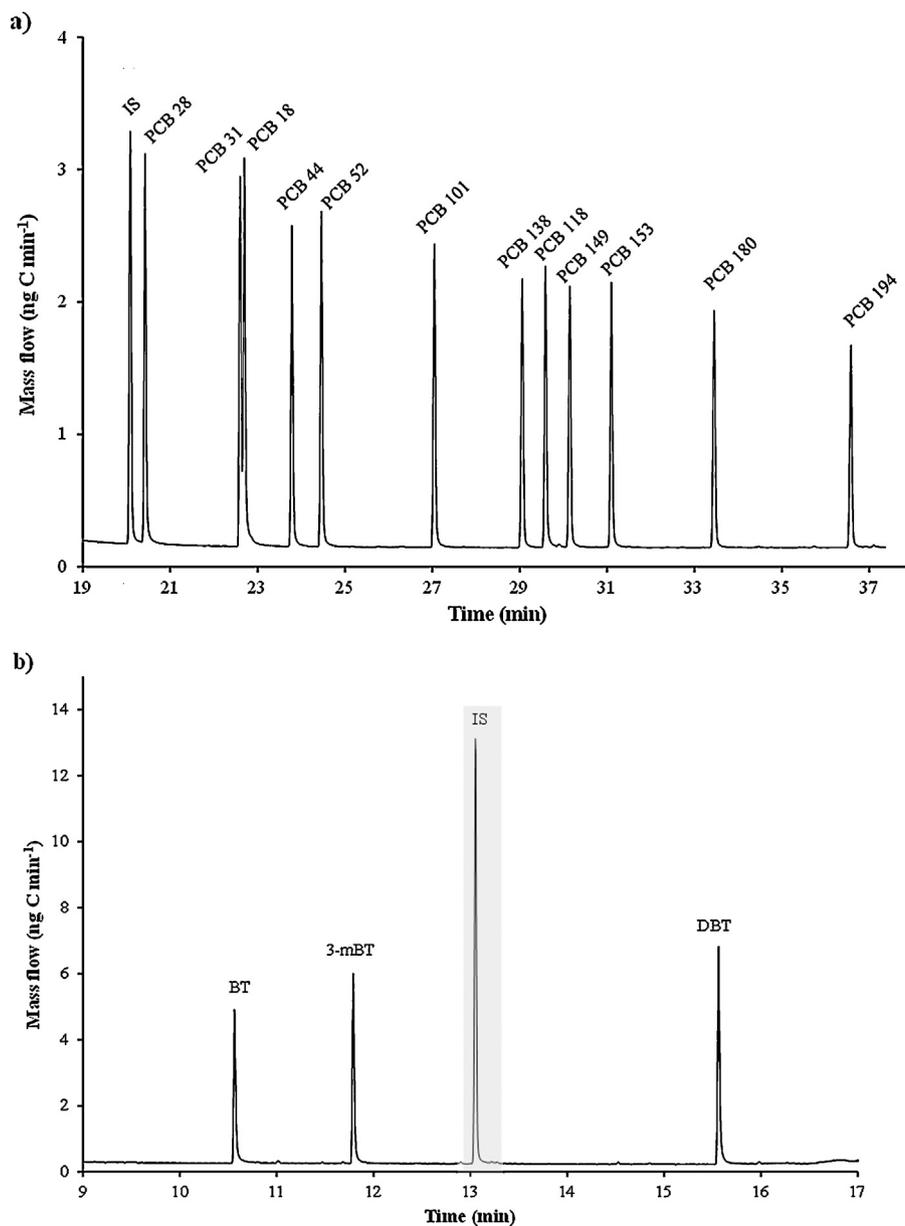


Fig. 6. Mass flow chromatograms for: (a) PCBs and (b) Benzothiophenes mixture. Octadecane and pentadecane, respectively, were used as internal standards.

standard used in this case was pentadecane. Quantitative results, expressed as recovery of the theoretical values, are also given in Fig. 7. Again, precision observed was excellent (<2% RSD, $n=3$). Recovery results for the three S-containing compounds ranged from 99 to 103%, which seems to demonstrate again that the presence of S atoms does not hamper the quantitative combustion of the compounds either.

It is worth stressing that the analysis of the traces of sulfur- and chlorine-containing compounds did not result either in a deterioration of the combustion capabilities of the oven or a significant shortening of its useful life.

3.6. Comparison of different protocols for quantification in GC without calibration standards

Modern gas chromatography [20] employs a large variety of detectors. Some detectors can be considered universal for organic compounds (such as the FID) while some others are selective and respond only to a certain number of elements or functional groups.

These universal detectors may, under certain circumstances, show also compound-independent sensitivity. It is well known [15] that the response of the FID detector can be predicted based on the structure of the molecule using the so-called effective carbon numbers (ECNs). So, if the identity of all peaks in the FID chromatogram is known, the use of the ECNs may allow quantitative determinations using a single generic internal standard to compensate for injection derived fluctuations. Similarly, the Atomic Emission Detector (AED) has been shown to provide universal and compound-independent sensitivity for organic compounds [21] when detecting carbon. However, compound-independent sensitivity in AED is strongly dependent on operating conditions [22] such as the oxygen flow rate. Finally, the concept of ECNs has been recently extended and applied to the electron ionization mass spectrometry detector [5–7] to be able to quantify compounds lacking authentic standards or surrogates by GC–MS. It was demonstrated [7] that the bias using the ECN-based prediction by GC–MS ranged between ca. 10 and 17% for a series of 26 compounds using both a TOF and a quadrupole analyser.

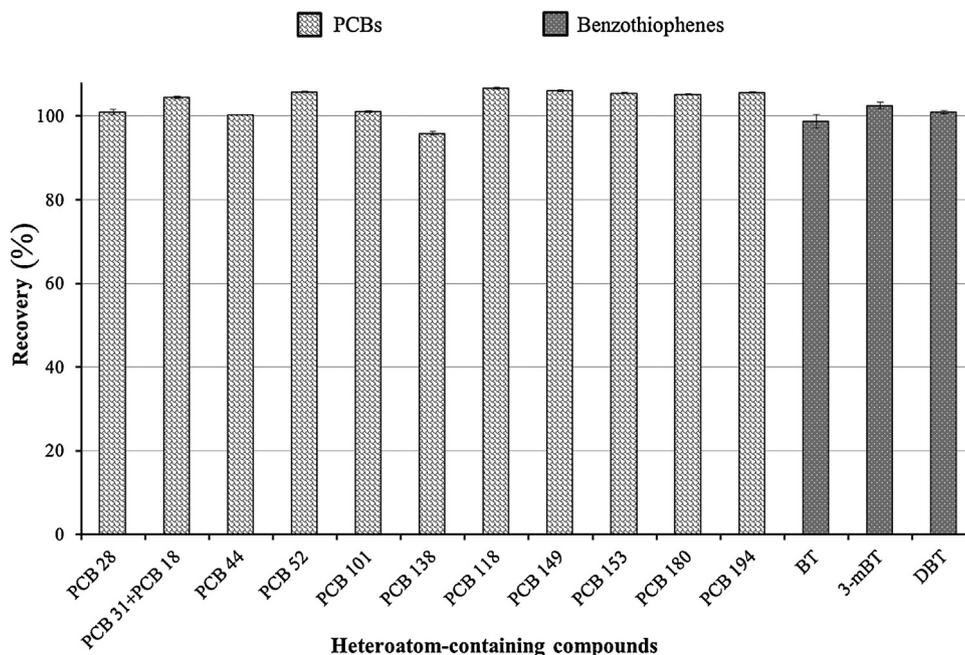


Fig. 7. Quantitative data (recovery, %) obtained for the PCBs and benzothiophenes mixtures. Uncertainty bars correspond to 1 standard deviation ($n = 3$).

Our work has a similar aim as those publications cited above: the determination of organic compounds without calibration standards. In comparison with the FID and EI-MS detectors no ECNs need to be determined as all carbon atoms in the different molecules assayed end up as carbon dioxide before they are detected, so no correction for the different functional groups is required. In comparison with the AED detector, the response is independent of the operating conditions as long as quantitative oxidation in the combustion oven is assured. So, our method is easier to apply to different compounds and more robust than the alternative procedures described before. In terms of sensitivity, detection limits for GC-combustion-IRMS are in the low pgC s^{-1} range. A value very similar to those cited for the FID, AED and EI-MS detector when working in full scan [20]. Our linear dynamic range is 5 orders of magnitude and limited by the Faraday cup detectors used in IRMS. In comparison to FID (7 orders of magnitude) and MS (6 orders of magnitude) our dynamic range is smaller. Finally, and in comparison to the other detectors, overlapping compounds in the chromatogram will interfere in the determinations. This is similar to what happens to the FID or the AED when detecting carbon. The EI-MS detector is much more selective in this case

4. Conclusions

We have successfully modified a commercial GC-IRMS instrument and evaluated its performance characteristics for on-line carbon isotope dilution using a series of different organic compounds. Additionally, the use of a PTV injector was investigated for the elimination of injection-derived fractionation allowing the use of a single internal standard to quantify different compounds with a wide range of sizes and boiling points in a single chromatographic run. In comparison to standard GC-QMS instruments with home-made combustion oven and connections, the new system provided slightly worse chromatographic resolution and detection limits. The use of a multicollector sector field MS led to much better isotope ratio precision in the isotope dilution computation at the expense of sacrificing the structural characterization

capabilities of a regular quadrupole operated in scan mode. Interestingly, the complete removal of the ^{13}C -enriched tracer required from the instrument after the isotope dilution experiments could be easily achieved. In fact, the transition of the instrument from the on-line isotope dilution mode to the standard IRMS mode can be achieved overnight.

The results presented herein demonstrate for the first time that the on-line carbon isotope dilution approach in combination with modified GC-IRMS instruments and PTV injectors can provide accurate and precise quantification of any organic compound, independently of their boiling point, structure and the presence of heteroatoms such as chlorine or sulfur, without the need for specific standards or calibration curves. Therefore, it can be considered as a true universal compound-independent detector for GC, where the signal is exclusively dependent on the number of C atoms present in the compound under study. This fact opens the door to different application fields such as the purity assessment of organic standards, where a small number of known impurities can be quantified without requiring any calibration standard. Another field of application is the quality control of petrochemical products. In this case, on-line carbon isotope dilution can be advantageously employed in comparison with the FID detector, traditionally employed for these applications, as the response is fully independent from the structure of the compound. Additionally, as there is no need for external calibration and specific analytical standards, this procedure can result in considerable savings in money and time. However, please note that, similar to that of a FID detector, it requires full chromatographic resolution between the analysed compounds. So, this method should not be applied for regulated applications in environmental, clinical or food samples.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN; project CTQ2009-12814, cofunded by FEDER) and FICYT (PC10-58). The provision of FEDER funds for the purchase of the IRMS instrument is also acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.071>.

References

- [1] T.D. Mark, *Fundamental aspects of electron impact ionization*, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 45 (1982) 125–145.
- [2] R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2004.
- [3] J.I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.
- [4] T.J. Quin, Primary methods of measurement and primary standards, *Metrologia* 34 (1997) 61–65.
- [5] Y.-H. Kim, K.-H. Kim, A statistical estimation approach for quantitative concentrations of compounds lacking authentic standards/surrogates based on linear correlations between directly measured detector responses and carbon number of different functional groups, *Sci. World J.* (2013) 11, article ID: 241585.
- [6] J.E. Szulejko, Y.-H. Kim, K.-H. Kim, Method to predict gas chromatographic response factors for the trace-level analysis of volatile organic compounds based on the effective carbon number concept, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3356–3365.
- [7] Y.-H. Kim, K.-H. Kim, J.E. Szulejko, M.-S. Bae, R.J.C. Brown, Experimental validation of an effective carbon number-based approach for the gas chromatography–mass spectrometry quantification of compounds lacking authentic standards or surrogates, *Anal. Chim. Acta* 830 (2014) 32–41.
- [8] S. Cueto-Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.I. García-Alonso, A Quantitative universal detection system for organic compounds in Gas Chromatography with isotopically enriched $^{13}\text{C}\text{O}_2$, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 2561–2564.
- [9] S. Cueto-Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.I. García-Alonso, Gas Chromatography–Combustion–Mass Spectrometry with postcolumn isotope dilution for compound-independent quantification: its potential to assess HS-SPME procedures, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6862–6869.
- [10] F. Poy, S. Visani, F. Terrosi, Automatic injection in high-resolution gas chromatography: a programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system, *J. Chromatogr. A* 217 (1981) 81–90.
- [11] D.A. Merritt, K.H. Freeman, M.P. Ricci, S.A. Studley, J.M. Hayes, Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2461–2473.
- [12] M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, *Compound-specific Stable Isotope Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012.
- [13] J. Heilmann, K.G. Heumann, Development of a species-unspecific isotope dilution GC–ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1952–1961.
- [14] EPA US, Toxic and priority pollutants, United States Environmental Protection Agency, 2014, <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollulants-background.cfm> (accessed 30.10.14).
- [15] A.D. Jorgensen, K.C. Picel, V.C. Stamoudis, Prediction of gas chromatography flame ionization detector response factors from molecular structures, *Anal. Chem.* 62 (1990) 683–689.
- [16] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, A multivariate study of the programmed temperature vaporization injection-gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons: application to marine sediments analysis, *Talanta* 74 (2008) 1096–1103.
- [17] M. Godula, J. Hajslová, K. Mastouska, J. Krivánková, Optimization and application of the PTV injector for the analysis of pesticide residues, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 355–366.
- [18] J. Alexander, H. Autrup, D. Bard, A. Carere, L. Guido Costa, J.-P. Cravedi, A. Di Domenico, R. Fanelli, J. Fink-Gremmels, J. Gilbert, P. Grandjean, N. Johansson, A. Oskarsson, A. Renwick, J. Ruprich, J. Schlatter, G. Schoeters, D. Schrenk, R. van Leeuwen, P. Verger, J. Alexander, H. Autrup, D. Bard, A. Carere, L. Guido Costa, J.-P. Cravedi, A. Di Domenico, R. Fanelli, J. Fink-Gremmels, J. Gilbert, P. Grandjean, N. Johansson, A. Oskarsson, A. Renwick, J. Ruprich, J. Schlatter, G. Schoeters, D. Schrenk, R. van Leeuwen, P. Verger, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the presence of non-dioxin like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food, *EFSA J.* 284 (2005) 1–137.
- [19] EN 61619, insulating liquids – contamination by polychlorinated biphenyls (PCBs) – method of determination by capillary column gas chromatography. (IEC 61619: 1997), International Standard 61619 from the International Electrotechnical Commission, October 1997.
- [20] K. Dettmer-Wilde, in: W. Engewald (Ed.), *Practical Gas Chromatography. A Comprehensive Reference*, Springer, Heilderberg, 2014.
- [21] J.T. Anderson, Some unique properties of gas chromatography coupled with atomic emission detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 344–355.
- [22] E.S. Chernetsova, A.I. Revelskii, D. Durst, I.A. Revelskii, Determination of the elemental composition of hydrocarbon mixtures by gas chromatography with atomic emission detection: increasing the accuracy, *J. Anal. Chem.* 60 (2005) 855–859.

Accepted Manuscript

Title: Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards

Author: Laura Alonso Sobrado Laura Freije-Carrelo Mariella Moldovan Jorge Ruiz Encinar J. Ignacio García Alonso



PII: S0021-9673(16)30792-0
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.chroma.2016.06.033>
Reference: CHROMA 357660

To appear in: *Journal of Chromatography A*

Received date: 28-4-2016
Revised date: 8-6-2016
Accepted date: 10-6-2016

Please cite this article as: Laura Alonso Sobrado, Laura Freije-Carrelo, Mariella Moldovan, Jorge Ruiz Encinar, J. Ignacio García Alonso, Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards, *Journal of Chromatography A* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.033>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1 **Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry**
2 **and gas chromatography-flame ionization detector for the**
3 **determination of fatty acid methyl esters in biodiesel**
4 **without specific standards**

5
6 Laura Alonso Sobrado, Laura Freije-Carrelo, Mariella Moldovan, Jorge Ruiz Encinar*
7 and J. Ignacio García Alonso*

8
9 Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo
10 Julián Clavería 8, 33006-Oviedo (Spain)

11
12 *Author(s) to whom correspondence should be addressed

13 Jorge Ruiz Encinar phone: +34 985103069; e-mail: ruizencinar@uniovi.es

14 J. Ignacio García Alonso phone: +34 985103484; e-mail: jiga@uniovi.es

15
16
17 **ABSTRACT**

18
19 GC-FID has been effectively used as a universal quantification technique for volatile
20 organic compounds for a long time. In most cases, the use of the ECN allows for
21 quantification by GC-FID without external calibration using only the response of a single
22 internal standard. In this paper we compare the performance characteristics of GC-FID
23 with those of post-column ¹³C Isotope Dilution GC-Combustion-MS for the absolute
24 quantification of organic compounds without the need for individual standards. For this
25 comparison we have selected the quantification of FAMES in biodiesel. The selection of
26 the right internal standard was critical for GC-FID even when ECN were considered. On
27 the other hand, the nature of the internal standard was not relevant when GC-Combustion-
28 MS was employed. The proposed method was validated with the analysis of the certified
29 reference material SRM 2772 and comparative data was obtained on real biodiesel
30 samples. The analysis of the SRM 2772 biodiesel provided recoveries in the range 100.6-
31 103.5 % and 96.4-103.6 % for GC-combustion-MS and GC-FID, respectively. The
32 detection limit for GC-combustion-MS was found to be 4.2 ng compound/g of injected
33 sample. In conclusion, the quantitative performance of GC-Combustion-MS compared
34 satisfactorily with that of GC-FID constituting a viable alternative for the quantification of
35 organic compounds without the need for individual standards.

36
37 **Keywords:** GC-combustion-MS, GC-FID, internal standard, absolute quantification,
38 FAMES, biodiesel

73 1. INTRODUCTION

74

75 The Flame Ionization Detector (FID) can be considered as the most universal and
76 generally used detection method in Gas Chromatography (GC). Organic compounds
77 eluting from the column are burned in a small hydrogen/air flame and, through a set of
78 complex reactions, nearly all carbon atoms are converted into methane which is further
79 oxidized to carbon dioxide. During this process, a small fraction of carbon atoms are
80 transformed into CHO^+ which generates a small electric current between two electrodes.
81 The FID will detect virtually all carbon containing compounds, with the exception of a
82 limited number of small molecules such as carbon monoxide, carbon dioxide, carbon
83 disulfide, formaldehyde and formic acid. In fact, due to its diverse and comprehensive
84 response, it is considered a universal detector for organic compounds in GC. Additionally,
85 FID response has been shown to be linear over nearly seven orders of magnitude with low
86 noise levels, high sensitivity and exceptional reliability.¹

87 Quantification in GC-FID can be performed in different ways. The external calibration
88 method relies on the comparison of the analyte peak area with the peak area of a series of
89 standards of the compound of interest at different and known concentration levels. In most
90 cases an internal standard is employed to correct for errors during sample preparation
91 and/or injection in the GC. Alternatively, and due to the uniform response of the FID for
92 different organic compounds, other procedures which do not require a calibration graph
93 have been proposed. The so-called “area percent method” is employed traditionally in the
94 petrochemical industry with or without the use of internal standards but this method works
95 better when all compounds of interest have the same functional groups. When compounds
96 with different functional groups are analysed, the use of response factors in combination
97 with the Effective Carbon Number (ECN) concept¹ has been proposed for quantification.
98 This later procedure is an improvement on the area percent method as it takes into account
99 the different response in the FID for different organic functional groups. Research on the
100 use of response factors based on the ECN for absolute quantification by GC-FID started
101 more than 50 years ago¹ trying to fulfil the dream of every chromatographer: the
102 development of a universal, absolute and quantitative chromatographic detector which
103 does not require external calibration. Modern books on Gas Chromatography recognize
104 the FID as the detector which has come closer to fulfil this dream.¹⁺

105 ECN in combination with FID was used for the determination of biogenic volatile organic
106 compounds (BVOCs) emitted into the atmosphere by plants.² A dynamic dilution system

107 allowed obtaining quantitative gas standards of VOCs with mixing ratios below 50 ppb.
108 Measured ECN values were within 10% of theoretical ECN values for most terpenoid
109 compounds. Szulejko et al. employed ECN to estimate the response factor values for
110 volatile organic compounds amenable to a sorbent-tube thermal desorption GC-MS
111 method.³ As well, the ECN approach was positively used on the quantitative analysis of
112 compounds lacking authentic standards or surrogates (CLASS) in environmental media.⁴
113 The same authors also evaluate an improve the ECN-based quantitation procedure of
114 CLASS by using additional descriptors (i.e., -Cl, -Br, >C=C<, and a group ECN offset
115 (O_k)) using the 1-point RF values.⁵

116 Recently, a procedure for the use of GC-Combustion-MS in combination with post-
117 column carbon isotope dilution has been developed in our laboratory based on a standard
118 quadrupole GC-MS instrument.⁶ The combustion reaction secures quantitative conversion
119 of every organic compound eluting from the GC column into CO₂ providing the required
120 isotopic equilibrium between such compounds and the isotopically-enriched carbon tracer
121 (¹³CO₂) continuously added. Electron ionization (EI) has been selected, so that ionization
122 could be carried out under a high vacuum to enable much higher sensitivity and lower
123 carbon contamination. Finally, the isotope ratio (44/45) in the mixture is measured as a
124 function of time by means of MS.

125 Later, a commercial GC-IRMS instrument has been modified to allow the continuous
126 introduction of a post-column flow of ¹³CO₂ through a splitter holder located inside the
127 chromatographic oven.⁷ As the instrumental modification occurs after the
128 chromatographic separation and before the entrance to the combustion reactor, the isotopic
129 equilibrium between the natural CO₂ from the sample and the ¹³CO₂ used as isotopic
130 tracer is reached in the combustion oven and before the entrance to the ion source. In
131 theory, this procedure should provide quantitative information of every single compound
132 previously separated in the chromatographic column without the need for individual
133 standards or response factors, providing a generic and universal detector.

134 The feasibility of the post-column Isotope Dilution procedure in combination with GC-
135 Combustion-MS has been successfully evaluated first, for organic compounds
136 corresponding to different families (C₉-C₂₀ n-alkanes, BTEX and esters)⁸ and, later, to
137 high boiling point compounds (PAH) and heteroatom-containing compounds
138 (polychlorinated biphenyls (PCBs) and benzothiophens).⁷

139 So, the objective of this study was to evaluate the post-column ¹³C Isotope Dilution GC-
140 Combustion-IRMS procedure and compare it with alternative methods based on GC-FID.

141 For this purpose we have selected the determination of Fatty Acid Methyl Esters (FAMES)
142 in biodiesel because standard method EN-14103 specifies GC-FID as the instrument to be
143 employed and the quantification is based only on the response of a single internal
144 standard.

145 Biodiesel is a clean-burning alternative fuel derived from vegetable oils, animal fats or
146 microbial oils. It is obtained by reaction of the oil- or fat-containing triglycerides with an
147 alcohol, mostly methanol, in the presence of a catalyst. As a result, the two main reaction
148 products are a mixture of FAMES and glycerol, considered as a high value co-product.⁹
149 Biodiesel must fulfil accepted standards before usage. In the United States, specifications
150 are set by the American Society for Testing and Materials (ASTM) through standard
151 ASTM D6751.¹⁰ At European level, the quality criteria for the production of biodiesel are
152 specified in standard EN-14214 described by the European Committee for Standardisation
153 (CEN).¹¹ The characterization of biodiesel is mandatory in terms of physico-chemical
154 properties but also for origin determination. For both mentioned purposes, the
155 determination of the FAMES profile content is a key parameter.¹² Within the European
156 EN-14214 standard, method EN-14103 specifies the FAMES and linolenic acid methyl
157 ester content in biodiesel.¹³ As indicated before, EN-14103 requires GC equipped with
158 FID for FAMES determination and calculation of FAMES content is achieved with the
159 response of a single internal standard. FAMES content is expressed as a mass fraction in
160 percent, and the total FAME content should be greater than 96.5%.

161 In Norm EN-14103:2003 the range of FAMES is set from C14:0 (methyl myristate) to
162 C24:1 (methyl nervonate) using methyl heptadecanoate (C17:0) as internal standard.
163 Version EN-14103:2011 extends the range from C6:0 to C24:1 and employs methyl
164 nonadecanoate (C19:0) as internal standard to be able to analyse FAMES of animal origin
165 since animal fat can contain higher C17:0 levels.¹⁴ However, it is worth mentioning that
166 the compositional profiles of common vegetable-based biodiesel are mainly dominated by
167 five FAME species: methyl palmitate (C16:0), methyl stearate (C18:0), methyl oleate
168 (C18:1), methyl linoleate (C18:2), and methyl linolenate (C18:3) and both internal
169 standards can be employed safely for the analysis of vegetable-based biodiesel.

170 Although EN-14103 establishes total FAME content determination, in many cases detailed
171 information about the individual FAME content and their distribution could offer an
172 important aspect of production and blending process as well as on the quality control of
173 distribution operations. Recently, Pauls reviewed the most widely used chromatographic
174 techniques for the analysis of biodiesel components. The use of gas chromatography-mass

175 spectrometry (GC-MS), liquid chromatography (LC), or supercritical fluid
176 chromatography has also been reported in the literature for FAMES characterization.¹⁵
177 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)¹⁶ has also been
178 evaluated for FAMES characterization. Unfortunately, all these mass spectrometry-based
179 techniques requires for specific standards. Recently, infrared spectroscopy (IR)¹⁷ and
180 energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer (EDXRF)¹⁸ have been proposed for the
181 determination of global FAMES content in fuel blends (biodiesel + diesel). These
182 techniques provide alternative solution to the determination of unsaturated FAMES which
183 could later be used on the determination of the iodine factor.

184 So, this study evaluates the post-column ¹³C Isotope Dilution GC-Combustion-IRMS
185 method in comparison with EN-14103 method based on GC-FID for total FAMES
186 determination in biodiesel samples. Additionally, the ECN concept¹ has been employed
187 for the determination of individual FAMES by GC-FID and the results compared with GC-
188 Combustion-IRMS. Emphasis was put on the evaluation and selection of appropriate
189 internal standards for both techniques. To demonstrate the suitability of the proposed
190 method, results obtained after analysing the certified reference material SRM 2772 and
191 real biodiesel samples are presented.

192

193 **2. MATERIALS and METHODS**

194

195 **2.1. Reagents and Standards**

196 Even carbon saturated C4:0-C24:0 FAME standard mixture in hexane, named hereafter
197 FAMES mix, was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The certified
198 concentration of each FAMES within this standard mixture was: methyl butyrate (C4:0)
199 1021 µg mL⁻¹; methyl caproate (C6:0) 1027 µg mL⁻¹; methyl caprylate (C8:0) 1020 µg mL⁻¹;
200 1; methyl caprate (C10:0) 1012 µg mL⁻¹; methyl laurate (C12:0) 1012 µg mL⁻¹; methyl
201 myristate (C14:0) 996 µg mL⁻¹; methyl palmitate (C16:0) 1000 µg mL⁻¹; methyl stearate
202 (C18:0) 998 µg mL⁻¹; methyl arachidate (C20:0) 999 µg mL⁻¹; methyl behenate (C22:0)
203 992 µg mL⁻¹; and, methyl lignocerate (C24:0) 995 µg mL⁻¹.

204 Methyl heptadecanoate (C17:0), methyl nonadecanoate (C19:0), methyl oleate (C18:1),
205 methyl linoleate (C18:2), and methyl linolenate (C18:3) were obtained as pure compounds
206 from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tridecane (n-C13) and heptadecane (n-C17)

207 individual n-alkane standards were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
208 Hexane (95% n-hexane) was purchased from J.T. Baker (Phillisburg, NJ, USA).

209 The certified reference material (CRM) SRM 2772 soy-based B100 biodiesel (NIST,
210 Gaithersburg, MD, USA) was used for validation purposes. The FAMEs content is given
211 as certified concentration for eight compounds (C14:0, C16:0, C16:1 n-7, C18:0, C18:1 n-
212 9, C18:1 n-7, C18:2 n-6 and C20:0) and as reference values for other four (C15:0, C17:0;
213 C18:3 n-6 and C22:0).

214

215 **2.2. Biodiesel samples**

216 The biodiesel samples used in this study were part of the research project JRP-ENG09
217 “Metrology for Biofuels” funded by the EMRP (European Metrology Research
218 Programme). Four biodiesel samples were investigated: (i) SME-mx, a Mexican soy-based
219 biodiesel; (ii) SME-b, a Brazilian soy-based biodiesel; (iii) CME-us, an American canola-
220 based biodiesel; and, (iv) RME-de, a German rapeseed-based biodiesel. These four
221 biodiesel samples covered different vegetable-based feedstock and geographical origin.

222 Additionally, an unknown feedstock-origin biodiesel sample (UME-es) provided by a
223 Spanish biodiesel producer was also analysed.

224

225 **2.3. GC-Combustion-IRMS**

226 A commercial Delta V Advantage GC-IRMS instrument (Thermo, Bremen, Germany) has
227 been modified to allow the continuous introduction of a post-column flow of $^{13}\text{CO}_2$
228 through a splitter holder located inside the chromatographic oven. Details of the modified
229 instrumental set-up have been described before.⁷ The GC separation was performed in a
230 polar polyethylene glycol type BD-EN 14103 analytical column (30 m x 0.32 mm I.D,
231 0.25 μm film thickness, Agilent J&W Scientific, Santa Clara, USA). Experimental
232 conditions are summarized in Table 1.

233

234 **2.4. GC-FID**

235 Parallel FAMEs analysis was performed by using Perkin Elmer, model Clarus 400, gas
236 chromatograph (Shelton, CT, USA) equipped with a FID. Experimental conditions are
237 also included in Table 1. The column (BD-EN 14103) and oven program are those

238 indicated in Norm EN-14103:2011. Data was processed with a Clarus 400 6.3.1.0504
239 version data system.

240

241 2.5. Procedures

242 **Sample Preparation.** All working standard solutions and samples were prepared by
243 gravimetric dilution in n-hexane. Biodiesel sample dilution was ca. 1:2500 for analysis by
244 GC-IRMS and ca. 1:250 by GC-FID. A given mass of the biodiesel sample, m_s , was
245 mixed with a known and appropriate mass of the pure internal standard, m_{IS} , and then
246 diluted with n-hexane as indicated above.

247

248 **Quantification of FAMES in biodiesel by post-column ^{13}C isotope dilution GC-**
249 **Combustion-IRMS.** The formed CO_2 species, $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$, were simultaneously
250 monitored at m/z 44 and 45, respectively. The 44/45 isotope ratio chromatogram (R_b as a
251 function of time) was used to obtain the corresponding mass-flow chromatogram using the
252 on-line isotope dilution equation:⁸

$$253 \quad MF_s = MF_t \frac{AW_n}{AW_t} \frac{A_t^{13}}{A_s^{12}} \left(\frac{R_b - R_t}{1 - R_b R_s} \right) \quad [1]$$

254 In this equation [1] MF_s corresponds to the mass-flow of carbon from the natural
255 abundance sample injected while MF_t corresponds to the mass-flow of carbon from the
256 post-column spike or tracer. AW_s and AW_t are the atomic weights of carbon in the sample
257 and tracer respectively. The isotope abundances A_t^{13} and A_s^{12} correspond to the isotopic
258 composition of ^{13}C in the tracer and ^{12}C in the sample. Finally, R_t is the isotope ratio
259 (44/45) in the tracer and R_s is the natural isotope ratio (45/44) in the sample while R_b is the
260 isotope ratio in the blend (44/45) measured as a function of time. The peak areas obtained
261 after the integration of the mass-flow chromatogram provide directly the mass of carbon
262 eluted in each peak. To compensate for the unknown mass-flow of tracer used, an internal
263 standard of known concentration must be employed. Finally, the concentration of the
264 analyte in the sample, C_s (mg g^{-1}), is calculated from equation [2]:

$$265 \quad C_s = \frac{A_s}{A_{IS}} \times \frac{n_{IS}}{n_s} \times \frac{MW_s}{MW_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_s} \times C_{IS} \quad [2]$$

266 Where A_s and A_{IS} are the peak areas for analyte and internal standard respectively in the
267 mass-flow chromatogram, n_s and n_{IS} the number of carbon atoms in the molecules of the
268 analyte and internal standard respectively, MW_s and MW_{IS} the molecular weights of

269 sample and internal standard and m_s and m_{IS} the masses of sample and pure internal
 270 standard taken. Finally, C_{IS} is the concentration (purity) of the internal standard used (mg
 271 g^{-1}).

272

273 **Quantification of FAMES in biodiesel by GC-FID.** The total FAMES content was
 274 calculated as indicated in Norm EN-14103 using equation [3]:

$$275 \quad C_{FAMES} = \frac{\sum A - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_s} \times C_{IS} \quad [3]$$

276 Where $\sum A$ is the total area of the FAMES in the chromatogram, including the internal
 277 standard.

278 Individual FAME content, expressed in mg/g, was calculated using equation [4]:

$$279 \quad C_s = \frac{A_s}{A_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_s} \times C_{IS} \quad [4]$$

280 Where: C_s is the content (mg g^{-1}) of the analysed FAME and A_s its peak area; A_{IS} is the
 281 peak area of the internal standard; m_{IS} and m_s the masses taken from internal standard and
 282 sample respectively and C_{IS} the concentration of the internal standard used (mg g^{-1}).

283 When using the ECN correction the equation used was:

$$284 \quad C_s = \frac{A_s}{A_{IS}} \times \frac{ECN_{IS}}{ECN_s} \times \frac{MW_s}{MW_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_s} \times C_{IS} \quad [5]$$

285 Please note that equation [5] is very similar to equation [2] by changing the number of
 286 carbon atoms in the molecule by their effective carbon number. The term corresponding to
 287 the effective carbon number (ECN) and the molecular weight of the molecules (MW) is
 288 usually referred to as the Relative Sensitivity Factor (RSF, equation [6]) for each analyte
 289 and can be calculated for each compound beforehand. The data employed for the analysis
 290 of the different FAMES is included in the supporting information, Table S1. The ECNs
 291 shown in Table S1 were calculated as indicated in reference 1.

$$292 \quad RSF_s = \frac{ECN_{IS}}{ECN_s} \times \frac{MW_s}{MW_{IS}} \quad [6]$$

293

294

295 3. RESULTS and DISCUSSION

296

297 3.1. Determination of individual FAMES in the standard mixture by GC-FID using 298 C17:0 as internal standard.

299 In order to explore the feasibility of the GC-combustion-IRMS method for FAMES
300 determination, initial GC-FID analyses were performed. Table 1 summarizes the final
301 chromatographic conditions used along this study for FAMES separation and
302 quantification. GC-FID conditions were selected close to those specified in EN-14103.

303 Figure 1a shows one of the GC-FID chromatograms obtained for a solution containing
304 about $180 \mu\text{g g}^{-1}$ of the FAMES mixture, in n-hexane, and $130 \mu\text{g g}^{-1}$ of C17:0 as internal
305 standard. The eleven FAMES contained in the standard mixture eluted in less than 35
306 minutes, with a retention time of 0.67 min for C4:0 and 32 min for C24:0. The long
307 chromatogram time for the GC-FID analysis is due to the slow oven temperature
308 programme used as recommended in norm EN-14103. The peak areas obtained were
309 treated using equations [4] and [5] and the recoveries obtained shown in Table 2. The
310 ECN concept can be used in GC-FID analysis to predict relative response factors based on
311 the molecular structure of the analyte. ECN takes into consideration the contribution of the
312 different functional groups of the analyte and its use avoids the need of specific standards
313 and calibration plots.⁴ As it can be observed, recoveries ranging from 90.2 to 104.2 %
314 were obtained when the ECN correction was applied (equation [5]). The use of the ECN
315 correction in combination with GC-FID is mandatory if more accurate concentrations are
316 to be obtained particularly for FAMES between C4:0 and C14:0. Similar results were
317 obtained using C19:0 as internal standard. Unfortunately, the use of the ECN correction in
318 GC-FID is not required in norm EN-14103 so we can expect significant errors for the
319 quantification of low molecular weight FAMES using this norm.

320

321 3.2. Determination of individual FAMES in the standard mixture by post-column ^{13}C 322 isotope dilution GC-combustion-IRMS using C17:0 as internal standard.

323 The GC separation was performed in a BD-EN 14103 analytical column (30 m x 0.32 mm
324 I.D, 0.25 μm film thickness, Agilent J&W Scientific, Santa Clara, USA). The injected
325 sample volume was 1 μL . The programmable temperature vaporization injector (PTV)
326 was operated in splitless mode with a temperature program of 0.1 min at 55 $^{\circ}\text{C}$, raised at
327 10 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ to 280 $^{\circ}\text{C}$, and held at 280 $^{\circ}\text{C}$ for 25 min. Helium was used as carrier gas at a flow

328 rate of 1 mL/min. The oven temperature program was 1 min at 50 °C, raised at 15 °C/min
329 to 250 °C, and held at 250 °C for 10 min. Analytical instrument control, data acquisition
330 and treatment were performed by Isodat 2.0 software.

331 A working solution containing ca. 15 $\mu\text{gC g}^{-1}$ of the FAMES mixture, in n-hexane, and 10
332 $\text{C}\mu\text{g g}^{-1}$ of C17:0, as internal standard, was prepared. The higher sensitivity of the GC-
333 combustion-IRMS setup and the necessity of preventing the clogging of the combustion
334 oven required working with lower FAMES concentration solutions.

335 A typical chromatogram obtained for the analytes of interest is shown in Figure 1b. In
336 general, the peaks obtained for the analytes at $m/z=44$ were well-shaped and well-resolved
337 while the constant signal at $m/z=45$ corresponds to the post-column $^{13}\text{CO}_2$ added. The
338 backflush mode was employed at the beginning and at the end of the chromatogram to
339 prevent the solvent entering the combustion oven and to enlarge the life of the combustion
340 catalyst. Methyl butyrate (C4:0) and methyl caproate (C6:0) were not chromatographically
341 resolved under the experimental conditions used and, therefore, only FAMES within the
342 range C8:0-C24:0 could be considered. These FAMES present retention times comprised
343 between 6.2 and 17.2 minutes. The intensity chromatogram shown in Figure 1b was
344 transformed into a mass-flow chromatogram applying the on-line isotope dilution equation
345 [1]. Then, the peaks were integrated and equation [2] applied for the quantification of the
346 individual FAMES in the mixture. The results obtained are shown in Table 2 in
347 comparison with the previous values obtained by GC-FID. As it can be observed, the
348 recovery values (in the range 96.4-101.4%) improved clearly with respect to GC-FID even
349 when the ECN correction was taken into account. With both techniques the found
350 concentrations had a variability of less than 1% RSD for most FAMES.

351 An important difference between the GC-FID and the GC-combustion-IRMS instruments
352 used consisted on the type of injector employed. The GC-FID was equipped only with a
353 conventional split/splitless injector while the GC-combustion-IRMS instrument was
354 equipped both with split/splitless and PTV injectors. Based on previous experiences⁷ the
355 PTV injector was initially selected for the analysis of FAMES. However, the results
356 obtained in Table 2 for the GC-FID instrument could have been improved if a PTV
357 injector was available for this instrument. So, and in order to compare the
358 chromatographic injection conditions for the studied analytes, a comparative study
359 between conventional split/splitless and PTV injection was carried out in the GC-
360 combustion-IRMS instrument. The sample was injected at a temperature of 280 °C for the

361 split/splitless mode. An injection speed of $30 \mu\text{L s}^{-1}$, splitless time of 0.8 min and split
362 ratio 1:50 were used.

363 Supporting Information Figure S1 illustrates the response observed for each FAME within
364 the standard FAMEs mixture under both injection modes in the GC-combustion-IRMS
365 instrument. The peak areas at $m/z = 44$ for each analyte were divided by their carbon
366 concentration and normalized against the value corresponding to the first eluting
367 compound (C8:0). As it can be observed, the response was constant between C8:0 and
368 C14:0 for both injection modes. However, for higher molecular weight FAMEs the
369 response decreases using the split/splitless injection while it was nearly constant for the
370 PTV injector. In comparison with split/splitless, the response improves between 5% to
371 15% for higher mass FAMEs when PTV injection is used. It seems that PTV injection
372 reduces the discrimination in the injector caused by the different boiling points of the
373 studied FAMEs, ranging from $195 \text{ }^\circ\text{C}$ (C8:0) to $232 \text{ }^\circ\text{C} / 4 \text{ mm Hg}$ (C24:0), improving
374 their transport to the analytical column. This fact could explain the results shown in Table
375 2 for GC-FID using the ECN correction for the high molecular weight FAMEs where their
376 recovery was substantially lower than when no correction was applied. Again, this
377 particularity of the split/splitless injector is not taken into consideration in norm EN-
378 14103.

379

380 **3.3. Analytical characteristics of the GC-combustion-IRMS instrument.**

381 The linearity of the method was evaluated by using five concentrations of the FAMEs
382 mixture ranging from 3 to $700 \mu\text{gC g}^{-1}$ (ca. $5 \mu\text{gC g}^{-1}$ to 1 mgC g^{-1} as compound) with five
383 replicate injections per concentration level. The results did not display significant
384 deviation from linearity, which means a correlation coefficient $r > 0.99$. However, it
385 should be pointed out that the measurement precision for standard solutions at the highest
386 concentration level measured ($700 \mu\text{gC g}^{-1}$) showed a precision of 14% while the precision
387 at the intermediate concentration levels was about 1%. For the lowest concentration level
388 measured ($3 \mu\text{gC g}^{-1}$) a precision of 4% was measured. These values indicate that
389 concentrations of $700 \mu\text{gC g}^{-1}$ are too high and close to the saturation of the detector. In
390 summary, this linear range will allow the quantification of the five major biodiesel
391 FAMEs after a minimum dilution of 1 to 1000 (1 to 2500 was selected finally). However,
392 the simultaneous quantification of major and minor FAMEs in real samples using a single
393 dilution factor might not be possible due to the large concentration difference.

394 The chromatographic resolution in the GC-combustion-IRMS instrument was also
395 evaluated. It is clear that, within the GC-combustion-IRMS setup, analytes eluting from
396 the column go over a longer capillary distance than in standard GC-FID or GC-MS
397 instruments. Analytes eluting from the chromatographic column pass through a
398 combustion reactor where they are oxidised into CO₂ and H₂O. Then, water is removed by
399 passing the gas stream through a tube constructed from a water permeable nafion
400 membrane. The sample is then introduced into the ion source of the MS by an open split
401 interface. This longer itinerary, especially the nafion membrane step, causes peak
402 broadening. Supporting Information Figure S2 shows the peak profile for FAME C16:0
403 (53.25 µg g⁻¹ of compound and 40.17 µgC g⁻¹) obtained by GC-combustion-IRMS. At it
404 can be observed, a peak width at half height (PWHH) of 2.1 seconds was obtained.
405 Meanwhile for a similar solution (177 µg g⁻¹ of compound and 133 µgC g⁻¹) measured by
406 GC-FID the PWHH was only 1.3 seconds. Due to this fact, GC-FID allowed better peak
407 resolution. The isomers of unsaturated FAME C18:1 present in biodiesel samples could be
408 resolved by GC-FID but not by GC-combustion-IRMS.

409 The detection limit (DL) for GC-combustion-IRMS was calculated according to equation
410 [7] for the measurement of a sample of the FAMES mixture at low concentration level.

$$411 \quad DL = \frac{3 \times stdev(background) \times C_s}{A_s} \quad [7]$$

412 The standard deviation of the background was measured just before the peak of interest
413 and A_s and C_s were the peak area and concentration of the analyte respectively. In this
414 way, the calculated DL for FAME C16:0 was of 4.2 ng compound/g in the injected
415 sample.

416

417 **3.4. Quantitative analysis of individual FAMES in biodiesel samples**

418 Biodiesels of vegetable origin are usually mixtures of five major FAMES (16:0, 18:0,
419 18:1, 18:2 and 18:3) with minor concentrations of other saturated FAMES (e.g. 14:0, 20:0
420 and 22:0). In order to evaluate the different techniques for the analysis of biodiesel
421 samples a standard mixture of the five major components was initially prepared and their
422 recoveries evaluated using C17:0 as internal standard. The results are given in Figure 2.
423 As it can be observed, for this small range of molecular weights all three procedures
424 provide recoveries in excess of 94% for all compounds. However, the best results in terms

425 of overall recoveries were obtained by GC-combustion-IRMS, particularly for the
426 unsaturated FAMES C18:2 and C18:3.

427 Final validation of the proposed method was performed with the analysis of the certified
428 reference material SRM 2772. This is a recent available soy-based biodiesel CRM
429 intended for use in evaluating analytical methods for the determination of selected
430 chemical and physical properties in B100. Figure 3 shows a representative chromatogram
431 corresponding to the GC-FID (Fig. 3a) and the GC-combustion-IRMS analysis (Fig. 3b)
432 of the SRM 2772 using C17:0 as internal standard. Again, the injected SRM 2772 solution
433 in GC-FID has ten times higher concentration than the one analysed by GC-combustion-
434 IRMS. As indicated in the figure, only the five main vegetable-based FAMES (from C16:0
435 to C18:3) were present. As it could be observed, GC-FID allows the resolution of all the
436 position isomers present in the sample and, as an example, C18:1(n-9) could be
437 chromatographically resolved from C18:1(n-7) as well as C18:2(n-6c) could be separated
438 from C18:2(n-6t). On the other hand, GC-combustion-IRMS allows only the
439 quantification of the five main FAMES, this is, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3
440 without positional information because of the poorer resolution conditions.

441 Table 3 summarizes the concentrations found and the corresponding recoveries calculated
442 after analysis of the SRM 2772 by GC-combustion-IRMS and GC-FID. We have not
443 included here data corresponding to the ECN correction in GC-FID as the results for the
444 certified compounds were very similar to those without correction. Additionally, norm
445 EN-14103 does not take into account the ECN correction so the comparison is made here
446 only based on equations [2] (IDMS) and [4] (GC-FID). It should be pointed out that the
447 GC-combustion-IRMS data for C18:1 correspond to the sum of C18:1(n-9) and C18:1(n-
448 6) since the method does not allow the resolution between both isomers as mentioned
449 before. Good agreement was obtained between the certified and found values for the
450 quantified FAMES using both techniques. Additionally, recovery values by GC-
451 combustion-MS were in agreement with those recommended as “expected recoveries” by
452 AOAC (98-102%) at this concentration level.¹⁹ This demonstrates that the proposed GC-
453 combustion-IRMS methodology can be used reliably for the determination of FAMES in
454 biodiesel samples using only C17:0 as internal standard and without the need for external
455 calibrants.

456

457

458 **3.5. Evaluation of alternative internal standards by GC-combustion-IRMS**

459 For quantification purposes using equations [2], [3], [4] and [5], the comparison of the
460 analyte peak area with the peak area of an internal standard is required. The selection of
461 the right internal standard is critical when using GC-FID as the ideal internal standard to
462 be used should have similar chemical nature and number of carbon atoms to the target
463 analytes.²⁰ However, for GC-combustion-IRMS the nature of the internal standard should
464 be *a priori* irrelevant as far as the internal standard is not present in the sample and has a
465 retention time similar to that of the analytes. Thus, to examine the influence of the
466 compound used as IS, a comparative analysis was conducted by GC-combustion-IRMS. A
467 working solution containing about 40 $\mu\text{gC g}^{-1}$ of the saturated C4:0-C24:0 FAMES and
468 about 20 $\mu\text{gC g}^{-1}$ of three unsaturated FAMES (methyl oleate (C18:1), methyl linoleate
469 (C18:2), and methyl linolenate (C18:3)) was prepared in n-hexane. Three alternative
470 internal standards were investigated; The selected FAME methyl heptadecanoate (C17:0)
471 was compared with two lineal hydrocarbons: heptadecane (C17) with the same number of
472 carbon atoms and tridecane (C13) with a lower molecular weight. The three tested internal
473 standards were added in a concentration of 20 $\mu\text{gC g}^{-1}$ to this working solution.

474 The results are shown in Table 4. As it can be observed, the recovery of all studied
475 FAMES was quantitative and similar for the three internal standard candidates with an
476 overall mean recovery of 101.2%. These data suggest that, with the proposed
477 methodology, the quantification of FAMES in biodiesel or, by extension, any other volatile
478 organic compound can be achieved using an internal standard of either similar or different
479 nature than that of the target analytes. Such good results are due to the quantitative
480 oxidation of the eluting compounds to carbon dioxide within the combustion oven and the
481 selection of a GC injector, the PTV injector, which do not provide discrimination between
482 compounds of different boiling points as the standard split/splitless injector does.

483

484 **3.6. Application of the GC-combustion-IRMS method on real biodiesel samples**

485 After optimization and validation, the proposed post-column ^{13}C isotope dilution GC-
486 combustion-IRMS method was applied to real biodiesel samples in the frame of a
487 European Metrology Research Program (EMRP) project. Four B100 samples were
488 analyzed and both C17:0 and n-C17 were considered as internal standards for
489 quantification.

490 The final results are summarized in Table 5, where only the five FAMEs relevant in
491 vegetable-based biodiesel (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3) are shown. The GC-
492 combustion-IRMS results were also compared with GC-FID according to EN-14103:2003
493 method, this is using C17:0 as internal standard. As it can be observed, C18:2 is the
494 dominant compound in soy-based biodiesel, meanwhile in rapeseed- and canola-based
495 biodiesel C18:1 is the most abundant FAME. The results obtained for the analysis of the
496 UME-es sample are also included on Table 5 and the corresponding mass flow
497 chromatogram is shown in Supporting Information Figure S3. As it could be observed,
498 this biodiesel sample present a different FAMEs profile compared to the EMRP samples
499 being methyl palmitate (C16:0) and methyl oleate (C18:1) the predominant FAMEs. Such
500 observed profile could be due to the use a blend of feedstocks for its production. In this
501 way, and according to literature data, palm and soy oil fatty acid in a ratio 80:20 could be
502 suggested as based feedstocks.¹²

503 The results presented in Table 5 were compared statistically by Student's t-test
504 (Supporting Information Figure S4).²¹ The obtained values for the proposed GC-
505 combustion-MS approach did not exceed the theoretical values indicating that there was
506 no significant difference between the methods compared.

507 The GC-combustion-MS obtained results in this study indicate that the proposed method
508 is a good alternative to the EN-14103:2003 GC-FID one, but also to other potential
509 analytical techniques for FAMEs characterization in biodiesel.

510

511

512 **4. CONCLUSIONS**

513 The dream of every chromatographer is to employ a detection system whose response is
514 universal, constant and independent of the nature of the analyte. In that way, a single
515 internal standard could be employed to determine a large range of analytes. The proposed
516 post-column ¹³C-isotope dilution GC-combustion-MS instrument is coming closer to fulfil
517 this dream. We have proved that the method is a good alternative to the existing methods
518 for the quantification of FAMEs in biodiesel samples, providing absolute quantification of
519 saturated and unsaturated FAMEs in a wide range of boiling points and number of
520 carbons, without the need for specific analytical standards and time-consuming calibration
521 procedures. Additionally, the proposed procedure shows no limitations in the selection of
522 internal standards as GC-FID does. During the work we have shown some of the

523 limitations of GC-FID for the analysis of biodiesel samples using C17:0 or even C19:0 as
524 internal standards: FAMES of size smaller than C14:0 are not analysed correctly if the
525 ECN correction is not applied. On the other hand, the discrimination of high molecular
526 weight FAMES in the standard split/splitless injector needs to be taken into account when
527 the ECN correction is applied. We think that the PTV injector is a good alternative
528 showing minimal discrimination between different molecules and it has shown to be ideal
529 to the application of the GC-combustion-IRMS method.

530

531

532 **ACKNOWLEDGEMENTS**

533 This research has been supported by the European Union in the frame of the EMRP
534 Project “ENG09 - Metrology for Biofuels” by the provision of a Research Excellence
535 Grant (REG). Additional funding was obtained from the Spanish Ministry of Science and
536 Innovation under the CTQ2012-36711 project (co-funded by FEDER). Dr. H. Goenaga-
537 Infante and Dr. P. Dunn (LGC Group, UK) are thanked for providing the biodiesel
538 samples. The provision of FEDER funds for the purchase of the GC-IRMS instrument is
539 also acknowledged

540

541 **REFERENCES**

542

-
- 1 J.T. Andersson, Detectors, in: K. Dettmer-Wilde, W. Engewald (Eds.), Practical gas chromatography, Springer, New York, 2014, pp. 205-248.
 - 2 C.L. Faiola, M.H. Erickson, V.L. Fricaud, B.T. Jobson, T.M. VanReken. Quantification of biogenic volatile organic compounds with a flame ionization detector using the effective carbon number concept. *Atmos. Meas. Tech.* 5 (2012) 1911-1923.
 - 3 J.E. Szulejko, Y.-H. Kim, K.-H. Kim. Method to predict gas chromatographic response factors for the trace-level analysis of volatile organic compounds based on the effective carbon number concept. *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3356-6665.
 - 4 Y.-H. Kim, K.-H. Kim, J.E. Szulejko, M.-S. Bae, R.J.C. Brown. Experimental validation of an effective carbon number-based approach for the gas chromatography-mass spectrometry quantification of “compounds lacking authentic standards or surrogates”. *Anal. Chim. Acta* 830 (2014) 32-41.
 - 5 J.E. Szulejko, Y.-H. Kim. Re-evaluation of effective carbon number (ECN) approach to predict response factors of ‘compounds lacking authentic standards or surrogates’ (CLASS) by thermal desorption analysis with GC-MS. *Anal. Chim. Acta* 851 (2014) 14-22.
 - 6 S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.I. García Alonso. A quantitative universal detection system for organic compounds in gas chromatography with

- isotopically enriched $^{13}\text{CO}_2$. *Angewandte Chemie International Edition* 48 (2009) 2561-2564.
- ⁷ L. Alonso Sobrado, M. Robledo Fernández, S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, J.I. García Alonso. Modification of a commercial gas chromatography isotope ratio mass spectrometer for on-line carbon isotope dilution: Evaluation of its analytical characteristics for the quantification of organic compounds. *J. Chromatogr. A* 1419 (2015) 99-108.
 - ⁸ S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.I. García Alonso. Gas chromatography-combustion-mass spectrometry with post-column isotope dilution for compound-independent quantification: its potential to assess HP-SPME procedures. *Anal. Chem.* 82 (2010) 6862-6869.
 - ⁹ L.C. Meher, D. Vidyasagar, S.N. Naik SN. *Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review*. *Renewable Sustain Energy Rev.* 10 (2006) 248-268.
 - ¹⁰ ASTM D 6751. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.
 - ¹¹ EN 14214. Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – Requirements and test methods.
 - ¹² S.K. Hoekman, A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, Mani Natarajan. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 143-169.
 - ¹³ EN 14103:2003. Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) determination of ester and linolenic acid methyl esters content.
 - ¹⁴ EN 14103:2011. Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) determination of ester and linolenic acid methyl esters content.
 - ¹⁵ P.E. Pauls. Review of chromatographic characterization of techniques for biodiesel and biodiesel blends. *J. Chromatogr. Sci.* (2011) 49:384-396.
 - ¹⁶ A.M.A.P. Fernandes, M.N. Eberlin, P.R.M. Silva, S.R. Silva, V.S. Cunha, R.J. Daroda, R.M. Alberici. Unsaturation levels in biodiesel via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Fuel* 128 (2014) 99-103.
 - ¹⁷ J.S. Oliveira, R. Montalvão, L. Daher, P.A.Z. Suarez, J.C. Rubim, Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies, *Talanta* 69 (5) (2006) 1278–1284.
 - ¹⁸ R. Sitkoa, B. Zawisza, Z. Kowalewska, K. Kocot, M. Polowniak. Fast and simple method for determination of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel blends using X-ray spectrometry. *Talanta* 85 (2011) 2000-2006.
 - ¹⁹ Guidelines for standard method performance requirements. AOAC Official Method of Analysis. Appendix F. AOAC International 2012.
 - ²⁰ K. Dettmer-Wilde, W. Engewald, Quantitative analysis, in: K. Dettmer-Wilde, W. Engewald (Eds.), *Practical gas chromatography*, Springer, New York, 2014, pp. 271-302.
 - ²¹ D.L. Massart, B.G.M. Vanderginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman. “*Chemometrics: a textbook*. Elsevier, Amsterdam, 1988.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Chromatogram of the FAMES mixture obtained after GC-FID (a) and GC-combustion IRMS (b) using C17:0 as internal standard.

Figure 2. Comparison of recoveries, expressed in %, obtained after GC-FID (dark grey bars), GC-FID ECN (light grey bars) and GC-combustion IRMS (white bars) in the determination of compounds typically present in vegetable-based biodiesel using C17:0 as internal standard. Uncertainty bars correspond to 1 standard deviation ($n = 5$).

Figure 3. Chromatographic profile of FAMES in soy based biodiesel SRM 2772 obtained after GC-FID (a) and GC-combustion IRMS (b) analysis. C17:0 was added as internal standard.

Table 1. Chromatographic conditions used for FAMEs separation and quantification by GC-combustion-IRMS and GC-FID.

Parameters	GC-combustion-IRMS	GC-FID
Column	BD-EN 14103	BD-EN 14103
Injection mode	PTV splitless	Split/splitless
Injector temperature	55 °C (0.10 min) 10 °C/s 280 °C (25 min)	280 °C
Injection speed	30 µL/s	30 µL/s
Splitless time	0.8 min	0.8 min
Split ratio	1:50	1:20
Injected volume	1 µL	1 µL
Carrier gas	helium	helium
Carrier gas flow	1 mL/min	1.5 mL/min
Interface temperature	1000°C	---
EI source energy	124 eV	---
FID temperature	---	250°C
H ₂ flow	---	50 mL/min
Air flow	---	450 mL/min
Oven temperature programme	50 °C (1 min) 15 °C/min 250 °C (10 min)	60 °C (2 min) 10 °C/min 200 °C (0.1 min) 5 °C/min 240 °C (12 min)
Tracer flow	0.5 mL/min	---
Data processor	Isodat 2.0	Clarus 400 6.3.1.0504

Table 2. Comparison of recoveries obtained after GC-combustion-IRMS and GC-FID determination of the individual compounds in the FAMEs mixture using C17:0 as internal standard. For each individual FAME the added concentration was recalculated after the gravimetric preparation of the analyzed solution. Mean and standard deviation of n=5 determinations.

FAME	GC-C-IRMS		GC-FID		
	Added, $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery, % (eq. [2])	Added, $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery, % (eq. [4])	Recovery, % (eq. [5])
Methyl butyrate (C4:0)	-----	-----	180.1	54.4 ± 1.7	104.2 ± 3.2
Methyl hexanoate (C6:0)	-----	-----	181.1	71.1 ± 1.9	104.1 ± 2.8
Methyl octanoate (C8:0)	15.37	99.2 ± 0.9	179.9	81.6 ± 1.8	103.8 ± 2.3
Methyl decanoate (C10:0)	15.25	100.2 ± 0.9	178.5	88.3 ± 0.8	102.8 ± 1.0
Methyl dodecanoate (C12:0)	15.25	101.3 ± 0.5	178.5	91.1 ± 0.2	99.9 ± 0.3
Methyl myristate (C14:0)	15.00	100.9 ± 0.5	175.7	94.9 ± 0.4	99.4 ± 0.4
Methyl palmitate (C16:0)	15.07	101.4 ± 1.1	176.4	97.4 ± 0.1	98.7 ± 0.1
Methyl stearate (C18:0)	15.04	100.2 ± 0.4	176.0	99.7 ± 0.1	98.4 ± 0.1
Methyl arachidate (C20:0)	15.05	101.0 ± 1.0	176.2	101.9 ± 0.4	98.5 ± 0.3
Methyl behenate (C22:0)	14.94	98.6 ± 0.8	175.0	100.3 ± 0.7	95.3 ± 0.6
Methyl tetracosanoate (C24:0)	14.99	96.4 ± 0.7	175.5	96.4 ± 0.8	90.2 ± 0.7

Table 3. Comparison of quantitative recoveries obtained after GC-combustion-IRMS and GC-FID determination of FAMES in SRM 2772 using C17:0 as internal standard.

FAME compound	SRM 2772	GC-C-IRMS		GC-FID	
	Certified, mg g ⁻¹	Found, mg g ⁻¹	Recovery, %	Found, mg g ⁻¹	Recovery, %
Methyl palmitate (C16:0)	107 ± 2	107.7 ± 0.8	100.6 ± 0.7	104.88 ± 0.14	100.9 ± 2.3
Methyl stearate (C18:0)	43.0 ± 2.7	43.5 ± 0.2	101.2 ± 0.5	44.439 ± 0.026	103.6 ± 2.3
Methyl oleate (C18:1, n-9)	233 ± 6	248.8 ± 2.2**	100.6**	228.38 ± 0.20	98.2 ± 2.3
Methyl vaccinate (C18:1, n-7)	14.3 ± 1.5	-----	-----	12.91 ± 0.65	90.4 ± 4.1
Methyl linoleate (C18:2, n-6)	523 ± 17	526.2 ± 2.4	100.6 ± 0.5	529.9 ± 1.8	101.4 ± 2.2
Methyl linolenate (C18:3, n-3)	69.3 ± 2.6*	71.8 ± 1.1	103.5 ± 1.6	67.58 ± 0.25	96.4 ± 2.1

* reference value

** sum of C18:1(n-9) and C18:1(n-7)

Table 4. Found concentration and error quantitative recoveries of individual FAMES in the FAMES saturated and unsaturated mix obtained by GC-combustion-IRMS examining different compounds as internal standard. The uncertainties indicate standard deviations for n=5 injections.

	Added, $\mu\text{g g}^{-1}$	C17:0	n-C17	n-C13
		Recovery, %	Recovery, %	Recovery, %
Methyl octanoate (C8:0)	37.07	99.4 \pm 0.9	99.4 \pm 0.6	100.2 \pm 0.4
Methyl decanoate (C10:0)	38.18	101.0 \pm 1.2	100.9 \pm 1.0	101.8 \pm 1.2
Methyl dodecanoate (C12:0)	39.22	99.9 \pm 0.5	99.8 \pm 0.3	100.7 \pm 0.7
Methyl myristate (C14:0)	39.42	100.6 \pm 0.7	100.6 \pm 0.5	101.4 \pm 0.9
Methyl palmitate (C16:0)	40.17	100.1 \pm 0.1	100.0 \pm 0.5	100.8 \pm 1.1
Methyl stearate (C18:0)	40.59	97.5 \pm 1.2	97.5 \pm 0.8	98.3 \pm 0.7
Methyl oleate (C18:1)	18.36	99.0 \pm 1.3	98.9 \pm 0.9	99.7 \pm 0.6
Methyl linoleate (C18:2)	24.38	100.2 \pm 0.7	100.2 \pm 0.6	101.0 \pm 0.8
Methyl linolenate (C18:3)	16.84	99.4 \pm 0.5	99.4 \pm 0.2	99.8 \pm 0.6
Methyl arachidate (C20:0)	41.05	98.7 \pm 0.4	98.6 \pm 0.5	99.4 \pm 1.1
Methyl behenate (C22:0)	41.11	97.5 \pm 0.4	97.4 \pm 0.3	98.2 \pm 0.7
Methyl tetracosanoate (C24:0)	41.54	95.8 \pm 0.6	95.8 \pm 0.9	96.6 \pm 1.1

Table 5. FAMEs content (mg g^{-1}) in five biodiesel samples obtained by the proposed post column ^{13}C GC-combustion-IRMS method (using two different internal standards) and comparison with GC-FID results.

FAME	GC-FID C17:0 IS	GC-C-MS C17:0 IS	GC-C-MS n-C17 IS
SME-mx			
Methyl palmitate (C16:0)	102.84 \pm 0.24	107.7 \pm 1.4	105.7 \pm 1.5
Methyl stearate (C18:0)	39.02 \pm 0.03	40.7 \pm 0.2	43.7 \pm 0.5
Methyl oleate (C18:1)	211.18 \pm 0.76	209.8 \pm 2.4	214.2 \pm 1.4
Methyl linoleate (C18:2)	552.53 \pm 3.21	540.8 \pm 19.3	535.0 \pm 3.1
Methyl linolenate (C18:3)	85.01 \pm 0.47	85.4 \pm 3.4	91.3 \pm 2.3
SME-br			
Methyl palmitate (C16:0)	104.08 \pm 0.07	107.0 \pm 1.2	107.8 \pm 1.4
Methyl stearate (C18:0)	29.68 \pm 0.02	31.6 \pm 0.6	35.6 \pm 0.5
Methyl oleate (C18:1)	278.22 \pm 1.10	279.0 \pm 1.4	283.1 \pm 1.1
Methyl linoleate (C18:2)	489.51 \pm 3.27	500.7 \pm 7.4	486.2 \pm 2.5
Methyl linolenate (C18:3)	50.81 \pm 0.20	57.9 \pm 2.2	59.0 \pm 2.5
RME-de			
Methyl palmitate (C16:0)	44.96 \pm 0.04	51.7 \pm 0.2	48.0 \pm 0.2
Methyl stearate (C18:0)	16.78 \pm 0.03	20.6 \pm 0.4	23.1 \pm 0.7
Methyl oleate (C18:1)	601.12 \pm 1.31	602.8 \pm 6.4	594.7 \pm 7.8
Methyl linoleate (C18:2)	186.75 \pm 0.45	205.3 \pm 8.4	210.4 \pm 2.4
Methyl linolenate (C18:3)	79.07 \pm 0.20	87.4 \pm 2.7	87.1 \pm 1.6
CME-us			
Methyl palmitate (C16:0)	40.00 \pm 0.04	45.6 \pm 0.2	43.0 \pm 0.3
Methyl stearate (C18:0)	19.03 \pm 0.04	22.4 \pm 0.3	25.0 \pm 0.4
Methyl oleate (C18:1)	632.65 \pm 0.98	639.4 \pm 6.0	615.2 \pm 2.7
Methyl linoleate (C18:2)	171.82 \pm 1.11	202.5 \pm 9.1	194.3 \pm 2.0
Methyl linolenate (C18:3)	71.36 \pm 0.17	83.2 \pm 4.0	88.9 \pm 1.3
UME-es			
Methyl palmitate (C16:0)	376.4 \pm 8.1	374.7 \pm 2.0	370.7 \pm 0.3
Methyl stearate (C18:0)	45.8 \pm 0.6	47.2 \pm 0.7	40.89 \pm 0.01
Methyl oleate (C18:1)	362.6 \pm 4.5	368.5 \pm 5.9	362.8 \pm 0.3
Methyl linoleate (C18:2)	217.2 \pm 10.9	180.0 \pm 3.3	160.8 \pm 0.2
Methyl linolenate (C18:3)	25.5 \pm 2.1	17.1 \pm 0.5	11.10 \pm 0.03

Figure 1. Chromatogram of the FAMES mixture obtained after GC-FID (a) and GC-combustion-IRMS (b) using C17:0 as internal standard.

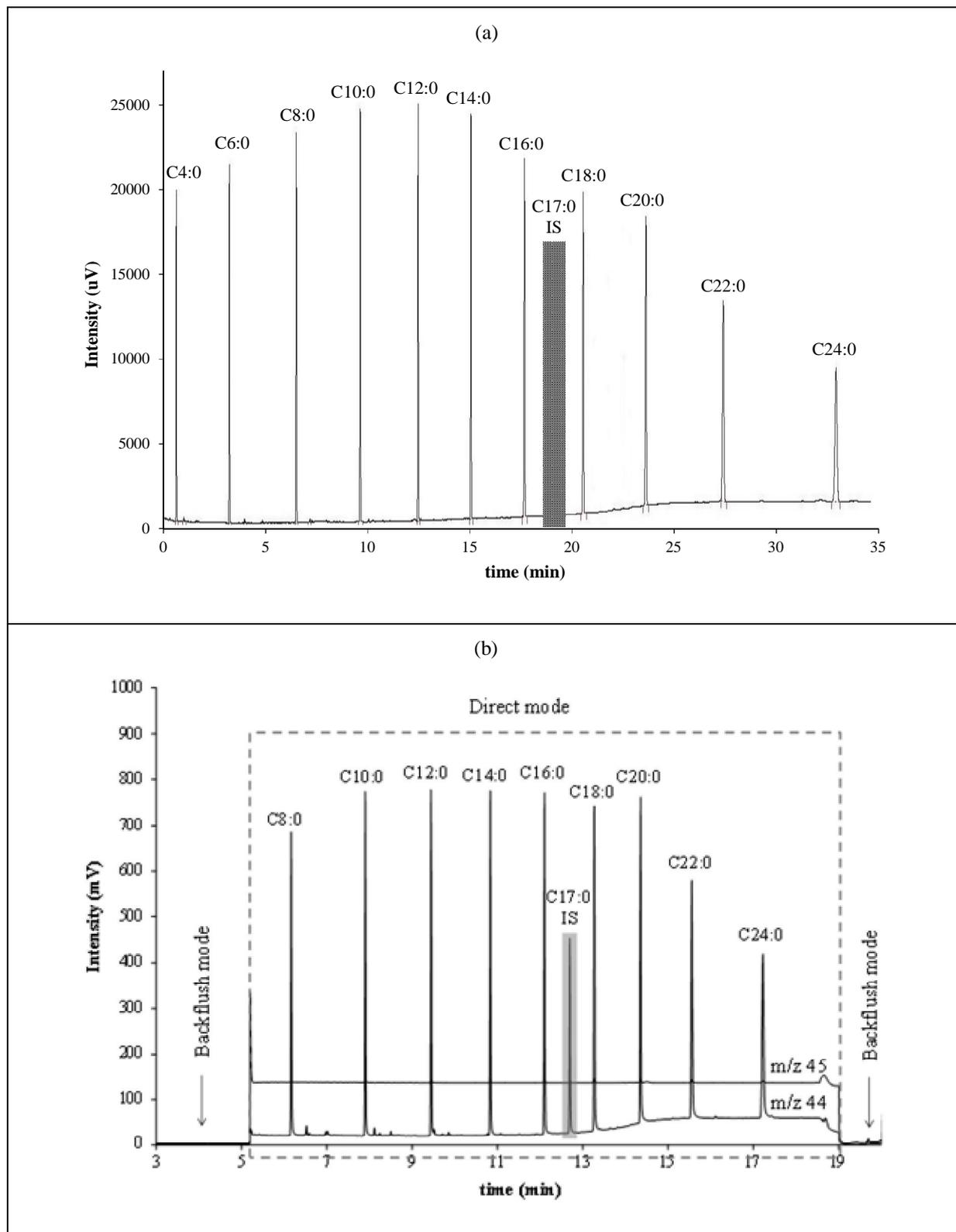


Figure 2. Comparison of recoveries, expressed in %, obtained after GC-FID (dark grey bars), GC-FID ECN (light grey bars) and GC-combustion-IRMS (white bars) in the determination of compounds typically present in vegetable-based biodiesel using C17:0 as internal standard. Uncertainty bars correspond to 1 standard deviation (n = 5).

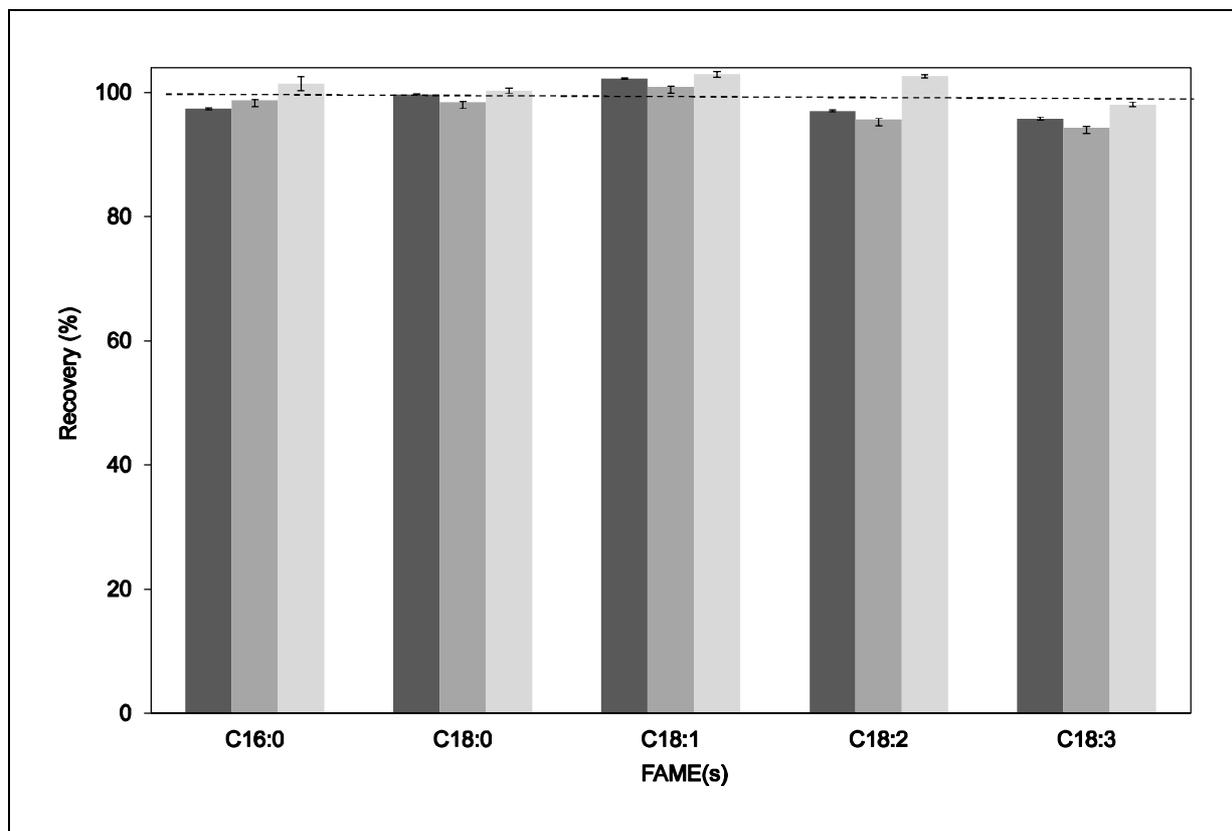
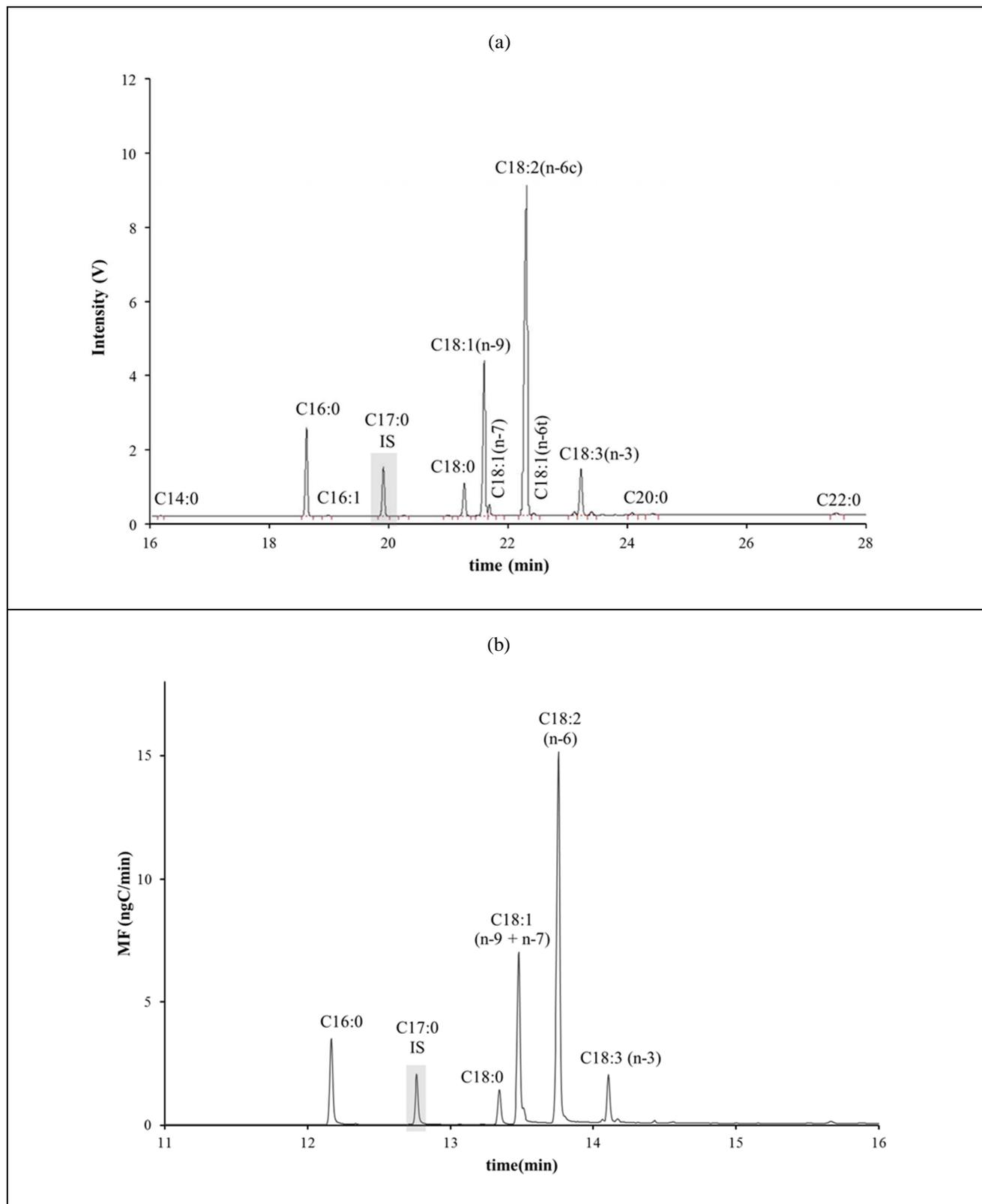


Figure 3. Chromatographic profile of FAMES in soy-based biodiesel SRM 2772 obtained after GC-FID (a) and GC-combustion-IRMS (b) analysis. C17:0 was added as internal standard.



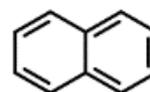
VII Anexo

VII.1 Anexo 1

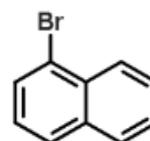
En el presente anexo se incluye información adicional de la composición de las mezclas estándar de PAHs, PCBs y benzotiofenos, utilizadas en la extensión del procedimiento de la dilución isotópica de carbono en línea a compuestos de alto peso molecular y con heteroátomos en su estructura.

*Tabla. A. 1. Estructura de los PAHs estudiados. Los acrónimos están incluidos entre paréntesis. *Compuestos considerados contaminantes prioritarios por la EPA.*

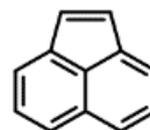
*1) Naftaleno (Na)



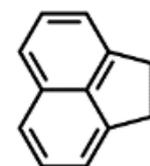
2) 2-Bromonaftaleno (BrNa)



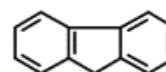
3) Acenaftileno (Ap)



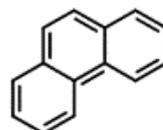
*4) Acenafteno (Ac)



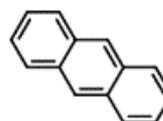
*5) Fluoreno (F)



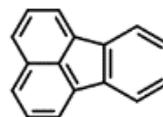
*6) Fenantreno (Pa)



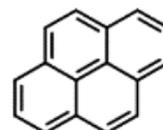
*7) Antraceno (A)



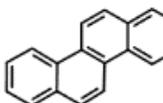
*8) Fluoranteno (Fl)



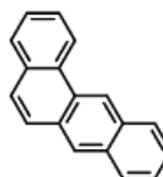
*9) Pireno (P)



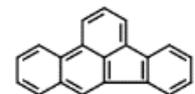
*10) Criseno (Ch)



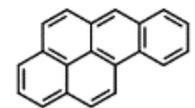
*11) Benzo(a)antraceno (BaA)



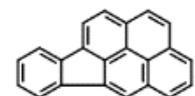
*12) Benzo(b)fluoranteno (BbF)



*13) Benzo(a)pireno (BaP)



*14) Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)



*15) Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)



*16) Dibenzo(a,h)antraceno (DBahA)

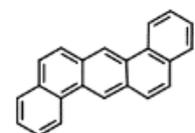
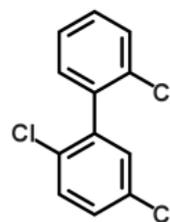
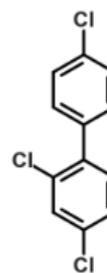


Tabla. A. 2. Estructura de los PCBs estudiados. Los acrónimos están incluidos entre paréntesis. *Indicadores de contaminación alimentaria por la EFSA. El resto son relevantes por su presencia en el medio ambiente y listados en la norma EN 61619.

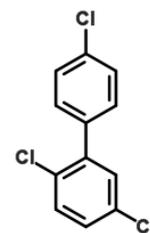
1) 2,2',5 - triclorobifenilo (PCB 18)



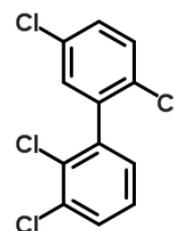
*2) 2,4,4' - triclorobifenilo (PCB 28)



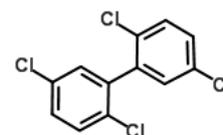
3) 2,4',5 - triclorobifenilo (PCB 31)



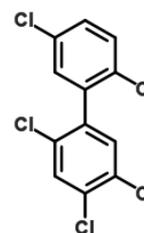
4) 2,2',3,5'- tetraclorobifenilo (PCB 44)



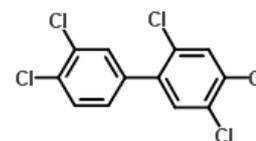
*5) 2,2',5,5'- tetraclorobifenilo (PCB 52)



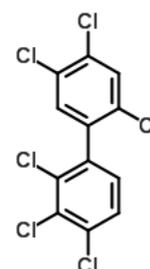
*6) 2,2',4,5,5'- pentaclorobifenilo (PCB 101)



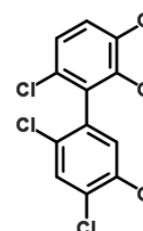
7) 2,3',4,4',5 - pentaclorobifenilo (PCB 118)



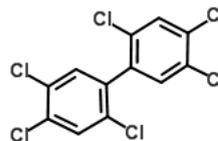
*8) 2,2',3,4,4',5'- hexaclorobifenilo (PCB 138)



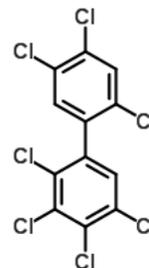
9) 2,2',3,4',5',6 - hexaclorobifenilo (PCB 149)



*10) 2,2',4,4',5,5' - hexaclorobifenilo
(PCB 153)



*11) 2,2',3,4,4',5,5' - heptaclorobifenilo
(PCB 180)



12) 2,2',3,3',4,4',5,5' - octaclorobifenilo
(PCB 194)

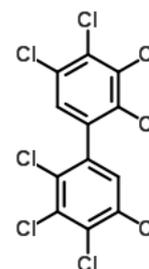
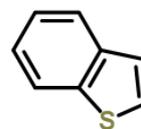
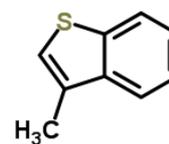


Tabla. A. 3. Estructura de los benzotiofenos estudiados. Los acrónimos están incluidos entre paréntesis.

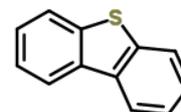
1) 1-Benzotiofeno (BT)



2) 3-metilbenzotiofeno (3-mBT)



3) Dibenzotiofeno (DBT)



VIII Bibliografía

- [1] M. J. T. Milton and T. J. Quinn, "Primary methods for the measurement of amount of substance," *Metrologia*, vol. 38, no. 4, pp. 289–296, 2001.
- [2] W. Prout, "On the relation between the specific gravities of bodies in their gaseous state and the weights of their atoms," *Ann. Philos.*, vol. 6, pp. 321–330, 1815.
- [3] F. W. Aston, "The Constitution of the Elements," *Nature*, p. 334, 1919.
- [4] F. W. Aston, "The constitution of atmospheric Neon," *Philos. Mag.*, vol. 39, pp. 449–455, 1920.
- [5] F. W. Aston, "A new mass spectrograph and the whole number rule," *Proc. R. Soc. London A*, vol. 115, p. 487, 1927.
- [6] J. J. Thomson, "Cathode Rays," *Philos. Mag. Ser. 5*, vol. 44, pp. 293–316, 1897.
- [7] J. J. Thomson, "Rays of positive electricity," *Philos. Mag. Ser. 6*, vol. 21, pp. 225–249, 1911.
- [8] J. J. Thomson, "Further experiments on positive rays," *Philos. Mag. Ser. 6*, vol. 24, pp. 209–253, 1912.
- [9] A. J. Dempster, "A new method of positive ray analysis," *Phys. Rev.*, vol. 11, pp. 316–324, 1918.
- [10] A. O. Nier, R. W. Thompson, and B. F. Murphey, "The isotopic constitution of lead and the measurement of geological time," *Phys. Rev.*, vol. 60, pp. 112–116, 1941.
- [11] A. O. Nier, "The isotopic constitution of uranium and the half-lives of the uranium isotopes. I," *Phys. Rev.*, vol. 55, no. 2, pp. 150–153, 1939.
- [12] A. O. Nier and E. Gulbransen, "Variations in the relative abundance of the Carbon isotopes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 61, pp. 697–698, 1939.
- [13] A. O. Nier and J. Bardeen, "The production of concentrated Carbon (13) by Thermal Diffusion," *J. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 9, p. 690, 1941.
- [14] A. O. Nier, E. T. Booth, J. R. Dunning, and A. V. Grosse, "Further experiments on fission of separated uranium isotopes," *Phys. Rev.*, vol. 57, p. 748, 1940.

- [15] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, and H. J. Svec, "Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements," *Anal. Chem.*, vol. 52, pp. 2283–2289, 1980.
- [16] K. G. Heumann, "Isotope Dilution Mass Spectrometry of inorganic and organic substances," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 325, pp. 661–666, 1986.
- [17] R. Schoenheimer, S. Ratner, and D. Rittenberg, "Studies in protein metabolism: The metabolic activity of body proteins investigated with L-leucine containing two isotopes," *J. Biol. Chem.*, vol. 130, pp. 653–664, 1939.
- [18] H. H. Ussing, "Analysis of protein by means of Deuterium-containing amino-acids," *Nature*, vol. 144, p. 977, 1939.
- [19] D. Rittenberg and G. L. Foster, "A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids," *J. Bio.*, vol. 133, pp. 737–744, 1940.
- [20] J. F. Pickup and K. McPherson, "Theoretical considerations in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry for organic analysis," *Anal. Chem.*, vol. 48, no. 13, pp. 1885–1890, 1976.
- [21] H. Hitenberger and M. L. Smith, "A survey of the use of stable isotopes in dilution analyses," in *Electromagnetically Enriched Isotopes and Mass Spectrometry*, London: Ed. Butterworths, 1956, p. 177.
- [22] J. A. Jonckheere and A. P. Leenheer, "Statistical evaluation of calibration curve nonlinearity in isotope dilution Gas Chromatography/ Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 6, pp. 153–155, 1983.
- [23] J. F. Sabot and H. Pinatel, "Calculation of the confidence range in order to obtain a linear calibration graph in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry: Application to reference methods and pharmacological studies," *Analys*, vol. 118, no. July, pp. 831–834, 1993.
- [24] D. Wade, "Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 117, no. 3, pp. 191–217, 1999.
- [25] A. Mechlińska, L. Wolska, and J. Namieśnik, "Isotope-labeled substances in the analysis of persistent organic pollutants in environmental samples,"

TrAC - Trends Anal. Chem., vol. 29, no. 8, pp. 820–831, 2010.

- [26] A. P. de Leenheer and L. M. Thienpont, “Applications of Isotope Dilution-Mass Spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 11, no. 4, pp. 249–307, 1992.
- [27] E. Ciccimaro and I. A. Blair, “Stable-isotope dilution LC – MS for quantitative biomarker analysis,” *Bioanalysis*, vol. 2, pp. 311–341, 2010.
- [28] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. De La Campa Fernández, J. Ruiz Encinar, and J. Bettmer, “Elemental Mass Spectrometry for quantitative proteomics,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, no. 1, pp. 3–16, 2008.
- [29] J. Bettmer, “Application of Isotope Dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 8, pp. 3495–3502, 2010.
- [30] S. E. Ong and M. Mann, “Mass Spectrometry-based proteomics turns quantitative,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 5, pp. 252–262, 2005.
- [31] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann, “Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 5, pp. 376–386, 2002.
- [32] A. N. Kettenbach, J. Rush, and S. A. Gerber, “Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 2, pp. 175–186, 2011.
- [33] R. Schaffer, G. N. Bowers, and R. S. Melville, “History of NIST’s contributions to development of standard reference materials and reference and definitive methods for clinical chemistry,” *Clin. Chem.*, vol. 41, no. 9, pp. 1306–1312, 1995.
- [34] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso, and A. Sanz-Medel, “Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 60, no. 2, pp. 151–207, 2005.
- [35] I. Papadakis, P. D. P. Taylor, and P. DeBievre, “Establishing an SI-traceable copper concentration in the candidate reference material MURST ISS A1 Antarctic sediment using isotope dilution applied as a primary method of measurement,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 12, no. 8, pp. 791–

- 796, 1997.
- [36] K. Inagaki, A. Takatsu, T. Kuroiwa, A. Nakama, S. Eyama, K. Chiba, and K. Okamoto, "Certified sediment reference materials for trace element analysis from the National Metrology Institute of Japan (NMIJ)," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 5, pp. 1271–1276, 2004.
- [37] L. Feng, L. Ma, J. Wang, and H. Lu, "Certification of reference materials for Cd, Cr, Hg and Pb in polypropylene," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, no. 8, pp. 3051–3057, 2010.
- [38] A. Henrion, "Reduction of systematic errors in quantitative analysis by Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS): an iterative method," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 350, no. 12, pp. 657–658, 1994.
- [39] L. G. Mackay, C. P. Taylor, R. B. Myers, R. Hearn, and B. King, "High accuracy analysis by isotope dilution mass spectrometry using an iterative exact matching technique," *Accreditation Qual. Assur.*, vol. 8, pp. 191–194, 2003.
- [40] J. Vogl and W. Pritzkow, "Isotope Dilution Mass Spectrometry—A primary method of measurement and its role for RM certification," *Mapan - J. Metrol. Soc. India*, vol. 25, no. 3, pp. 135–164, 2010.
- [41] B. Bouyssiere, J. Szpunar, and R. Lobinski, "Gas Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric detection in speciation analysis," *Spectrochim. Acta - Part B*, vol. 57, no. 5, pp. 805–828, 2002.
- [42] H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilgen, and R. D. Evans, "Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) in environmental samples using stable Hg²⁺ isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 358, no. 3, pp. 363–370, 1997.
- [43] N. Fabregat-Cabello, P. Rodríguez-González, A. Castillo, J. Malherbe, A. F. Roig-Navarro, S. E. Long, and J. I. García Alonso, "Fast and accurate procedure for the determination of Cr(VI) in solid samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 22, pp. 12542–12549, 2012.
- [44] P. Rodríguez-González, J. Ruiz Encinar, J. I. García Alonso, and A. Sanz-Medel, "Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by Isotope Dilution Mass

Spectrometry. Part I. Synthesis of the spike, characterisation and development of the mathematical equations,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, no. 6, pp. 685–691, 2004.

- [45] J. Szpunar, “Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics,” *Analyst*, vol. 130, no. 4, pp. 442–465, 2005.
- [46] A. González-Gago, J. M. Marchante Gayón, and J. I. García Alonso, “Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-ICP-MS using compound independent calibration with internal standard,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 22, no. 9, pp. 1138–1144, 2007.
- [47] A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar, and A. Sanz-Medel, “Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry,” *Angew. Chemie - Anal. Methods*, vol. 46, no. 4, pp. 569–571, 2007.
- [48] A. Lasztity, M. Viczian, X. Wang, and R. M. Barnes, “Sample analysis by on-line Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 4, no. 8, pp. 761–766, 1989.
- [49] L. Rottmann and K. G. Heumann, “Development of an Online Isotope-Dilution technique with Hplc ICP-MS for the accurate determination of elemental species,” *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 350, no. 4–5, pp. 221–227, 1994.
- [50] J. Giner Martínez-Sierra, F. Moreno Sanz, P. Herrero Espílez, R. Santamaria-Fernandez, J. M. Marchante Gayón, and J. I. García Alonso, “Evaluation of different analytical strategies for the quantification of sulfur-containing biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the characterisation of ³⁴S-labelled yeast,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 7, pp. 989–997, 2010.
- [51] J. Heilmann and K. G. Heumann, “Development of a Species-Unspecific Isotope Dilution GC – ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 6, pp. 1952–1961, 2008.
- [52] G. Koellensperger, S. Hann, J. Nurmi, T. Prohaska, and G. Stingeder, “Uncertainty of species unspecific quantification strategies in hyphenated ICP-MS analysis,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 18, no. 9, pp. 1047–1055,

- 2003.
- [53] J. Goossens, L. Moens, and R. Dams, "Determination of lead by flow-injection Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry comparing several calibration techniques," *Anal. Chim. Acta*, vol. 293, no. 1–2, pp. 171–181, 1994.
- [54] M. Parent, H. Vanhoe, L. Moens, and R. Dams, "Evaluation of a flow injection system combined with an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer with thermospray nebulization for the determination of trace levels of platinum," *Anal. Chim. Acta*, vol. 320, no. 1, pp. 1–10, 1996.
- [55] G. Centineo, J. A. Rodríguez-Castrillón, and E. Muñoz Agudo, "On-line isotope dilution analysis with the 7700 Series ICP-MS: Analysis of trace elements in high matrix samples," *Application Note - Agilent Technologies*, pp. 1–7, 2011.
- [56] M. F. Giné and A. P. Packer, "Online Isotope Dilution and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: From elemental to species quantification," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 21, no. 4, pp. 575–589, 2010.
- [57] P. Rodríguez-González and J. I. García Alonso, "Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 3, pp. 239–259, 2010.
- [58] M. Wang, W. Feng, W. Lu, B. Li, B. Wang, M. Zhu, Y. Wang, H. Yuan, Y. Zhao, and Z. Chai, "Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICPMS with a hexapole collision cell," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 23, pp. 9128–9134, 2007.
- [59] N. Zinn, R. Krüger, P. Leonhard, and J. Bettmer, "µIC coupled to ICP-SFMS with post-column Isotope Dilution analysis of sulfur for absolute protein quantification," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 2, pp. 537–543, 2008.
- [60] J. Vogl and K. G. Heumann, "Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique," *Fresenius J. Anal. Chem. Anal. Chem.*, vol. 359, no. 4–5, pp. 438–441, 1997.
- [61] J. Vogl and K. G. Heumann, "Development of an ICP-IDMS method for Dissolved Organic Carbon determinations and its application to chromatographic fractions of heavy metal complexes with humic

substances,” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 10, pp. 2038–2043, 1998.

- [62] D. Schaumlöffel, A. Prange, G. Marx, K. G. Heumann, and P. Brätter, “Characterization and quantification of metallothionein isoforms by Capillary Electrophoresis-Inductively Coupled Plasma-Isotope-Dilution Mass Spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 372, no. 1, pp. 155–163, 2002.
- [63] A. Rodríguez-Cea, M. Fernández de la Campa, E. Blanco González, B. Andón Fernández, and A. Sanz-Medel, “Metal speciation analysis in eel (*Anguilla anguilla*) metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 18, no. 11, pp. 1357–1364, 2003.
- [64] F. Cuyckens, L. I. L. Balcaen, K. De Wolf, B. De Samber, C. Van Looveren, R. Hurkmans, and F. Vanhaecke, “Use of the bromine isotope ratio in HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, no. 7, pp. 1717–1729, 2008.
- [65] B. Meermann, M. Bockx, A. Laenen, C. Van Looveren, F. Cuyckens, and F. Vanhaecke, “Speciation analysis of bromine-containing drug metabolites in feces samples from a human in vivo study by means of HPLC/ICP-MS combined with on-line isotope dilution,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 1, pp. 439–448, 2012.
- [66] I. Gelaude, R. Dams, M. Resano, F. Vanhaecke, and L. Moens, “Direct determination of methylmercury and inorganic mercury in biological materials by solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 15, pp. 3833–3842, 2002.
- [67] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, and J. I. García Alonso, “A quantitative universal detection system for organic compounds in Gas Chromatography with isotopically enriched $^{13}\text{CO}_2$,” *Angew. Chemie - Anal.*, vol. 48, no. 14, pp. 2561–2564, 2009.
- [68] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, and J. I. García Alonso, “Towards compound-independent calibration for organic compounds using online Isotope Dilution Mass Spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 1, pp. 91–97, 2012.
- [69] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-medel, and J. I. García Alonso, “Liquid Chromatography, Chemical Oxidation, and Online Carbon Isotope

- Dilution Mass Spectrometry as a universal quantification system for nonvolatile organic compounds,” *Anal. c*, vol. 85, pp. 1873–1879, 2013.
- [70] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, and J. I. García Alonso, “Evaluation of online Carbon Isotope Dilution Mass Spectrometry for the purity assessment of synthetic peptide standards,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 844, pp. 48–53, 2014.
- [71] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, and J. I. García Alonso, “Gas Chromatography-Combustion-Mass Spectrometry with postcolumn Isotope Dilution for compound-independent quantification: Its potential to assess hs-spme procedures,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 16, pp. 6862–6869, 2010.
- [72] P. Rodríguez-González and J. I. García Alonso, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013.
- [73] H. J. Stan and H. M. Müller, “Evaluation of automated and manual hot-splitless, cold-splitless (PTV), and on-column injection technique using capillary Gas Chromatography for the analysis of organophosphorus pesticides,” *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 140–143, 1988.
- [74] T. B. Hofstetter, “Maik A. Jochmann and Torsten C. Schmidt: Compound-specific stable isotope analysis,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 9, pp. 2753–2754, 2013.
- [75] R. F. Dias and K. H. Freeman, “Carbon isotope analyses of semivolatile organic compounds in aqueous media using Solid-Phase Microextraction and Isotope Ratio Monitoring GC/MS.,” *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 5, pp. 944–50, 1997.
- [76] L. Zwank, M. Berg, T. C. Schmidt, and S. B. Haderlein, “Compound-Specific Carbon Isotope Analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 20, pp. 5575–5583, 2003.
- [77] M. P. Ricci, D. A. Merritt, K. H. Freeman, and J. M. Hayes, “Acquisition and processing of data for Isotope-Ratio-Monitoring Mass Spectrometry,” *Org. Geochem.*, vol. 21, no. 6–7, pp. 561–571, 1994.
- [78] K. J. Goodman and J. T. Brenna, “High-precision gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry at low signal levels,” *J.*

Chromatogr. A, vol. 689, no. 1, pp. 63–68, 1995.

- [79] L. Ellis and A. L. Fincannon, “Analytical improvements in irm-GC/MS analyses: Advanced techniques in tube furnace design and sample preparation,” *Org. Geochem.*, vol. 29, no. 5–7, pp. 1101–1117, 1998.
- [80] Y. Horii, K. Kannan, G. Petrick, T. Gamo, J. Falandysz, and N. Yamashita, “Congener-specific carbon isotopic analysis of technical PCB and PCN mixtures using two-dimensional Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 11, pp. 4206–4212, 2005.
- [81] H. J. Tobias, Y. Zhang, R. J. Auchus, and J. T. Brenna, “Detection of synthetic testosterone use by novel comprehensive two-dimensional Gas Chromatography Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 18, pp. 7158–7165, 2011.
- [82] H. J. Tobias, G. L. Sacks, Y. Zhang, and J. T. Brenna, “Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 22, pp. 8613–8621, 2008.
- [83] W. Meier-Augenstein, “Stable isotope analysis of fatty acids by Gas Chromatography- Isotope Ratio Mass Spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 465, no. 1–2, pp. 63–79, 2002.
- [84] M. Kirchner, E. Matisová, M. Dömötöröová, and J. De Zeeuw, “Practical aspects of splitless injection of semivolatiles compounds in fast Gas Chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1055, no. 1–2, pp. 159–168, 2004.
- [85] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, and D. Prada-Rodríguez, “A multivariate study of the Programmed Temperature Vaporization injection-Gas Chromatographic-Mass Spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. Application to marine sediments analysis,” *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1096–1103, 2008.
- [86] K. Dettmer-Wilde and W. Engewald, *Practical Gas Chromatography. A comprehensive reference*. Springer, 2014.
- [87] G. Li, D. Wu, W. Xie, X. Zhang, and B. Liu, “Evaluation of compound-independent calibration using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection,” *Talanta*, vol. 95, pp. 36–41, 2012.

- [88] D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, and A. Prange, “Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, no. 5, pp. 623–631, 2004.
- [89] H. Bruderreck, W. Schneider, and I. Halász, “Quantitative Gas Chromatographic analysis of hydrocarbons with capillary column and Flame Ionization Detector,” *Anal. Chem.*, vol. 36, no. 3, pp. 461–473, 1964.
- [90] J. Y. De Saint Laumer, S. Leocata, E. Tissot, L. Baroux, D. M. Kampf, P. Merle, A. Boschung, M. Seyfried, and A. Chaintreau, “Prediction of response factors for gas chromatography with flame ionization detection: Algorithm improvement, extension to silylated compounds, and application to the quantification of metabolites,” *J. Sep. Sci.*, vol. 38, no. 18, pp. 3209–3217, 2015.
- [91] I. G. McWilliam and R. A. Dewar, “Flame Ionization Detector for Gas Chromatography,” *Nature*, vol. 181, pp. 760–760, 1958.
- [92] K. Schofield, “The enigmatic mechanism of the flame ionization detector: Its overlooked implications for fossil fuel combustion modeling,” *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 34, no. 3, pp. 330–350, 2008.
- [93] J. T. Scanlon, “Calculation of Flame Ionization Detector Relative Response Factors Using the Effective Carbon Number Concept,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 23, pp. 333–340, 1985.
- [94] F. W. Jones, “Estimation of Flame-ionization Detector Relative Response Factors for Oligomers of Alkyl and Aryl Ether Polyethoxylates using the Effective Carbon Number Concept,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 36, no. May, pp. 223–226, 1998.
- [95] M. Mattsson and G. Petersson, “Reference GLC data for the analysis of phenolic compounds as trimethylsilyl derivatives,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 546–554, 1977.
- [96] M. R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, and K. M. Van Geem, “Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1257, pp. 131–140, 2012.
- [97] G. Musumarra, D. Pisano, A. R. Katritzky, A. R. Lapucha, F. J. Luxem, R.

- Murugan, M. Siskin, and G. Brons, "Prediction of gas chromatographic response factors by the PLS method," *Tetrahedron Comput. Methodol.*, vol. 2, no. 1, pp. 17–36, 1989.
- [98] W. A. Dietz, "Response Factors for Gas Chromatographic Analyses," *J. Gas Chromatogr.*, vol. 5, no. 2, pp. 68–71, 1967.
- [99] J. Y. De Saint Laumer, E. Cicchetti, P. Merle, J. Egger, and A. Chaintreau, "Quantification in gas chromatography: Prediction of flame ionization detector response factors from combustion enthalpies and molecular structures," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 15, pp. 6457–6462, 2010.
- [100] E. Tissot, S. Rochat, C. Debonneville, and A. Chaintreau, "Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors," *Flavour Fragr. J.*, vol. 27, no. 4, pp. 290–296, 2012.
- [101] L. Wu, Y. Wu, H. Shen, P. Gong, L. Cao, G. Wang, and H. Hao, "Quantitative structure-ion intensity relationship strategy to the prediction of absolute levels without authentic standards," *Anal. Chim. Acta*, vol. 794, pp. 67–75, 2013.
- [102] E. S. Chernetsova, A. I. Revelskii, D. Durst, and I. A. Revelskii, "Determination of the elemental composition of hydrocarbon mixtures by gas chromatography with atomic emission detection: increasing the accuracy," *J. Anal. Chem.*, vol. 60, no. 9, pp. 855–859, 2005.
- [103] L. C. Meher, D. Vidya Sagar, and S. N. Naik, "Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 10, no. 3, pp. 248–268, 2006.
- [104] O. S. Tyagi, N. Atray, B. Kumar, and A. Datta, "Production, characterization and development of standards for biodiesel - A review," *Mapan - J. Metrol. Soc. India*, vol. 25, no. 3, pp. 197–218, 2010.
- [105] S. K. Hoekman, A. Gertler, A. Broch, and C. Robbins, "Investigation of biodistillates as potential blendstocks for transportation fuels," 2009.
- [106] Emerging Markets Online, "Biodiesel 2020: Global Market Survey, Feedstock Trends and Market Forecasts." pp. 5–10, 2006.
- [107] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, 2010.

