

18.504

Autor:

JESUS VILLEN ALTAMIRANO



\* 5 3 0 9 5 6 4 5 2 6 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

USO DEL VAPORIZADOR CON TEMPERATURA PROGRAMADA (PTV)  
PARA LA INTRODUCCION DIRECTA DE ELEVADOS VOLUMENES  
DE MUESTRA EN CROMATOGRAFIA DE GASES.  
APLICACION AL ANALISIS DE ALIMENTOS.

Directores:

Marta Herraiz Carasa

Guillermo Reglero Rada

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica

1.993

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- A los Dres. D<sup>a</sup> Marta Herraiz Carasa y D. Guillermo Reglero Rada, Investigadores Científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por su constante dedicación, sus consejos y su eficaz dirección que han hecho posible la realización de esta Memoria.

- Al Dr. D. Luis M<sup>a</sup>. Polo Díez, Catedrático de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser Tutor de esta Tesis.

- Al Dr. D. Javier Tabera Galván por el apoyo y orientación prestados a lo largo de la realización de este trabajo, especialmente en los Diseños de Experiencias.

- A D. Francisco Javier Señoráns Rodríguez por su inestimable ayuda.

- A los compañeros de laboratorio del Instituto de Fermentaciones Industriales, Dr. D. Tomás Herraiz Tomico, D<sup>a</sup> Graciela P. Blanch Manzano y D<sup>a</sup> Elena Ibáñez Ezequiel, que siempre me han animado y ayudado.

- A D. Jose M<sup>a</sup> Campos Molina, D. Sebastián Campos Molina y D. José Martín Mao, del Centro Nacional de Química Orgánica, por la construcción del dispositivo para la introducción de muestra a velocidad controlada.

- A todos los miembros del Instituto de Fermentaciones Industriales por las facilidades y la colaboración que me han prestado, especialmente a los Dres. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Carmen Polo Sánchez, Directora del Instituto, D. Guillermo Santa-María Blanco y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Cabezudo Ibáñez.

- A los Dres. D. Francisco Montero Riquelme y D. Antonio del Cerro Barja, Directores de la Escuela Universitaria Politécnica de Albacete y del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal por haberme facilitado la realización de este trabajo.

A Ana, a Rocío, a Javier

## INDICE

	Página
<b>PRESENTACION</b> . . . . .	1
<b>1. INTRODUCCION</b> . . . . .	9
<b>1.1. TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACION DE   COMPUESTOS VOLATILES</b> . . . . .	10
1.1.1. Destilación . . . . .	12
1.1.2. Técnicas de muestreo en fase vapor (Análisis del Espacio de Cabeza) . . . . .	15
1.1.2.1. Espacio de Cabeza Estático . . . . .	18
1.1.2.2. Espacio de Cabeza Dinámico . . . . .	20
1.1.3. Extracción con Fluidos Supercríticos . . . . .	24
1.1.4. Extracción con Disolventes Orgánicos . . . . .	27
1.1.5. Destilación y Extracción Simultáneas . . . . .	34
<b>1.2. INTRODUCCION DE MUESTRA EN COLUMNAS CAPILARES</b> . . . . .	37
1.2.1. Técnicas de introducción sin eliminación selectiva de disolvente . . . . .	39
1.2.1.1. Inyector "Split-Splitless" . . . . .	39
1.2.1.2. Inyección directa en la columna ("On-Column") . . . . .	43
1.2.2. Técnicas de introducción con eliminación selectiva de disolvente . . . . .	47
1.2.2.1. Eliminación de disolvente en inyección "Splitless" . . . . .	47
1.2.2.2. Inyección en frío con programación de temperatura. Inyector PTV . . . . .	48
<b>1.3. AISLAMIENTO Y CONCENTRACION INTERNAS EN EL   CROMATOGRAFO DE GASES</b> . . . . .	54
1.3.1. Características generales del proceso de adsorción . . . . .	55
1.3.2. Materiales utilizados como adsorbentes . . . . .	57
1.3.2.1. Carbón activo . . . . .	58
1.3.2.2. Polímeros porosos . . . . .	59
1.3.3. Estado actual de las técnicas de aislamiento y concentración internas con PTV . . . . .	63

1.4. OPTIMIZACION DE PROCESOS MEDIANTE TECNICAS ESTADISTICAS	
DE DISEÑO EXPERIMENTAL . . . . .	65
1.4.1. Método de Superficie de Respuesta . . . . .	66
1.4.2. Método de Optimización Autodirigida . . . . .	74
1.5. ANALISIS DEL AROMA DE BEBIDAS ALCOHOLICAS . . . . .	82
1.5.1. Componentes del aroma del vino . . . . .	83
1.5.2. Componentes del aroma del pisco . . . . .	84
2. MATERIALES Y METODOS . . . . .	85
2.1. MUESTRAS . . . . .	89
2.1.1. Disoluciones modelo . . . . .	89
2.1.2. Muestras reales . . . . .	92
2.2. TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACION EXTERNAS . . . . .	93
2.2.1. Extracción Líquido-Líquido . . . . .	93
2.2.2. Destilación y Extracción Simultáneas . . . . .	94
2.3. CROMATOGRAFIA DE GASES . . . . .	95
2.3.1. Equipo . . . . .	95
2.3.2. Condiciones de introducción de la muestra . . . . .	99
2.3.2.1. Inyecciones en frío con o sin división de flujo . . . . .	99
2.3.2.2. Concentración interna de los extractos líquido-líquido . . . . .	101
2.3.2.3. Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV . . . . .	102
2.3.2.4. Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV . . . . .	105
2.3.2.5. Dispositivo para la introducción de muestra a velocidad controlada . . . . .	105
2.3.2.6. Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa . . . . .	116
2.3.3. Condiciones cromatográficas . . . . .	116
2.4. ESPECTROMETRIA DE MASAS . . . . .	118
2.4.1. Equipo . . . . .	118
2.4.2. Identificación . . . . .	118

3. RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	119
3.1. EVALUACION DEL PROCESO DE CONCENTRACION INTERNA	
EN UN PTV . . . . .	120
3.1.1. Precisión . . . . .	121
3.1.2. Exactitud . . . . .	124
3.1.3. Influencia en la separación cromatográfica . . . . .	127
3.2. ESTUDIO DE VARIABLES QUE AFECTAN A LA EXTRACCION	
Y CONCENTRACION INTERNAS CON PTV. . . . .	132
3.2.1. Diseño compuesto central y rotativo . . . . .	132
3.2.2. Curvas de isorrespuesta . . . . .	140
3.2.3. Comportamiento individual de solutos de	
distintas características . . . . .	150
3.3. OPTIMIZACION DE LAS PRINCIPALES VARIABLES QUE AFECTAN	
A LA EXTRACCION Y CONCENTRACION INTERNAS CON PTV . . . . .	167
3.3.1. Planteamiento de la optimización . . . . .	167
3.3.2. Desarrollo de la optimización . . . . .	169
3.4. ANALISIS DE COMPONENTES MINORITARIOS DEL AROMA DE	
BEBIDAS ALCOHOLICAS DE DISTINTA GRADUACION POR	
INYECCION DIRECTA . . . . .	200
3.4.1. Recuperación . . . . .	201
3.4.2. Precisión . . . . .	233
4. CONCLUSIONES . . . . .	255
BIBLIOGRAFIA . . . . .	260

## PRESENTACION

En los últimos años el análisis de compuestos volátiles orgánicos ha experimentado un espectacular avance. El aumento del interés por este tipo de compuestos junto con el desarrollo alcanzado por la instrumentación analítica han sido los mecanismos impulsores de tal avance.

Las sustancias volátiles forman una parte esencial de nuestro entorno. Son abundantes en la naturaleza y están presentes en la práctica totalidad de los materiales con los que tenemos contacto a diario, siendo responsables de algunas de sus más destacadas características.

Numerosos procesos industriales se controlan mediante determinaciones de compuestos volátiles en las materias primas y muestras intermedias. Posteriormente, en los productos terminados, la composición de su fracción volátil es a menudo utilizada como índice de calidad.

El estudio de compuestos volátiles implicados en áreas tan importantes como la Contaminación Ambiental, la Medicina y la Ciencia y Tecnología de Alimentos, ha constituido la

base de importantes aportaciones de la Investigación a la Salud y la Economía.

En Ciencia y Tecnología de Alimentos, la composición volátil tiene una gran importancia. El aroma es una de las principales características de los alimentos y de él depende en muchas ocasiones su aceptación o rechazo por parte de los consumidores. Además, muchos compuestos de interés en Toxicología Alimentaria son volátiles.

En general, la composición volátil de cualquier alimento constituye una fracción compleja, desde el punto de vista analítico, ya que suele estar integrada por un elevado número de compuestos de diferente naturaleza química, presentes en concentraciones muy diferentes entre sí. Es por ello que significativos desarrollos de algunos aspectos de la Química Analítica han tenido su origen en la necesidad de aislar, concentrar, separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles de un alimento o de una bebida. Y, por el contrario, la validez de nuevos desarrollos analíticos es frecuentemente comprobada mediante la aplicación al análisis de estas muestras. En este sentido, el aroma de bebidas alcohólicas ha servido en numerosas ocasiones como muestra de referencia.

La tecnología relacionada con el análisis de sustancias volátiles es muy amplia. La mayor diversidad de técnicas corresponde a la etapa de preparación de la muestra, ya que generalmente se admite que la Cromatografía de Gases es el procedimiento más potente para la separación y cuantificación, mientras que la Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y, sobre todo, la Espectrometría de Masas acopladas a la Cromatografía de Gases, monopolizan las técnicas de elucidación estructural. Por tanto, la decisión más comprometida que debe tomar el químico analítico cuando se enfrenta a un análisis de volátiles se refiere a la técnica de aislamiento y concentración a aplicar.

Es bien conocido que ningún método de extracción es universal. Además, la fiabilidad de los resultados cuantitativos está fuertemente condicionada por la correcta elección y desarrollo de la técnica. Por ello, son muchos los esfuerzos que se han realizado para mejorar los procedimientos de extracción de compuestos volátiles, tratando de minimizar el manejo de las muestras, acortando el tiempo de operación y reduciendo al mínimo el empleo de disolventes orgánicos nocivos para el medio ambiente. Técnicas como la Extracción con Fluidos Supercríticos, la Destilación y Extracción Simultáneas y el Análisis de fase vapor (Espacio de Cabeza, "Purge and Trap"..) han alcanzado gran desarrollo y son muy utilizadas en la actualidad junto

con procedimientos clásicos como la Destilación y la Extracción con disolventes orgánicos.

En cualquier caso, no cabe duda del interés que la eliminación de la etapa de preparación de la muestra, ineludible hasta ahora como fase previa al análisis cromatográfico propiamente dicho, tendría en relación a la fiabilidad y rapidez de la metódica aplicada. En este punto, la posibilidad de realizar lo que se podría denominar **aislamiento y concentración internas de la muestra en el propio cromatógrafo de gases**, se revela como una alternativa especialmente atractiva aunque, evidentemente, muy problemática. Este último aspecto se refiere fundamentalmente a la necesidad de inyectar volúmenes elevados de muestra y al consiguiente ensanchamiento de la banda cromatográfica en la que, en estas circunstancias, se depositarían los solutos de interés al principio de la columna. La negativa influencia de la anchura inicial de banda en el ensanchamiento observado en los picos eluidos y, en consecuencia, en la eficacia y resolución alcanzables en el análisis cromatográfico, justifica la dificultad antes comentada.

## OBJETIVO DEL TRABAJO

El presente trabajo ha consistido en el estudio de un procedimiento de introducción directa de elevados volúmenes de muestras hidroalcohólicas en Cromatografía de Gases con columnas capilares, mediante el empleo del inyector denominado Vaporizador con Temperatura Programada (PTV) operando con eliminación del disolvente. El principal objetivo de la investigación realizada es contribuir al desarrollo de la metodología de análisis de compuestos volátiles en muy baja concentración (trazas) sin tratamiento de la muestra previo a la inyección.

Se ha llevado a cabo la optimización de las principales variables que intervienen en el proceso de eliminación del disolvente o componente mayoritario de la muestra y se ha comprobado la validez de la técnica mediante su aplicación al análisis de bebidas con distinto grado alcohólico, comparando posteriormente los resultados con los obtenidos mediante dos técnicas clásicas: la extracción con disolventes orgánicos y la Destilación y Extracción Simultáneas.

## ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La presente Memoria se ha estructurado siguiendo las pautas utilizadas habitualmente para la publicación de trabajos científicos.

En la **INTRODUCCION** se revisa el estado actual de las técnicas de aislamiento y concentración más utilizadas para el análisis de compuestos volátiles, haciendo especial hincapié en aquellas con las que se ha comparado el método estudiado y en las que poseen aspectos de interés para el desarrollo de métodos de **introducción directa de elevados volúmenes de muestra** en Cromatografía de Gases con columnas capilares. Asimismo se discuten los antecedentes de las técnicas de aislamiento y concentración internas en el propio cromatógrafo de gases. También se recogen los fundamentos de los procedimientos de Diseño Experimental utilizados y se resumen las características analíticas de las bebidas alcohólicas, como muestras a las que se aplicará, en primera instancia, el método analítico desarrollado en el presente trabajo.

El apartado **MATERIALES Y METODOS** recoge los detalles de la experimentación llevada a cabo, incluyendo una breve exposición de la Metodología de Diseño de Experiencias utilizada.

La exposición de los RESULTADOS, así como la DISCUSION de los mismos se ha dividido en cuatro bloques:

- 1.- Evaluación del proceso de concentración interna en un PTV.
- 2.- Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.
- 3.- Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.
- 4.- Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa.

Por último, se presentan las CONCLUSIONES del trabajo y la BIBLIOGRAFIA más relevante relacionada con el tema.

## UTILIZACION DE TERMINOS EN INGLES

Desde hace algunos años existe en la comunidad científica española un marcado interés por encontrar denominaciones en español para los términos originales en inglés habitualmente empleados en la literatura científica internacional. En la presente Memoria se utiliza el inglés exclusivamente para denominar técnicas cromatográficas o indicar conceptos técnicos cuyo nombre en español no está aún generalmente implantado, por lo que su empleo podría dar lugar a confusión. En cualquier caso, se han considerado los trabajos que sobre nomenclatura cromatográfica se han publicado recientemente en revistas españolas especializadas (Cabezudo, 1.984 y 1.990, Martínez y Sanz, 1.991, Reglero e Ibáñez, 1.992, Marina y Vera, 1.992).

# 1. INTRODUCCION

### 1.1. TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACION DE COMPUESTOS VOLATILES.

El análisis por Cromatografía de Gases de los componentes volátiles de alimentos, matrices biológicas, muestras medio ambientales, etc., requiere habitualmente una etapa previa de aislamiento y concentración. Frecuentemente la muestra contiene, además de compuestos volátiles, otras sustancias cuyo análisis no se precisa y que, por otro lado, pueden crear interferencias con los solutos de interés o depositarse en la porción inicial de la columna provocando en último término su deterioro. Otros componentes pueden quedar adsorbidos en distintas zonas del sistema cromatográfico y degradarse lentamente dando lugar a ruido de fondo o a la formación de artefactos.

Un aspecto especialmente importante es que en la mayoría de las ocasiones los compuestos volátiles se encuentran en concentraciones inferiores al límite de sensibilidad del sistema cromatográfico, lo que descarta la inyección directa de la muestra y supone, por tanto, la pérdida de las innegables ventajas que ello aporta.

Las técnicas de aislamiento y concentración suelen ocasionar alteraciones cualitativas y cuantitativas que afectan a la información que se obtiene sobre la composición de la muestra (Jennings y Rapp, 1.983). Los errores cuantitativos tienen su origen generalmente en la selectividad de los métodos, pero, si la repetibilidad es buena, pueden corregirse mediante una adecuada calibración. Es de la máxima importancia, sin embargo, evitar los cambios cualitativos que desvirtúan la información y ocasionan además errores cuantitativos (Jennings y Filsoof, 1.977, Maarse y Belz, 1.985).

En análisis de alimentos, las alteraciones cualitativas más comunes tienen los siguientes orígenes:

- Actividad enzimática: La rotura de las paredes celulares o de las estructuras intracelulares, permite que los enzimas accedan a sustratos de los que normalmente están separados.

- Degradación térmica: Se observa en aquellos casos en los que la muestra contiene solutos termolábiles y el método de extracción implica su calentamiento excesivo.

- Reacción de Maillard: Se produce cuando la muestra contiene carbohidratos y proteínas o aminoácidos y se somete a calentamiento durante tiempo prolongado.

La presencia de oxígeno potencia los citados procesos

(Jeon y col., 1.976). Además, la adición de antiespumantes junto con las impurezas de los materiales utilizados en la extracción alteran también la composición de la muestra por contaminación (Karasek y col., 1.981).

A continuación se revisan las técnicas de aislamiento y concentración aptas para el análisis de compuestos volátiles más frecuentemente utilizadas, poniendo de manifiesto sus ventajas e inconvenientes, así como la información que se puede obtener con cada una de ellas.

#### 1.1.1. Destilación.

La efectividad de la destilación, como técnica de aislamiento, depende de las propiedades físicas de los componentes de la mezcla, de las características de la matriz, del equipo y de la técnica empleados (Maarse y Belz, 1.985).

En general, la destilación se lleva a cabo asociada a un proceso de concentración debido a que en el destilado los compuestos volátiles suelen estar diluidos (Jennings, 1.980). La concentración de la muestra exige el empleo de técnicas de adsorción, congelación o extracción (Welch y col., 1.982, Takeoka y col., 1.988). Peters (1.980) diseñó un sistema (Figura 1), que permite la destilación y concentración al

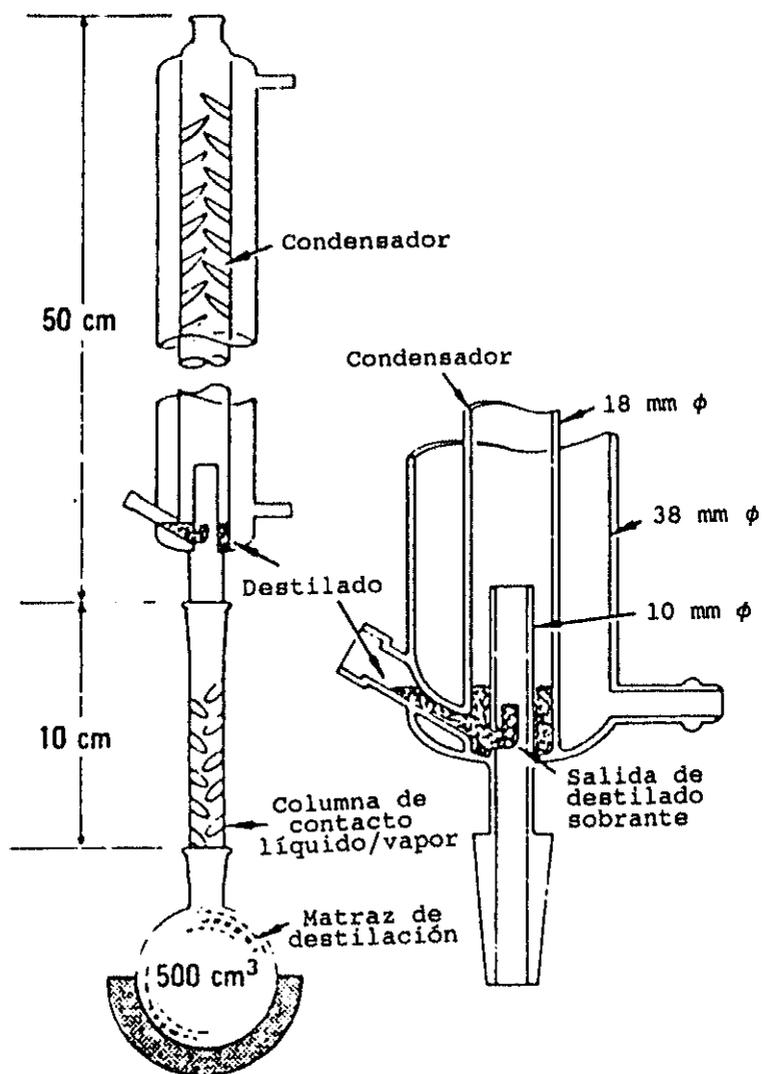


Figura 1. Sistema de destilación-concentración diseñado por Peters (1.980).

mismo tiempo, y es aplicable a muestras acuosas y solutos orgánicos polares. El destilado se recoge en la parte superior y después de alcanzar un determinado volumen, revierte al matraz en el que se calienta la muestra. Los vapores ascendentes redestilan el líquido descendente posibilitando un nuevo desplazamiento hacia la fase gaseosa de los compuestos más volátiles. La concentración es mayor y más rápida para los solutos que forman azeótropos con el agua. Mediante este procedimiento, se pueden obtener unos factores de concentración de hasta 300 ó 400 en un tiempo inferior a 1 hora.

Para las muestras estables térmicamente se emplea la destilación a presión atmosférica. Sin embargo, esta técnica es inservible cuando la muestra es sensible a la temperatura. Pickett y col. (1.975) observaron que la pérdida de algunos compuestos terpénicos en la destilación a presión atmosférica era de hasta el 90%, y que dicha degradación daba lugar a nuevos terpenos. Si la destilación se realiza a presión reducida, el riesgo de formación de artefactos y de descomposición de compuestos termolábiles es menor, pero entonces se requiere un cuidadoso control del proceso (Jeon y col., 1.976).

Una importante ventaja de la destilación es que en los concentrados obtenidos no se encuentran compuestos no

volátiles, lo que facilita el posterior análisis por Cromatografía de Gases. Sin embargo, la composición del destilado no siempre refleja la original de la muestra.

1.1.2. Técnicas de muestreo en fase vapor (Análisis del Espacio de Cabeza).

Son técnicas de muestreo selectivo de compuestos volátiles muy extendidas en campos como la Contaminación Ambiental y la Ciencia y Tecnología de Alimentos. En los últimos años han surgido distintas versiones y se ha desarrollado y comercializado instrumentación específicamente diseñada para su aplicación.

Las técnicas de análisis de la fase vapor emitida por una muestra se designan comúnmente de Espacio de Cabeza. Esta denominación, que no es estrictamente correcta, se ha asumido ya de forma generalizada en la literatura científica internacional.

Desde un punto de vista más riguroso (Maarse y Belz, 1.985) se define el Espacio de Cabeza como la fase vapor que, desprendida de una muestra sólida o líquida, se encuentra en equilibrio con la misma en un recinto termostatzado y cerrado. Según esto, el análisis del espacio de cabeza implicaría exclusivamente la toma de una muestra única sin

reemplazar el vapor evacuado. Sin embargo, es habitual agrupar con la denominación de Espacio de Cabeza a algunas técnicas que llevan a cabo la toma continuada de muestra, con pérdida del equilibrio y en las que existe reemplazamiento del vapor.

Las técnicas de análisis de la fase vapor pueden ser clasificadas de la siguiente forma (Figura 2) (Núñez y col., 1.984b):

- Espacio de Cabeza Directo o Estático (Figura 2a): Se extrae una fracción del vapor en equilibrio con la muestra mantenida en un recipiente cerrado y estabilizado.

- Concentración del Espacio de Cabeza o Espacio de Cabeza Dinámico: Se utiliza una corriente de gas que circula sobre la superficie de la muestra, sólida o líquida, barriendo ("sweeping") la fase vapor en contacto con la misma (Figura 2b). Dentro de las técnicas denominadas de Espacio de Cabeza Dinámico, se suele incluir también la modalidad en la que la corriente del gas de arrastre circula a través de la muestra líquida (Figura 2c) purgando los compuestos volátiles ("purging").

Tanto la técnica de barrido como la de purga requieren una posterior concentración de los compuestos arrastrados.

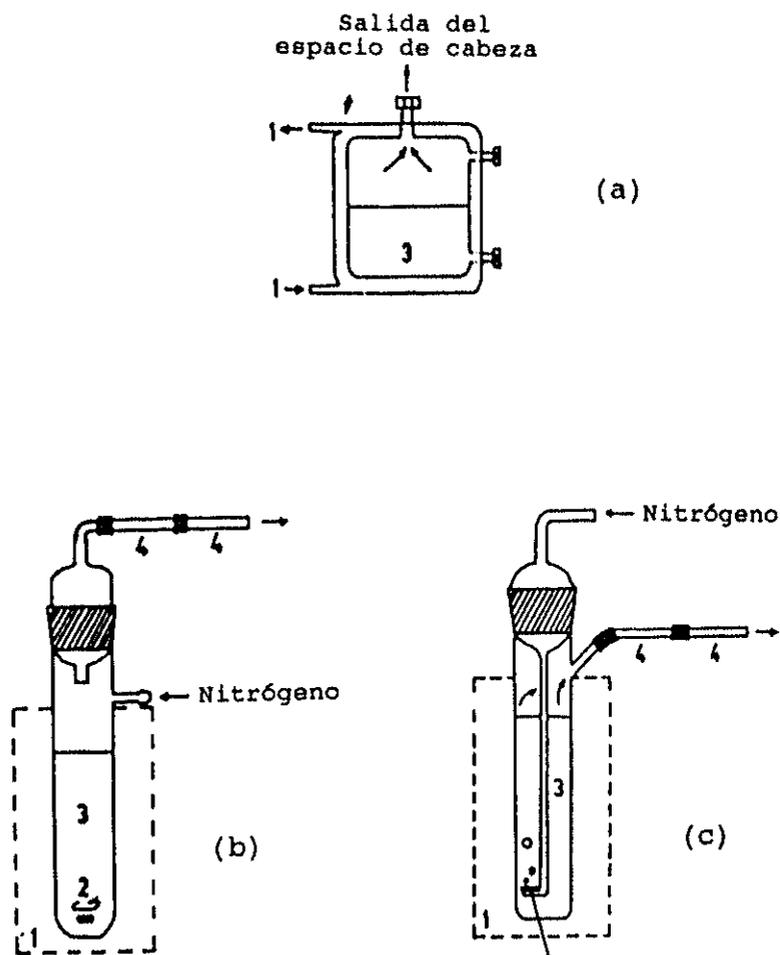


Figura 2. Técnicas de toma de muestra del espacio de cabeza. (a) Estático; (b) Dinámico (barrido); (c) Dinámico (purga). (1: Baño termostatzado; 2: Pieza de agitación magnética; 3: Muestra; 4: Trampa con adsorbente). (Núñez y col., 1.984b).

#### 1.1.2.1. Espacio de Cabeza Estático.

Se trata de un método no destructivo que no precisa preparación previa de la muestra. La presencia de compuestos no volátiles no interfiere en el posterior análisis cromatográfico.

La toma de la muestra e inyección se pueden realizar con jeringas especiales para gases, o bien con sistemas electroneumáticos automatizados. Actualmente es más habitual utilizar la segunda posibilidad ya que se dispone de modelos comerciales que inyectan automáticamente los espacios de cabeza de distintas muestras colocadas en viales que, antes de la inyección, son termostatizados y presurizados (Gagliardi y Verga, 1.982, Nisperos-Carriedo y Shaw, 1.990). Estos equipos permiten además la inyección múltiple o repetida de la misma muestra de modo que es posible determinar la concentración total de los distintos componentes (Vitenberg, 1.984, Snyder y Mounts, 1.990).

El análisis del Espacio de Cabeza Estático es muy utilizado en Ciencia y Tecnología de Alimentos para el análisis de los compuestos responsables del aroma y para la detección de contaminantes volátiles en el propio alimento o en el envase que lo contiene. (Montaño y col., 1.990). Es el método más adecuado para correlacionar el análisis químico

con el sensorial debido a que la composición del espacio de cabeza es similar a la del aroma tal y como se presenta a la nariz humana. Sin embargo, este sistema sólo es aplicable para compuestos muy volátiles y abundantes (Jennings y Filsoof, 1.977, Núñez y Maarse, 1.986). La posibilidad de detectar algunos compuestos de moderada o baja volatilidad, así como los que se encuentran en cantidades traza, es una necesidad evidente ya que, en ocasiones, la relevancia olfativa de tales compuestos es considerable.

La vía lógica para poder detectar compuestos en cantidades traza es aumentar la cantidad de muestra. Sin embargo, los volúmenes grandes de inyección no son, en principio, fácilmente compatibles con bandas cromatográficas estrechas, quedando muy afectada la eficacia de la columna. Aunque este problema puede ser resuelto mediante sistemas de crioenfoco (Bayer y col., 1.988, Reglero y col. 1.990) o con trampas adsorbentes (Noble y col., 1.980, Drozd y col., 1.978), el volumen de muestra que se puede extraer sin alterar el equilibrio del espacio de cabeza es limitado (1-5 mL). Algunos autores señalan la posibilidad de mejorar la sensibilidad del método con pequeñas modificaciones, tales como ajustar el pH del medio, aumentar la temperatura de la muestra (Werkhoff y Bretschneider, 1.987b) o añadir sales que desplacen el equilibrio hacia la fase vapor (Voilley y col., 1.977, Drozd y Novák, 1.979, Montaña y col., 1.990). Otro

inconveniente de esta técnica es la necesidad de una cuidadosa calibración (Poole y Schuette, 1.983), que debe incluir la optimización del tiempo y la temperatura de equilibrio adecuados para cada compuesto.

#### 1.1.2.2. Espacio de Cabeza Dinámico.

Como se ha descrito anteriormente, consiste básicamente en el arrastre con un gran volumen de gas (Litros) de los volátiles de una muestra, por barrido o por purga, y su posterior concentración en una trampa.

Ejemplos de la utilización del método de purga son el análisis de contaminantes en aguas (Bianchi y col., 1.991) así como el análisis de diversos alimentos y bebidas: puré de albaricoque (Bolzoni y col. 1.990), frutas frescas (Schamp y Dirinck, 1.982) y vino (Kallio, 1.991).

El método de barrido resulta excelente para la investigación del metabolismo de sistemas vivos durante largos períodos de tiempo en su medio natural, debido a las condiciones suaves y no destructivas en las que se realiza (Boland y col., 1.984, Ioffe, 1.984). También se ha empleado para el análisis de muestras biológicas, como orina, sangre y leche materna (Michael y col., 1.980), y para otras aplicaciones como el análisis de volátiles de frutas enteras

(Flath y col., 1.990), de hojas de peral (Miller y col., 1.989), de hojas de tabaco (Coleman, 1.992), o de zumos de frutas (Blanch y col. 1.991).

El aislamiento de los volátiles puede llevarse a cabo tanto en sistemas abiertos como en sistemas cerrados. En este último caso la técnica se denomina "Closed-Loop-Stripping" (Grob y Zürcher, 1.976). El gas es reciclado circulando sucesivamente a través de la muestra y de la trampa hasta que se alcanza el volumen denominado de ruptura ("breakthrough volume") o volumen de gas y muestra necesario para eluir de la trampa a los solutos de interés (procedimiento de conservación), o para lograr que la mayoría de los compuestos retenidos alcancen el equilibrio con la fase gaseosa (procedimiento de equilibrio) (Vitenberg, 1.991).

Una reciente versión de la técnica de purga consiste en hacer circular simultáneamente a través de un recipiente una corriente de muestra líquida y de gas (Schnable y col., 1.990). También se ha descrito recientemente otro procedimiento similar consistente en formar un aerosol con la muestra líquida haciendo circular una corriente de gas a través de la misma, con lo que se consigue aumentar la superficie de contacto entre el gas y la muestra, incrementando finalmente la sensibilidad global del procedimiento (Baykut y Voigt, 1.992).

Los factores que más influyen en el proceso de arrastre de los compuestos volátiles son el caudal del gas, el tiempo de operación (Simpson, 1.979) y la temperatura de la muestra (Werkhoff y Bretschneider, 1.987b).

Las trampas utilizadas para la concentración del vapor barrido o purgado pueden ser de distintos tipos:

- Trampas con adsorbentes. El sólido adsorbente se coloca en una columna a través de la cual pasa la corriente de gas procedente de la muestra, quedando adsorbidos los solutos arrastrados (Bianchi y col., 1.991, Yokouchi y Sano, 1.991).

- Trampas criogénicas. La corriente se hace circular a través de una trampa refrigerada en la que se condensan los compuestos que se pretende concentrar (Zlatkis y col., 1.973).

- Trampas con disolventes. El gas burbujea a través del disolvente, quedando disueltos los volátiles solubles (Parliment, 1.986).

- Concentración "On-column". La columna cromatográfica sirve como trampa y permite realizar el crioenfoco de los solutos a analizar (Jennings y Rapp, 1.983, Reglero y col., 1.990).

También se han empleado técnicas de concentración mixtas, como trampas adsorbentes refrigeradas o absorción

empleando disolventes a bajas temperaturas (Yokouchi y Sano, 1.991). Jursik y col. (1.991) han descrito una microversión de este último sistema que exige sumergir en una mezcla criogénica 50  $\mu$ L de disolvente colocado en un tubo en "U". La pequeña cantidad de disolvente empleada hace innecesaria la concentración posterior. También es frecuente el uso de trampas de distintas características colocadas de forma sucesiva (Kessels y col., 1.992).

Los sistemas con trampas criogénicas y adsorbentes requieren una posterior etapa de recuperación de los compuestos retenidos, que se suele llevar a cabo por desorción térmica. En este sentido, existen sistemas automáticos o semiautomáticos en los que el equipo de arrastre y las trampas están acoplados directamente al inyector del cromatógrafo (Dowty y col., 1.976, Spingarn y col., 1.982, Westendorf, 1.985, Coleman, 1.992).

Actualmente se observa la tendencia de considerar la concentración de muestras en fase vapor con aislamiento mediante barrido o purga, concentración en trampas adsorbentes o criogénicas y desorción térmica con transferencia directa a la columna cromatográfica, como un procedimiento independiente del Análisis del Espacio de Cabeza. La mencionada técnica se denomina "Purge and Trap" e implica la disponibilidad de sistemas automatizados, de los que existe una amplia oferta comercial.

### 1.1.3. Extracción con Fluidos Supercríticos.

Se trata de una de las técnicas que recibe mayor atención en la actualidad.

El poder de solvatación de los fluidos supercríticos se conoce desde finales del siglo pasado y sus propiedades se empezaron a estudiar desde entonces, aunque muy recientemente se ha comenzado a profundizar en algunos aspectos. Las primeras aplicaciones de fluidos supercríticos para la extracción de determinados solutos de una matriz a escala industrial, se llevaron a cabo a mediados del presente siglo. Sin embargo, en el campo de la Química Analítica, la Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE) puede considerarse como una técnica nueva y en franco desarrollo, siendo objeto de gran interés en los últimos años (McHugh y Krukoniš, 1.986, Lee y Markides, 1.990, Wenclawiak, 1.992).

La SFE ofrece notables ventajas. La más importante es la posibilidad de ajustar el poder de solvatación del agente extractante mediante la variación de la presión y la temperatura de trabajo. De esta forma se puede abordar el fraccionamiento de los componentes de una muestra llevando a cabo sucesivas extracciones de la misma a diferente densidad del fluido, obteniéndose finalmente extractos con distinta composición.

Es interesante destacar el hecho de que los coeficientes de difusión en fluidos supercríticos son muchos mayores que en los disolventes orgánicos clásicos lo que facilita la rápida extracción y una mayor accesibilidad del fluido a matrices de naturaleza muy diversa.

La adecuada elección del fluido supercrítico puede proporcionar ventajas adicionales. Así, la baja temperatura crítica del dióxido de carbono lo hace especialmente recomendable para la extracción de compuestos termolábiles. Además, su bajo punto de ebullición a presión atmosférica minimiza los problemas de concentración del extracto ya que el CO<sub>2</sub> se puede eliminar fácilmente casi sin riesgo de coevaporación de otros analitos. Por otro lado, proporciona un medio libre de oxígeno durante la extracción, lo que limita las posibles oxidaciones de los solutos extraídos, y a diferencia de otros agentes extractantes de uso habitual, no es tóxico.

Una importante desventaja del empleo de CO<sub>2</sub> para la extracción de compuestos polares es la escasa solubilidad de estos últimos, aunque el proceso se puede aplicar mediante la adición de modificadores adecuados para aumentar la polaridad del medio extractante (Wright y col., 1.987, Sequeira y Taylor, 1.992).

Una vez realizada la extracción, el CO<sub>2</sub> se elimina por descompresión, y el extracto resultante, que normalmente se recoge sobre un disolvente, puede ser inyectado en el cromatógrafo de gases (Wright y col., 1.987, King y col., 1.989, Saito y col., 1.989, Wheeler y McNally, 1.989, Porter y col., 1.992). Una alternativa muy interesante la constituye el acoplamiento entre la Extracción con Fluidos Supercríticos y la Cromatografía de Gases (SFE-GC), de modo que los solutos extraídos puedan ser transferidos a una trampa criogénica (Andersen y col., 1.989, Liebman y col., 1.989) o a una trampa con adsorbentes previa a la columna cromatográfica (Lee y Markides, 1.990), o bien a la primera porción de la propia columna cromatográfica (Hawthorne y Miller, 1.986, Hawthorne y col., 1.989). Otra opción a considerar supone acoplar directamente el extractor a un cromatógrafo de fluidos supercríticos (SFE-SFC) (Jackson y col., 1.986, Wheeler y McNally, 1.989).

La SFE ha sido aplicada a muy diversos tipos de muestras, destacando las medioambientales (Hawthorne y Miller, 1.987, Andersen y col., 1.989, Alexandrou y col., 1.992, Bicking, 1.992, Ho y Tang, 1.992) y los alimentos (Hawthorne y col., 1.988 y 1.989, Hierro y Santa-María, 1.992). En resumen, se trata de una técnica de gran utilidad y a considerar en el futuro, aunque el coste de los equipos así como el del CO<sub>2</sub> de alta pureza dificulta su expansión generalizada.

#### 1.1.4. Extracción con Disolventes Orgánicos.

Es el método clásico de extracción de compuestos volátiles en alimentos y uno de los más empleados, aunque actualmente está siendo desplazado por otras técnicas más ventajosas.

Las técnicas de extracción con disolventes se pueden aplicar a gases, aunque principalmente se emplean para sólidos y líquidos. La extracción se puede llevar a cabo por varios procedimientos: En discontinuo o extracción simple, en continuo y en contracorriente, siendo el citado en segundo lugar el más utilizado.

La extracción de muestras líquidas en continuo exige el empleo de extractores líquido-líquido (Figura 3), mientras que cuando la muestra es sólida se emplea el extractor Soxhlet (Figura 4). En ambos casos el principio del procedimiento es idéntico: el disolvente ebulle, condensa, circula a través de la muestra a extraer con la cual es inmisible, y vuelve al matraz original llevando consigo los compuestos extraídos.

El diseño de los equipos para extracción ha sufrido numerosas modificaciones, aunque su uso no se ha

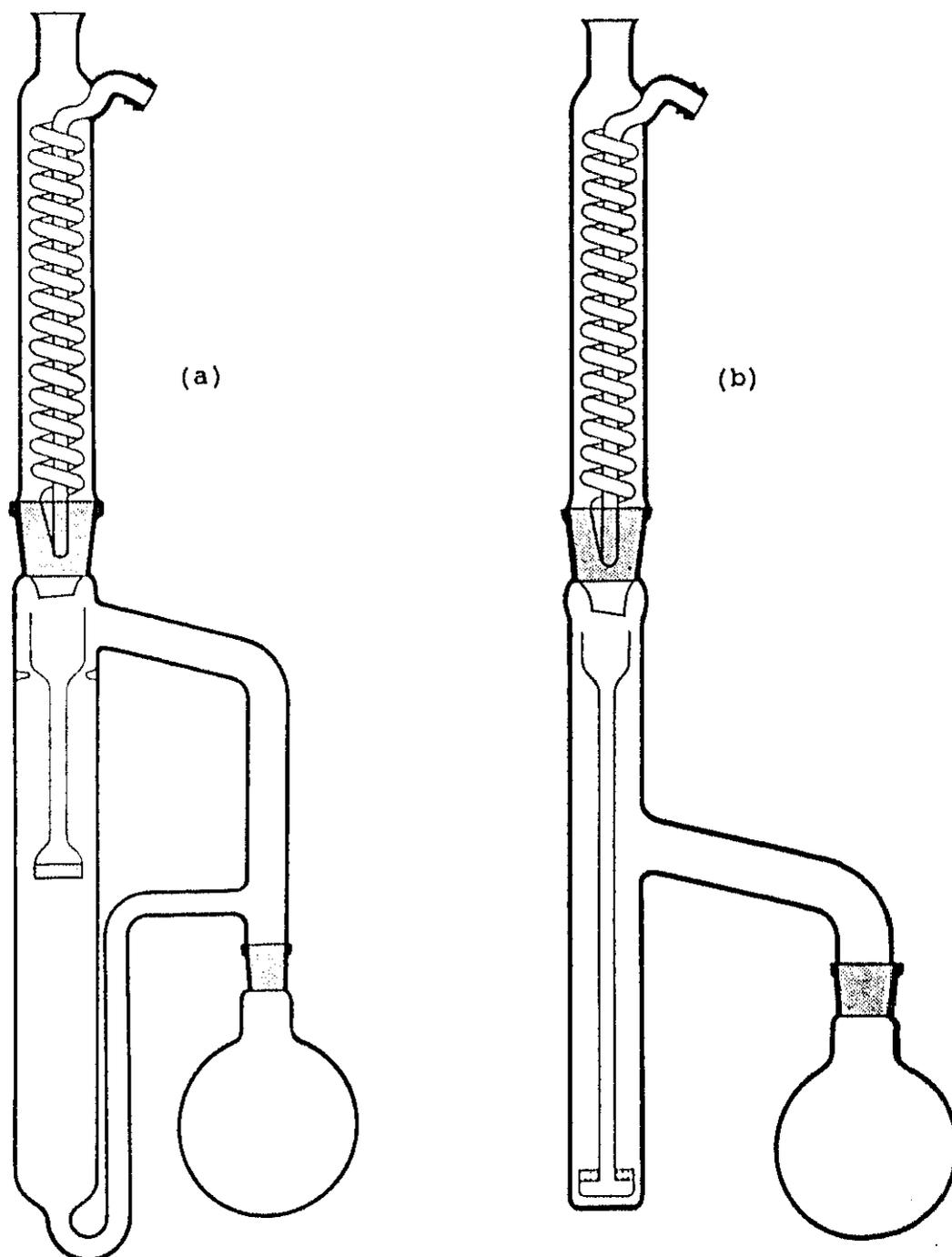


Figura 3. Extractores continuos líquido-líquido para disolventes más densos (a) y menos densos (b) que la muestra.

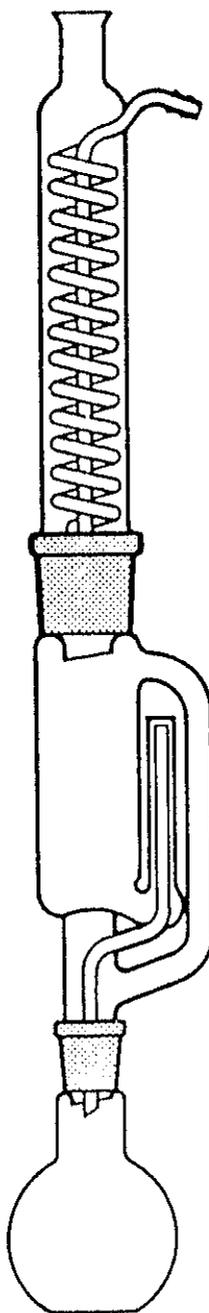


Figura 4. Extractor Soxhlet.

generalizado. El extractor de tambor permite la extracción de grandes volúmenes (Fagan y col., 1.982), y es especialmente útil para las muestras que tienen tendencia a formar espuma o emulsiones con el disolvente. Bhuchar y Agrawal (1.981) describieron un extractor adecuado tanto para muestras líquidas como para muestras sólidas y que presenta además la ventaja de utilizar un volumen pequeño de disolvente. Con la misma idea se han desarrollado otros sistemas de microextracción (Murray, 1.979, Burgasser y Colaruotolo, 1.979).

Es evidente que el resultado del proceso de extracción está fuertemente condicionado por la selectividad del disolvente. Entre los más utilizados para el análisis de compuestos volátiles en alimentos se puede citar el dietiléter (Fauhl y Wittkowski, 1.992), aunque implica cierto riesgo de formación de peróxidos, así como de alteraciones de los extractos. El empleo de pentano e isopentano puede ser ventajoso para realizar la extracción de algunos productos resultantes de la fermentación alcohólica ya que al proporcionar menor poder de extracción que otros disolventes, los alcoholes de bajo peso molecular, y entre ellos el etanol, son poco extraídos. Este hecho disminuye evidentemente las interferencias que, si se utilizan otros disolventes, se observan al realizar el análisis de compuestos presentes en concentraciones muy diferentes. El

hexano también ha sido empleado para distintos tipos de muestras (Murray, 1.979, Leenheers y col., 1.992). Otros autores (Welch y col., 1.982, Peters, 1.982) han recomendado el empleo del cloruro de metileno por su bajo punto de ebullición y su alta eficacia en la extracción.

Uno de los disolventes con propiedades más favorables para la extracción líquido-líquido es el Freon 11 (triclorofluorometano). Tiene un punto de ebullición muy bajo (23,7°C). No es miscible con el agua, por lo que no es necesario añadir agentes desecantes al extracto. Posee escasa reactividad. Es inodoro, no es tóxico, ni explosivo, ni inflamable. No posee una selectividad marcada, presentando gran eficacia en la extracción de alcoholes de medio y alto peso molecular, ésteres y cetonas, y muy baja en la de etanol, por lo que es un disolvente muy adecuado para la extracción de muestras hidroalcohólicas (Hardy, 1.969, Hardy y Ramshaw, E.H., 1.970, Rapp y col., 1.976, Marais y Houtman, 1.979). Además, se puede eluir rápidamente en una columna cromatográfica y tiene una respuesta muy baja en el detector de ionización de llama. Cobb y Bursey (1.978) compararon la extracción con distintos disolventes de disoluciones modelo de vino que contenían un 12% de alcohol y un 4.4% de azúcares obteniendo los mejores resultados con Freon 11.

El mayor inconveniente del Freon 11 se refiere a su pertenencia a los clorofluorocarbonados (CFC). Estos compuestos, hasta ahora producidos industrialmente a gran escala y muy utilizados también como agentes refrigerantes, son destruidos en la estratosfera por la radiación ultravioleta de corta longitud de onda, liberando átomos de cloro que a su vez destruyen la capa de ozono de la atmósfera. Esta disminución del ozono ha originado la aparición de un agujero sobre la Antártida y una disminución del espesor de la capa en otras latitudes (alrededor de un 8% entre 1.980 y 1.990 en latitudes medias del hemisferio norte).

El ozono, a pesar de su pequeña concentración, absorbe la mayor parte de la radiación solar ultravioleta, que, sin este filtro, puede llegar a la superficie de la Tierra y ocasionar graves perjuicios a la vida en nuestro planeta. Por ello, y dado que datos científicos recientes sugieren que la situación es más grave de lo que se creía hace sólo algunos años, numerosos organismos internacionales han iniciado acciones para reducir rápidamente el uso de CFC (Granier y Brasseur, 1.992, Serra, 1.990). En este sentido, cualquier estudio conducente a la sustitución de métodos anteriormente utilizados que impliquen el empleo de Freon 11, se considera de especial relevancia.

La complejidad que a veces poseen los extractos en disolventes orgánicos hace conveniente su fraccionamiento, y con este objeto se emplean diversos métodos. Uno de ellos consiste en el ajuste del pH de la muestra. Algunos autores (Schreier y col., 1.976, Baumes y col., 1.986) emplean con el mismo objetivo la cromatografía en columna con gel de sílice e incluso la cromatografía de gases preparativa (Ho y col., 1.982, Hsieh y col., 1.982, Grimmer y col., 1.983).

Generalmente, el volumen de disolvente empleado en la extracción es considerable por lo que los compuestos se encuentran diluidos en el extracto, siendo necesaria su concentración posterior, que habitualmente se realiza empleando uno de los dos métodos que se mencionan a continuación:

- El primero consiste en hacer circular una corriente de gas inerte sobre la superficie del extracto. (Zlatkis y col., 1.981, Nestricks y Lamparski, 1.981, Higgins y Guerin, 1.980).

- El segundo implica la eliminación del disolvente por destilación (Karasek, y col., 1.981, Price y Carlson, 1.981). Con objeto de evitar, o al menos reducir, pérdidas de solutos, se concentra la muestra a reflujo con una columna Vigreux (Schreier y col., 1.979) o una columna Snyder, o bien con sistemas más sofisticados, como el concentrador de Kuderna-Danish (Goldberg y Weiner, 1.980, Vo, 1.992).

En cualquier caso, la etapa de concentración añade al proceso riesgos de pérdida de compuestos volátiles por coevaporación con el disolvente, de formación de artefactos y de contaminación accidental.

#### 1.1.5. Destilación y Extracción Simultáneas.

La Destilación y Extracción Simultáneas (SDE) es un proceso continuo en el que la muestra y el disolvente destilan simultáneamente y condensan en la misma zona, en la que tiene lugar la extracción líquido-líquido. También se ha descrito la existencia de extracción parcial en fase vapor.

La técnica es original de Likens y Nickerson (1.964) quienes realizaron la primera aplicación al aislamiento de los componentes del aroma de la cerveza (Nickerson y Likens, 1.966). Maarse y Kepner (1.970) adaptaron el diseño inicial para la operación a presión reducida y posteriormente Schultz y col. (1.977) introdujeron algunas modificaciones para disminuir las pérdidas de disolvente y de compuestos muy volátiles.

Todas estas versiones operan con volúmenes elevados de muestra, por lo que es necesario concentrar el extracto obtenido. Para evitar los riesgos, ya señalados, que ello

supone, Godefroot y col. (1.981 y 1.982) diseñaron una microversión del equipo (Figura 5), que permite la utilización de pequeñas cantidades de disolvente. Este diseño es el más extendido actualmente. Recientemente, Blanch y col. (1.993) han propuesto un nuevo extractor SDE, aún no comercializado, que permite la operación a presión normal, presión reducida y con arrastre de vapor. Es aplicable a muestras térmicamente inestables y proporciona recuperaciones satisfactorias para compuestos presentes en la muestra a niveles de ppb, lo que hasta ese momento no se había conseguido (Núñez y Bemelmans, 1.984). Además, el nuevo diseño es reversible por lo que permite, con una única configuración, realizar el proceso con disolventes de mayor o de menor densidad que el agua. Este hecho supone una clara ventaja en relación a la microversión antes mencionada.

La Destilación y Extracción Simultáneas se ha utilizado frecuentemente para el aislamiento de compuestos volátiles en diversos alimentos (Horvat y Senter 1.984, Flath y Forrey, 1.977, Takeoka y col., 1.990, Núñez y col., 1.984a, Blanch y col., 1.991)

La influencia de la concentración y de la volatilidad del soluto, así como de la selectividad del disolvente, en la recuperación, condicionan la composición del extracto, que en muchas ocasiones no coincide con la de la muestra original (Heath y Reineccius, 1.986).



1.2. INTRODUCCION DE MUESTRA EN COLUMNAS CAPILARES.

La Cromatografía de Gases con columnas capilares es la técnica de separación de compuestos volátiles más eficiente en este momento. El continuo desarrollo de detectores cada vez más sensibles y selectivos ha permitido, además, disminuir considerablemente el límite de detección de la técnica hasta el punto de que, en algunos casos, es posible obtener respuestas aceptables para niveles de picogramo de los compuestos eluidos.

La principal limitación de las columnas capilares se refiere a su capacidad de carga. Volúmenes de inyección superiores a 1  $\mu$ L pueden causar pérdidas de resolución apreciables. En estas condiciones, aún con los detectores más sensibles, el límite de detección teórico es del orden de ppb, aunque, en la práctica, suele ser muy superior debido a problemas de actividad residual del sistema cromatográfico.

Es cada vez mayor la importancia de la determinación de compuestos a niveles de ppb y ppt. Así, la U.S. Environmental Protection Agency (1.986) exige la determinación de muchos solutos presentes en concentraciones del orden de ppt. Por ello existe un gran interés por el desarrollo de métodos

analíticos rápidos y fiables para la determinación de compuestos en muy baja concentración.

Actualmente son las técnicas de "Purge and Trap" las que ofrecen los límites de detección más bajos. Este procedimiento proporciona una información que es fiel reflejo de la composición de muestras en fase vapor. Sin embargo, para muestras líquidas la selectividad del método suele desvirtuar la información. Por tanto, el análisis de compuestos en concentraciones traza en muestras líquidas requiere la realización de una etapa previa de aislamiento y concentración.

Las técnicas de introducción de muestras líquidas en columnas capilares se pueden clasificar en dos grupos:

1) Introducción de la muestra sin eliminación selectiva de disolvente.

2) Introducción con eliminación selectiva de disolvente.

A continuación se exponen los fundamentos de las técnicas mencionadas, así como las ventajas e inconvenientes que ofrecen.

### 1.2.1. Técnicas de introducción sin eliminación selectiva de disolvente.

Los sistemas de inyección más utilizados para la introducción completa de volúmenes de muestra de hasta 10  $\mu$ L en columnas capilares son: el inyector "Split-Splitless" y el inyector "On-Column".

#### 1.2.1.1. Inyector "Split-Splitless"

**Inyección con división de flujo ("Split").**

Fue el primer método desarrollado para la inyección de muestras en columnas capilares y el único utilizado durante algunos años. La muestra es introducida mediante una jeringa en una cámara de vaporización mantenida a alta temperatura y se transfiere a la columna después de haber sido dividida en dos fracciones, de acuerdo con la relación de división de flujo previamente establecida. Una pequeña proporción se introduce en la columna, arrastrada por el gas portador, mientras que el resto es eliminado hacia el exterior (Figura 6).

Con la división de flujo se consigue no sobrepasar la pequeña capacidad de carga de las columnas capilares. Además, la banda en la que inicialmente se depositan los solutos en

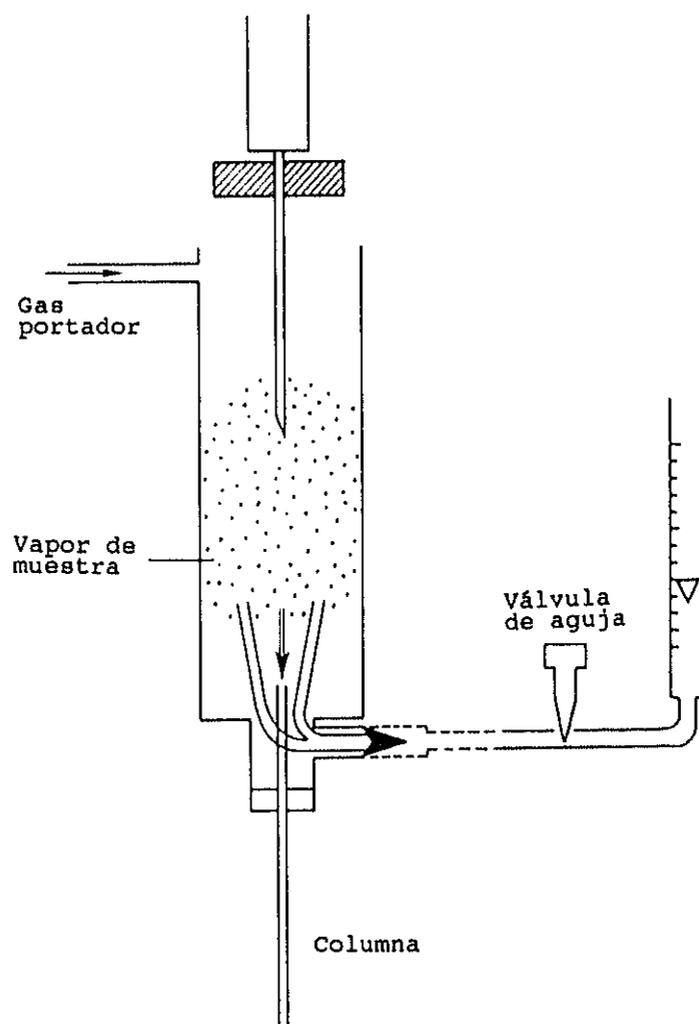


Figura 6. Esquema de un inyector con división de flujo (split).

la columna es estrecha, por lo que su contribución a la anchura final de banda es escasa y, en último término, no repercute negativamente a la resolución final alcanzable. Sin embargo, la inyección con división de flujo presenta problemas de discriminación y de descomposición térmica (Grob y Neukom, 1.979, Grob y Rennhard, 1.980, Schomburg, 1.981, Grob, 1.986).

De cualquier forma, en el análisis de muestras con solutos a nivel de trazas, el riesgo de sobrecarga de la columna no existe y, por otro lado, la división de la muestra incide negativamente en la sensibilidad del método, por lo que la inyección "Split" tiene poca utilidad en este caso.

**Inyección sin división de flujo ("Splitless").**

La muestra (0.3-3 $\mu$ L) es introducida mediante una jeringa en la cámara de vaporización mantenida a alta temperatura, se evapora y se transfiere casi en su totalidad a la columna. La operación se lleva a cabo en un inyector "Split", pero manteniendo la válvula de división de flujo cerrada, aunque en algunos casos se recomienda establecer lo que se denomina "tiempo de purga" con objeto de evitar la introducción en la columna de un volumen excesivo de disolvente. Evidentemente, el límite de detección que se obtiene es sensiblemente menor que cuando se inyecta con división de flujo.

La inyección sin división de flujo va generalmente asociada a procedimientos de enfoque ("cold trapping" y "solvent effect"), para reducir la anchura de las bandas en las que se depositan inicialmente los solutos. El efecto de "atrapado en frío" o "cold trapping" tiene lugar cuando la columna se mantiene a baja temperatura, produciéndose una recondensación de los solutos en una zona relativamente corta de la columna. Al aumentar la temperatura, se eluyen en forma de bandas estrechas (Grob y Grob, 1.969a y 1.969b).

El efecto del disolvente, "solvent effect", o Efecto Grob (Grob y Grob, 1.974) ocurre cuando el disolvente recondensa al principio de la columna y actúa como una fase estacionaria temporal, reduciendo localmente la relación de fases,  $\beta$  ( $\beta = V_G/V_L$ , siendo  $V_G$  y  $V_L$  los volúmenes ocupados por la fase móvil y la fase estacionaria respectivamente). Por consiguiente, aumenta el factor de capacidad,  $k'$ , de las moléculas de soluto situadas en la zona frontal de la banda cromatográfica correspondiente a los compuestos que se eluyen inmediatamente después del disolvente ( $K_D = \beta k'$ , donde  $K_D$  es el coeficiente de reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria). La consiguiente desaceleración de esa zona con respecto al movimiento experimentado por la zona posterior de la citada banda produce, en último término, el estrechamiento de la banda considerada (Grob, 1.983a y 1.983b, Grob y Schilling, 1.983, Pretorius y col., 1.983). La

inyección sin división de flujo ofrece una importante ventaja en relación a la que se realiza con división de flujo ya que, en el primer caso, se elimina una evidente causa de discriminación (la falta de linealidad del split), que en principio se reconoció como la principal fuente de error en determinaciones cuantitativas llevadas a cabo en columnas capilares. Sin embargo, la introducción de la muestra en un inyector mantenido a alta temperatura puede provocar la evaporación selectiva de algunos compuestos desde la aguja de la jeringa y, en último término, disminuir igualmente la fiabilidad del análisis cuantitativo. Este aspecto, común a las inyecciones realizadas con y sin división de flujo, limita en algunos casos las aplicaciones de las técnicas comentadas.

#### 1.2.1.2. Inyección directa en la columna ("On-Column").

La inyección "On-Column" consiste en depositar la muestra directamente en el interior de la columna. Al aumentar la temperatura del horno, la muestra se evapora y comienza el proceso cromatográfico.

Esta técnica fue iniciada por Schomburg y col. (1.977) en dos versiones, micro y macro. En la primera, la muestra se introduce en la columna por medio de una micropipeta. En la versión macro, la muestra se coloca en un pequeño crisol y es

transferida a la columna por capilaridad y por empuje del gas portador. Posteriormente se han descrito otras versiones, algunas de las cuales exigen el empleo de una jeringa (Grob y Grob, 1.978, Galli y col., 1.979, Galli y Trestianu, 1.981, Schomburg y col., 1.981).

El sistema de inyección "On Column" tiene la ventaja de eliminar los problemas de discriminación de la inyección "Split" mencionados anteriormente en relación a la posible falta de linealidad con que se puede efectuar la división de flujo. Además, al realizarse la inyección a baja temperatura, no se producen degradaciones térmicas (Schomburg, 1.985). Sin embargo, la técnica descrita presenta algunos inconvenientes. Los compuestos poco volátiles pueden quedar depositados en la columna, con el consiguiente deterioro de ésta. También, la introducción de muestras líquidas mediante una jeringa puede resultar difícil si se emplean columnas capilares de diámetro interno inferior a 0.25 mm. Por último, el procedimiento no es fácilmente automatizable para análisis de rutina (Schomburg, 1.981 y 1.985).

La introducción de muestras en columnas capilares sin eliminación selectiva del disolvente, tiene dos inconvenientes que limitan a unos pocos microlitros el máximo volumen de muestra a inyectar (Hinshaw, 1.989): Formación de vapor de disolvente en exceso e inundación de la columna. El

primer efecto se refiere a la presencia de un gran volumen de vapor del disolvente en la cámara de vaporización del inyector "Splitless" o en la cabeza de la columna, si se utiliza inyección "On-Column". En cualquier caso, la anchura de la banda inicial resultante perjudica sensiblemente la resolución finalmente alcanzable. Igualmente, el vapor puede experimentar retrodifusión en sentido contrario al del gas portador arrastrando, en algunos casos, parte de los solutos y originándose la pérdida de simetría ("tailing") de los picos eluidos, así como la aparición de picos "fantasma". Este último efecto puede ser corregido mediante la introducción de la denominada "purga del septum" (flujo de gas que barre la zona del "septum") que, sin embargo, puede afectar ocasionalmente a la precisión de los datos cuantitativos.

La inundación de la cabeza de la columna se produce por condensación de elevados volúmenes de disolvente en una longitud apreciable de la misma. Las gotas formadas pueden ser transportadas por el gas portador a distancias de incluso varios metros en el interior de la columna, provocándose ensanchamiento de los picos (ensanchamiento de banda en el espacio) y la consiguiente pérdida de resolución. Por otro lado, la película de fase estacionaria puede ser alterada, causando una apreciable pérdida de la eficacia de la columna.

Para solucionar el problema relativo a la inundación de la columna se propuso colocar al principio de la misma un tubo capilar desactivado y sin fase estacionaria, y cuya longitud depende del volumen de muestra inyectado, denominado genéricamente "retention gap" (Grob, 1.982). La condensación y evaporación del disolvente tiene lugar en este tubo vacío. El disolvente se separa de los solutos que, posteriormente, migran rápidamente a través del tubo sin fase estacionaria hasta llegar a la columna analítica en la que se enfocan debido a la presencia de la fase líquida y a la programación de temperatura posterior.

La colocación de un "retention gap" incrementa el volumen máximo de muestra, que se puede introducir sin distorsión de la separación, hasta unos 10  $\mu$ L. Los límites prácticos los imponen, por un lado la longitud necesaria de tubo, que cuando es grande constituye una fracción significativa de la longitud total de la columna, afectando a la eficacia y, en segundo lugar, el tiempo necesario para la evaporación del disolvente, que puede resultar excesivamente largo.

### 1.2.2. Técnicas de introducción con eliminación selectiva de disolvente.

La introducción de volúmenes de muestra superiores a 10  $\mu\text{L}$  en columnas capilares debe abordarse mediante técnicas de eliminación del disolvente de la muestra o componente mayoritario de la misma que, en la bibliografía internacional más reciente se han comenzado a denominar genéricamente "Solvent Purge Injection".

#### 1.2.2.1. Eliminación de disolvente en inyección "Splitless"

Grob y col. (1.992a, 1.992b, 1.992c, 1.992d, 1.992e y 1.992f) han introducido, muy recientemente, una modificación de la inyección "Splitless" que permite incrementar el volumen de muestra hasta 200  $\mu\text{L}$ , eliminando el disolvente antes de la entrada de la muestra en la columna. Consiste en rellenar la cámara de vaporización del inyector con un adsorbente (Tenax TA), e inyectar la muestra con la válvula de división de flujo cerrada, sin flujo de gas portador y con la cámara de vaporización mantenida a alta temperatura. El disolvente se evapora y sus vapores salen al exterior a través de la purga de septum debido a la expansión que se produce en la evaporación. Dicha evaporación también implica el enfriamiento de la zona en la que tiene lugar, aumentando la retención de los solutos por el adsorbente. Una vez

eliminado el disolvente, la zona enfriada se vuelve a calentar, con lo que se desorben los solutos retenidos, que son transferidos finalmente a la columna cromatográfica al abrir el paso de gas portador.

1.2.2.2. Inyección en frío con programación de temperatura.  
 inyector PTV.

Otro método de introducción de elevados volúmenes de muestra, que se está desarrollando actualmente, supone la eliminación del disolvente en frío, empleando para ello el inyector PTV (Vaporizador con Temperatura Programada).

**Descripción del inyector PTV.**

En 1.979 se desarrolló el primer prototipo y se llevaron a cabo las primeras aplicaciones (Vogt y col., 1.979a y 1.979b). La versión actual del PTV se basa en trabajos de Schomburg (1.981) y de Poy y col. (1.981 y 1.982).

En la Figura 7 se muestra el esquema del inyector PTV. Consiste básicamente en una cámara de vaporización en cuyo interior se coloca un "glass liner" (camisa de vidrio) de pequeño diámetro interno, sellado externamente mediante un cono de grafito. Este cono asegura la circulación del gas portador hacia el interior del "glass liner". El inyector está dotado de purga de septum y divisor de flujo.

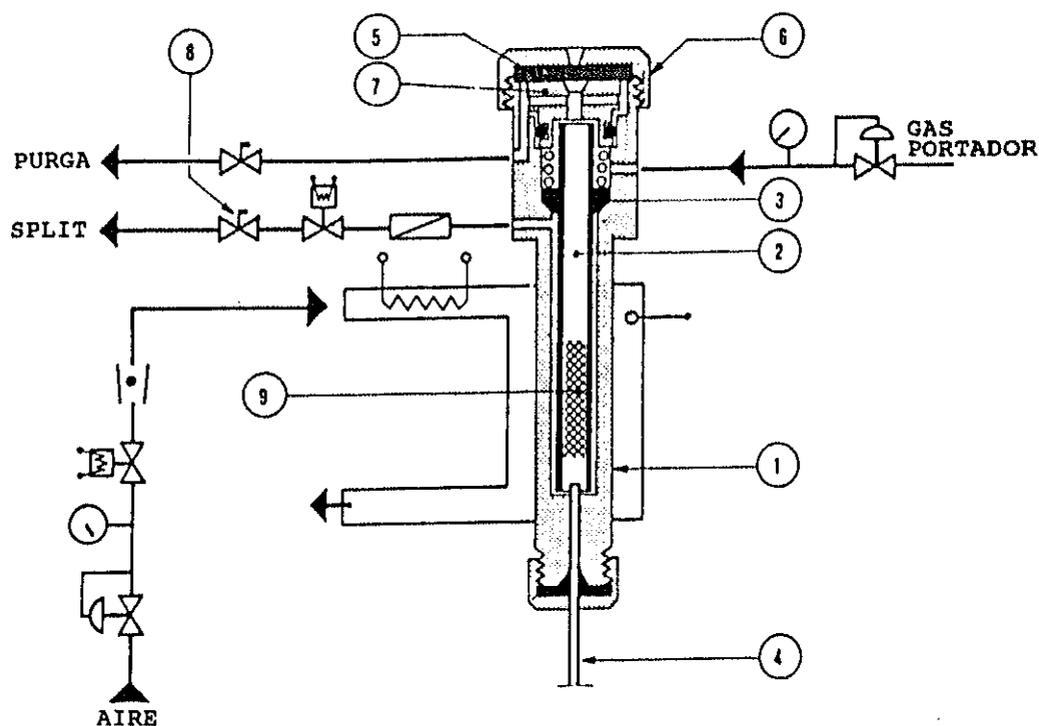


Figura 7. Vaporizador con temperatura programada (Inyector PTV).

(1: Cámara de vaporización; 2: Glass-liner; 3: Cono de grafito; 4: Columna capilar; 5: Septum; 6: Fijación externa; 7: Fijación interna; 8: Válvula de aguja para división de flujo; 9: Lana de vidrio).

(Poy y Cobelli, 1.985).

El cuerpo del inyector es ligero y está construido en una aleación de baja inercia térmica. Esto le permite ser calentado a elevada velocidad ( $14^{\circ}\text{C/s}$ ) mediante una corriente de aire comprimido que, después de atravesar una resistencia, circula por el exterior del bloque. La temperatura del aire está controlada por medio de un termorregulador electrónico. Mediante un dispositivo de control, se puede programar la temperatura del flujo de aire, entre varios grados bajo cero y  $400^{\circ}\text{C}$ , así como la apertura o cierre de la válvula de división de flujo. Se trata de un inyector de gran versatilidad, ya que tiene la posibilidad de operar en las siguientes modalidades (Poy y Cobelli, 1.985):

- En caliente con o sin división de flujo ("Split-Splitless").
- En frío con división de flujo ("Cold Split").
- En frío sin división de flujo ("Cold Splitless").
- En frío con eliminación del disolvente ("Solvent Purge" o "Solvent Split").

A continuación se detallan cada uno de estos modos de inyección.

**Inyección en caliente con o sin división de flujo ("Split-Splitless").**

En este caso se programa la temperatura del inyector de modo que esté caliente antes de introducir la muestra con o sin división del flujo. Se trata de modalidades poco empleadas puesto que realmente el modo de operar es idéntico al utilizado en las técnicas clásicas de inyección "split-splitless" y, por consiguiente, también se pueden observar los problemas relativos a las causas de discriminación comentadas anteriormente.

**Inyección en frío con división de flujo ("Cold-Split").**

La inyección se realiza con la válvula de división de flujo abierta, con una relación de división predeterminada, y a temperatura ambiente. Después de depositar la muestra en la cámara de vaporización y extraer la aguja de la jeringa, se calienta rápidamente el inyector hasta la temperatura necesaria para que se vaporice la muestra, comenzando el proceso cromatográfico.

Al introducir la muestra con el inyector frío, se elimina el riesgo de evaporación selectiva de los compuestos más volátiles. También se reduce la posibilidad de descomposición de los solutos lábiles sobre la superficie de la jeringa.

La muestra se calienta con la suficiente rapidez como para que no se produzca un ensanchamiento apreciable de las bandas de elución, a lo cual también contribuye el pequeño volumen de la cámara de vaporización. Sin embargo, el calentamiento de la muestra no es instantáneo sino gradual y uniforme. Por ello, no se producen sobrepresiones importantes y la relación de división de flujo permanece constante sin dar lugar a errores cuantitativos. Otra ventaja del calentamiento gradual es que todos los compuestos volátiles de la muestra se evaporan totalmente, llegando en estado gaseoso al punto de la división del flujo, y eliminándose otro origen de discriminación que presentan los inyectores clásicos.

En general, con la inyección en frío con división de flujo en un PTV se han obtenido resultados más exactos y más precisos que con la inyección clásica con división de flujo (Poy, 1.982, Loyola y col., 1.987, Reglero y col., 1.988, Eder y col., 1.991)

**Inyección en frío sin división de flujo ("Cold-Splitless").**

Al igual que en la técnica anterior, la inyección se realiza a temperatura ambiente y, una vez depositada la muestra y extraída la aguja de la jeringa, el inyector se calienta rápidamente, pero permaneciendo cerrada la válvula de división de flujo.

La mayor ventaja del calentamiento gradual en "Splitless" es que el disolvente queda muy diluido en el gas portador y se introduce en la columna progresivamente con lo que no se observa una retrodifusión apreciable de los vapores de soluto (Grob, 1.986).

La técnica ofrece mayor precisión y exactitud que la "Splitless" clásica (Reglero y col., 1.988, Eder y col., 1.991) y resultados similares a los obtenidos mediante la inyección "On-Column" (Poy y Cobelli, 1.985).

#### **Inyección en frío con eliminación del disolvente.**

La muestra es introducida en frío manteniendo la válvula de división de flujo abierta, en condiciones en las que el disolvente se elimina a través de la salida de división de flujo arrastrado por el gas portador, quedando los solutos retenidos en el interior del "glass liner" del inyector. Posteriormente, se cierra la válvula de división de flujo, y se lleva a cabo la programación de temperatura de la cámara de vaporización, transfiriéndose los solutos a la columna y comenzando el proceso cromatográfico.

El éxito de esta técnica depende de la posibilidad de retener suficientemente los solutos durante la eliminación del disolvente y de la obtención de una transferencia cuantitativa de los mismos a la columna.

Para la retención de los solutos en el "glass liner" se emplean métodos de refrigeración del inyector o de adsorción sobre trampas sólidas colocadas en el interior del mismo. La transferencia de los solutos a la columna se lleva a cabo por desorción térmica utilizando la programación de temperatura del PTV.

### 1.3. AISLAMIENTO Y CONCENTRACION INTERNAS EN EL CROMATOGRAFO DE GASES.

La inyección en el PTV con eliminación de disolvente, tal y como se ha descrito anteriormente, podría evitar todos los problemas asociados a la introducción de elevados volúmenes de disolvente en la columna, siendo entonces posible aumentar sensiblemente el volumen de muestra inyectado. Concretamente, la modalidad que supone la utilización de trampas adsorbentes en el interior del "glass liner" y desorción térmica posterior de los solutos retenidos, podría constituir la base de las técnicas de aislamiento y concentración internas en el propio cromatógrafo de gases, que se pretenden desarrollar con objeto de llevar a cabo el análisis directo de muestras diluidas sin necesidad de extracción previa. Además, este estudio podría ser el punto de partida para el desarrollo de una nueva interfase para el acoplamiento LC-GC (Cromatografía

de Líquidos de Alta Eficacia con Cromatografía de Gases) (Grob, 1.991a y 1.991b). Los supuestos mencionados constituyen el planteamiento inicial del trabajo presentado en esta Memoria.

A continuación, se exponen las líneas fundamentales de las técnicas necesarias para abordar el aislamiento y concentración internas en un cromatógrafo de gases, así como el estado actual de las investigaciones realizadas al respecto.

#### 1.3.1. Características generales del proceso de adsorción.

Los métodos de aislamiento y concentración que implican el uso de adsorbentes pueden ser divididos en cuatro grupos (Liška y col., 1.989):

- 1) Adsorción de la fase gaseosa y desorción en fase gaseosa.
- 2) Adsorción de la fase gaseosa y desorción en fase líquida.
- 3) Adsorción de la fase líquida y desorción en fase líquida.
- 4) Adsorción de la fase líquida y desorción en fase gaseosa.

A este último grupo pertenece la técnica de aislamiento

y concentración internas en el PTV. Genéricamente consiste en hacer pasar la muestra líquida a través de una columna que incluye un adsorbente en el que quedan retenidos los compuestos orgánicos. Un flujo de gas inerte permite eliminar el disolvente, que no es retenido. La desorción se lleva a cabo por calentamiento en corriente de gas inerte que arrastra los volátiles y los conduce a un sistema de enfoque o al cromatógrafo de gases.

La adsorción se basa en dos tipos de interacción. Cuando la superficie del adsorbente es inerte, se producen fuerzas de atracción de tipo físico, tales como fuerzas de Van der Waals, atracciones entre dipolos o puentes de hidrógeno. En este caso, la cantidad de energía liberada es relativamente pequeña. Otras zonas del adsorbente pueden estar insaturadas y, en consecuencia, mostrar cierta tendencia a participar en procesos de transferencia de electrones. Si una sustancia se pone en contacto con dicha zona puede formar enlaces y quedar adsorbida químicamente. Este proceso es más exotérmico que la adsorción física, pero necesita mayor energía de activación.

La efectividad de la adsorción depende en gran medida de la capacidad de carga del adsorbente (proporcional a su superficie específica) y de su selectividad. Ambos parámetros, junto con la temperatura de operación y el flujo del gas de arrastre, condicionan el volumen de ruptura

("breakthrough") de cada soluto, cuyo valor puede ser determinado experimentalmente mediante disoluciones modelo (Lövkvist y Jönsson, 1.987, Namiesnik y col., 1.981, Przyjazny y col., 1.982, Witkiewicz y col., 1.991).

Además de la superficie específica y la selectividad, las características del adsorbente en cuanto a su comportamiento durante la desorción térmica es el tercer aspecto a considerar. Evidentemente, la temperatura debe ser lo suficientemente alta como para que se produzca la completa desorción de todos los solutos en un tiempo razonable (Werkhoff y Bretschneider, 1.987b), y los materiales adsorbentes deben ser estables a las temperaturas de desorción para evitar la formación de excesivo ruido de fondo (Rudolph y col., 1.990).

### 1.3.2. Materiales utilizados como adsorbentes.

Aunque los requisitos que deben cumplir los adsorbentes sólidos son estrictos, existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados con este fin. A continuación se exponen las características más importantes que deben ser consideradas para efectuar la elección correspondiente.

### 1.3.2.1. Carbón activo.

El carbón activo fue el primer adsorbente utilizado con fines analíticos. Se prepara por oxidación del carbón vegetal, por lo que tiene una composición variable y una superficie heterogénea con numerosos puntos activos y distintos grupos funcionales. Presenta un amplio intervalo de diámetros de poro y su superficie específica es muy grande (300-1000 m<sup>2</sup>/g). Tiene una elevada capacidad de adsorción y un alto poder de retención (Witkiewicz y col., 1.991). Su estabilidad térmica es muy alta (700°C).

La eficacia de la adsorción es en general elevada, pero muy variable dependiendo del tipo de compuesto y de las condiciones experimentales.

Debido a su alto poder de retención, la desorción exige alcanzar elevadas temperaturas, lo que, por otro lado, suele producir la descomposición térmica de los compuestos adsorbidos. También es frecuente que su uso favorezca la adsorción irreversible de algunos analitos (Núñez y col., 1.984b). Un problema adicional del carbón activo es que presenta actividad catalítica para la oxidación y otras reacciones químicas, por lo que los compuestos adsorbidos pueden ser alterados. Además, el carbón activo tiene afinidad por el agua.

### 1.3.2.2. Polímeros porosos.

Se preparan mediante una reacción de polimerización en presencia de un reactivo que solubilice el monómero y que impida que el polímero alcance un elevado tamaño.

En comparación con el carbón activo, proporcionan recuperaciones más altas y una actividad catalítica mucho menor. Tienen una gran capacidad de carga, presentan afinidad por compuestos orgánicos neutros y poca afinidad por el agua, así como una fácil recuperación de la muestra por desorción térmica, aunque su estabilidad es limitada (Poole y Schuette, 1.983). Se deben someter a una purificación y acondicionamiento previos a su empleo.

#### **Serie Porapak.**

A esta serie pertenecen algunos de los polímeros más ampliamente utilizados en el análisis de compuestos volátiles: Porapak Q (copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno), Porapak R (copolímero de vinilpirrolidina y divinilbenceno), Porapak S (copolímero de vinilpiridina y divinilbenceno), y otros, como N, P, T, QS ó PS.

El área específica varía entre 100-200 m<sup>2</sup>/g (Porapak P) y 630-800 m<sup>2</sup>/g (Porapak Q), lo que permite obtener,

especialmente para el Porapak Q, que es el más empleado de la serie (Williams y col., 1.978), un elevado factor de enriquecimiento (Krejci y col., 1.974).

Durante la desorción, la temperatura no debe exceder de 200°C, ya que se producen degradaciones oxidativas, lo cual impide la recuperación efectiva de los analitos de media y baja volatilidad. Por ello, estos polímeros se usan principalmente para la separación de los solutos más volátiles.

#### **Serie Chromosorb.**

Los adsorbentes Chromosorb 101 al 108 y Chromosorb T son un grupo de polímeros de composición muy diferenciada. La superficie específica es variable: de pequeña superficie (101, 103, 104, 108 y T) y de elevada superficie, entre 300 y 800 m<sup>2</sup>/g (102, 105, 106 y 107).

La temperatura máxima que pueden alcanzar se encuentra entre 200 y 250°C, lo que limita la efectividad de la desorción térmica para compuestos de mediana o baja volatilidad. El Chromosorb 105 ha proporcionado los mejores resultados para compuestos muy volátiles (Cole, 1.980) y ha sido utilizado para el análisis de contaminantes en aguas y en el aire (Murray, 1.977, Churácek y col., 1.991) y para

compuestos volátiles en vino (Simpson, 1.979, Rapp y Knipser, 1.980).

Actualmente se comercializan materiales de selectividad muy similar a los adsorbentes de las series Porapak y Chromosorb 100 (series GasChrom y HayeSep) pero con mayor estabilidad térmica (máxima temperatura de operación 275-300°C).

#### **Tenax.**

El Tenax, poli(óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), se comercializa como Tenax GC y Tenax TA. Se obtienen de distinto modo, pero tienen la misma composición y las mismas características, difiriendo sólo, en cuanto a su empleo, en que la producción de artefactos, que dan lugar a ruido de fondo en el cromatograma, es menor cuando se utiliza el Tenax TA (Hutte y col., 1.984, MacLeod y Ames, 1.986).

El Tenax es el polímero orgánico adsorbente más utilizado, especialmente cuando la desorción se realiza térmicamente, debido a su alta estabilidad, ya que se puede calentar hasta 400°C sin que se produzca descomposición (Sakodynskii y col., 1.974). También se puede realizar la desorción en fase líquida (Leoni y col., 1.975 y 1.976) o con fluidos supercríticos (Hawthorne y Miller, 1.986).

El acondicionamiento del Tenax para su empleo es muy simple ya que únicamente exige mantenerlo a elevada temperatura con corriente de gas inerte (MacLeod y Ames, 1.986). No obstante, algunos autores aconsejan realizar previamente una extracción con disolventes con objeto de eliminar posibles impurezas (Werkhoff y Bretschneider, 1.987a, Bayer y col., 1.988, Flath y col., 1.990).

El Tenax tiene una superficie específica muy pequeña, entre 19 y 30 m<sup>2</sup>/g. Debido a ello, el volumen de ruptura de los solutos más volátiles es pequeño, por lo que para su aislamiento se deben optimizar cuidadosamente las condiciones de adsorción (Maier y Fieber, 1.988). La retención es mayor cuando el analito presenta insaturaciones; además, depende del momento dipolar de la molécula, disminuyendo la retención al aumentar la polaridad. De este modo, los compuestos más retenidos son los hidrocarburos aromáticos. Los alcoholes, especialmente los de bajo peso molecular, son retenidos muy débilmente, mientras que el agua apenas queda adsorbida. Ambas propiedades facilitan el empleo de Tenax para el análisis de muestras acuosas o hidroalcohólicas. Por otro lado, al disminuir la temperatura, la diferencia de retención entre el agua y los restantes compuestos es más acusada. Un dato importante es el hecho de que la presencia de agua no afecta a las características de retención (Sakodynskii y col., 1.974, Novotny y col., 1.974, Maier y Fieber, 1.988).

El Tenax es un material ampliamente utilizado en estudios de Contaminación Ambiental (Krost y col., 1.982, Crist y Mitchell, 1.986, Hancock y col., 1.991), del humo del tabaco (Holzer y col., 1.976, Zeldes y Horton, 1.978, Hu y Weiner, 1.980, Michael y col., 1.980, Shiaris y col., 1.980, Zlatkis y col., 1.981, Yokouchi y Sano, 1.991), y en Tecnología de Alimentos (Noble y col., 1.980, Rapp y Knipser, 1.980, Núñez y Maarse, 1.986, Takeoka y col., 1.988, Bolzoni y col. 1.990, Tabera y col., 1.991, ).

### 1.3.3. Estado actual de las técnicas de aislamiento y concentración internas con PTV

En los primeros trabajos referentes al estudio de las características de los distintos adsorbentes que pueden ser utilizados para rellenar el "glass-liner" del PTV, Herraiz y col. (1.987 y 1.989), compararon distintos materiales, empleando para su evaluación una mezcla de n-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub>, n-alcoholes C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>, ésteres etílicos C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub> y ácidos carboxílicos C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, concluyendo que el Tenax GC posee características adecuadas y permite obtener una buena exactitud y precisión, incluso con solutos en baja concentración. Loyola y col. (1.989) aplicaron los anteriores resultados al análisis de extractos de destilados vínicos.

Con posterioridad al inicio del presente trabajo, Grob (1.990) desarrolló la técnica denominada "PTV vapor overflow"

para introducir elevados volúmenes de muestra. El líquido se introduce lentamente en una cámara de vaporización, rellena con un adsorbente, a una temperatura superior al punto de ebullición del disolvente, a presión atmosférica o a vacío, y prácticamente sin flujo de gas portador. En estas condiciones, el disolvente se evapora, se expande y por sobrepresión sale de la cámara de vaporización. Staniewski y Rijks (1.991, 1.992a, 1.992b y 1.993) comenzaron a estudiar la influencia de diversas variables en la recuperación durante la inyección de elevados volúmenes de muestra para obtener la concentración interna en el PTV. Las variables estudiadas son: el tipo de adsorbente, la presión y el flujo de gas portador, la velocidad de inyección, el tiempo de purga tras la finalización de la inyección y el tipo de disolvente. También proponen un diseño específico del "glass liner" y señalan que mediante este sistema se pueden introducir hasta 1000  $\mu\text{L}$  de muestra, aunque solo obtienen resultados aceptables para compuestos de media o baja volatilidad.

Aunque se conoce la influencia individual de algunas de las variables que afectan a la recuperación en el proceso de concentración interna, se debe considerar la posibilidad de interacción entre algunas de ellas por lo que la experimentación conducente a la optimización del proceso debe planificarse desde una perspectiva global. Para ello se pueden utilizar Técnicas de Diseño Experimental.

Hasta el momento no se han encontrado referencias de trabajos sobre optimización de procesos de concentración interna en un PTV.

#### 1.4. OPTIMIZACION DE PROCESOS MEDIANTE TECNICAS ESTADISTICAS DE DISEÑO EXPERIMENTAL.

La optimización de un determinado proceso se puede realizar estudiando independientemente la influencia de cada una de las variables. Cuando hay pocas y son independientes entre sí, este procedimiento proporciona resultados satisfactorios. Sin embargo, si el número de variables es elevado, las experiencias a realizar para llevar a cabo la optimización pueden resultar excesivas y, lo que es más importante, si existe interacción entre las variables, es decir, si la influencia de una de ellas depende de los valores a los que se encuentran las demás, esta metodología puede conducir a resultados erróneos. En estos casos es preferible planificar la optimización mediante métodos estadísticos de diseño de experiencias, cuyo objetivo es obtener las condiciones óptimas de un proceso con la máxima seguridad y un esfuerzo experimental racional. Algunas de las ventajas atribuidas a los diseños de experiencias son las siguientes:

- Pueden estudiarse distintas variables simultáneamente.

- Pueden determinarse interacciones entre las variables.
- Con frecuencia, en comparación con los enfoques tradicionales, se reduce el número de experimentos necesarios.
- Se observa cada efecto en distintas condiciones, dando validez más general a las conclusiones.
- Se estima la fiabilidad de la información en base a la variación de los datos experimentales.

Para optimizar las principales variables que influyen en la técnica de aislamiento, concentración e inyección que se describe en la presente Memoria, se han empleado dos métodos estadísticos de optimización: de Superficie de Respuesta, y de Optimización Autodirigida. A continuación se exponen los fundamentos de cada uno de ellos.

#### 1.4.1. Método de Superficie de Respuesta.

El caso más sencillo corresponde al estudio de la influencia de dos variables (factores) en un proceso del cual se está midiendo algún aspecto cuantitativo al que se denomina respuesta. Para cada combinación de los dos factores se obtiene un valor de la respuesta. Si se representa en un diagrama este valor en función de cada una de las combinaciones estudiadas de las dos variables, se obtiene una representación tridimensional de una superficie curva,

denominada superficie de respuesta, en la que en dos ejes se representa el valor de cada uno de los factores, y en el tercero la respuesta obtenida en cada caso (Figura 8a).

Cuando determinados valores de la superficie de respuesta se proyectan sobre el plano correspondiente a los factores, y se unen mediante líneas los puntos de igual respuesta (líneas de isorrespuesta) se obtiene una representación análoga a la de un mapa topográfico (Figura 8b).

Si se estudia la influencia de  $k$  factores en una determinada respuesta, se obtiene una representación de una hipersuperficie de respuesta en un espacio de  $k+1$  dimensiones. Para poder visualizar dicha superficie, habría que fijar a distintos niveles los valores de  $k-2$  factores y proyectarla posteriormente sobre el plano formado por los dos factores no fijados.

Como es obvio, no pueden realizarse medidas en cada punto del dominio experimental. Por ello se recurre a modelos matemáticos para describir el comportamiento del proceso estudiado. Experimentando en pocos puntos adecuadamente seleccionados, pueden estimarse, por regresión, los coeficientes del modelo, que normalmente es de tipo polinómico.

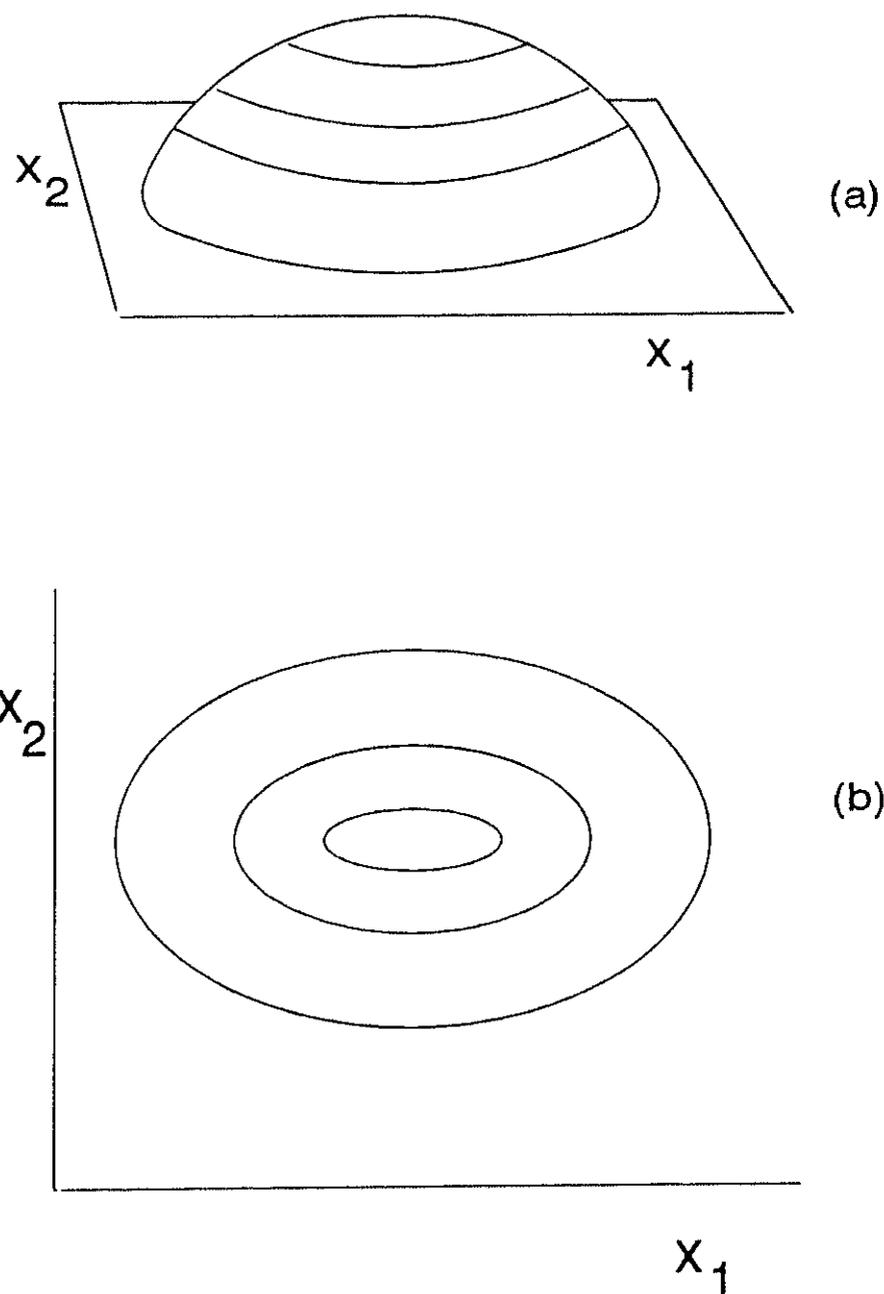


Figura 8. Método de Superficie de Respuesta. (a) Representación tridimensional de la superficie de respuesta; (b) Proyección de esta superficie sobre un plano (Box y col., 1.988).

Si la superficie de respuesta presenta curvatura, el polinomio debe ser como mínimo de segundo grado. Habitualmente, no se emplean polinomios de grado superior porque la mayoría de los procesos quedan suficientemente bien descritos con los de segundo grado.

En el diseño de superficie de respuesta se pretende estimar los valores de los coeficientes del modelo, partiendo para ello del mínimo número posible de experiencias. El empleado en la investigación objeto de esta Memoria, es el diseño compuesto central y rotativo de Box y Hunter (1.957). Este diseño es ortogonal, lo que supone que las estimaciones de los coeficientes no están correlacionadas unas con otras. La consecuencia inmediata de ello es que esas estimaciones son más eficaces (de menor varianza) que cualquier otra realizada en condiciones de no ortogonalidad.

El proceso se genera a partir de un diseño factorial a dos niveles, con lo que se estiman todos los efectos principales y las interacciones binarias, y al que posteriormente se le añaden nuevos puntos (diseño compuesto). Parte de estos puntos, denominados de la estrella, se sitúan radialmente a una distancia  $\alpha$  del centro del diseño para determinar los efectos cuadráticos. Los otros puntos añadidos corresponden a una experimentación realizada en el centro del diseño (diseño central), y permiten estimar el error experimental y la falta de ajuste del modelo.

El número de puntos en el centro y el valor de  $\alpha$  son elegidos de tal manera que el diseño sea rotativo, lo que asegura que la varianza de las respuestas estimadas tiene simetría esférica, dependiendo sólo de la distancia al centro del diseño, no de la dirección, ya que no hay motivo para privilegiar las estimaciones en determinadas direcciones.

En la Figura 9 se puede observar la disposición de los puntos experimentales para diseños de tres factores. El valor de  $\alpha$  es en este caso 1.682. Las coordenadas matemáticas de los puntos experimentales de este diseño se presentan en la Tabla 1.

Para traducir las coordenadas matemáticas a coordenadas físicas, hay que tener en cuenta que el intervalo entre  $-\alpha$  y  $\alpha$  corresponde al intervalo experimental que se desea estudiar. Por tanto, para cada variable, el valor físico de  $-\alpha$  es el valor mínimo del intervalo de estudio de dicha variable, y el de  $\alpha$  el valor máximo. El valor físico de cero será la media de ambos valores extremos, y el de  $+1$  ó  $-1$  se calculan de modo inmediato a partir de los valores físicos y matemáticos de  $\alpha$ . Con los valores físicos así calculados se lleva a cabo la experimentación, obteniendo un valor de la respuesta para cada punto del diseño.

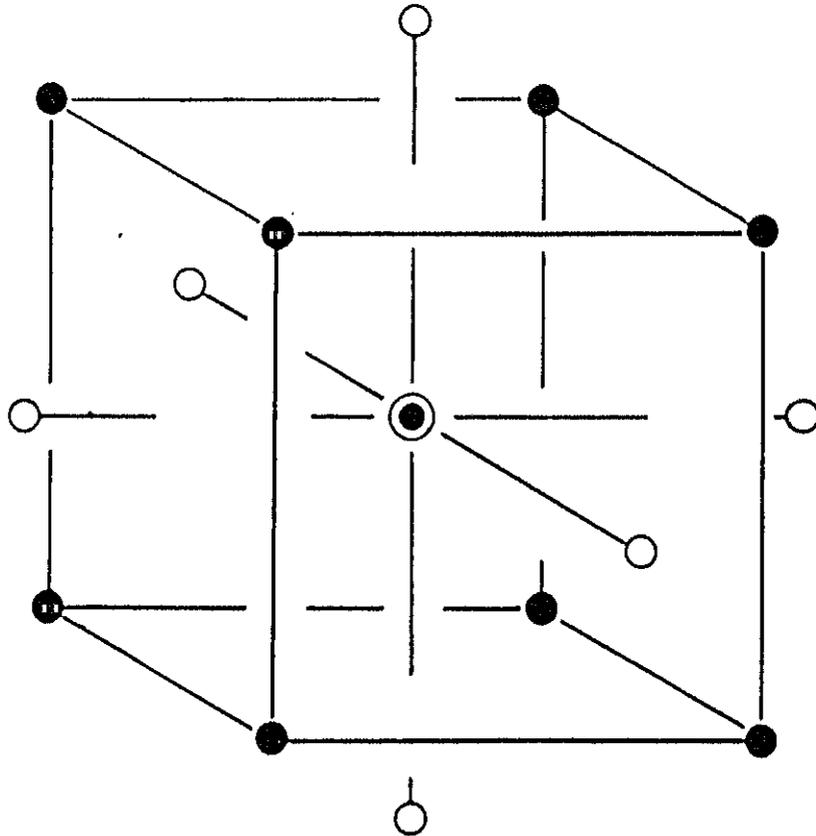


Figura 9. Puntos experimentales del diseño compuesto central y rotativo para tres variables (Bayne y Rubin, 1.986, Box y col., 1.988).

Tabla 1. Coordenadas matemáticas de los puntos experimentales del diseño compuesto central y rotativo con tres variables.

$X_1$	$X_2$	$X_3$
-1	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
1	1	1
-1.682	0	0
1.682	0	0
0	-1.682	0
0	1.682	0
0	0	-1.682
0	0	1.682
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Una vez calculados los valores de la respuesta, se estiman por regresión los coeficientes del modelo, y finalmente se establece la ecuación que describe el comportamiento del sistema dentro del intervalo experimental.

De los valores obtenidos en el centro se calcula el error experimental. A partir de este cálculo se puede decidir si las diferencias entre las respuestas a distintos niveles de las variables son fruto de su modificación, en cuyo caso el modelo sería significativo, o si por el contrario, estas diferencias son consecuencia exclusivamente del error experimental.

En el caso de que el modelo sea significativo, se puede estimar el valor que presentará la respuesta para cada posible combinación de las variables y, por tanto, se pueden deducir, dentro del campo experimental, las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso (Bayne y Rubin, 1.986, Box y col., 1.988).

El método de Superficie de Respuesta ha sido empleado en optimizaciones de diversos procesos (Rubin y col., 1.971, Burtis y col., 1.981, Lindberg y col., 1.981, Matthews y col., 1.981, Tabera, 1.990), incluyendo aquellos en los que se utiliza la Cromatografía de Gases (Morgan y Jacques, 1.978).

#### 1.4.2. Método de Optimización Autodirigida.

El método de Optimización Autodirigida, también denominado método Simplex o de los Símplices Sucesivos fue propuesto por primera vez por Spendley y col. (1.962).

Un procedimiento de optimización autodirigida consiste, esencialmente, en medir los efectos que producen en el comportamiento de un proceso, determinados cambios en las variables de operación y deducir de los resultados las direcciones en que deben realizarse sucesivos cambios para obtener mejoras en dicho comportamiento. La respuesta debe ser cualquier magnitud en función de la cual interese estudiar el comportamiento del proceso y a la vez permita obtener una representación del mismo.

Una representación de este tipo se muestra en la Figura 10, junto con el procedimiento seguido para una optimización de dos variables por el método Simplex. Inicialmente, se parte de tres puntos experimentales, A, B y C (Figura 10a), que definen las experiencias a realizar en el primer simplex. En función de los resultados, se debe rechazar aquel que proporcione la respuesta más desfavorable, en este caso el vértice A. Por aplicación del método se obtiene el punto D, que resulta de la reflexión de A con respecto al punto medio de la arista BC (Figura 10b). El segundo simplex queda

constituido por las experiencias B, C y D, de las que resultará rechazada la B por proporcionar la peor respuesta de las tres. Se obtendrá un nuevo simplex constituido por las experiencias C, D y E, y así se continua sucesivamente hasta aproximarse al óptimo (Figura 10c).

Si el número de variables es tres, la figura que se repite es un tetraedro regular representado en un espacio de tres dimensiones, y en general, para k variables se obtendría un hiperpoliedro regular con k+1 vértices en un espacio de k dimensiones, denominado simplex.

El procedimiento operativo para la optimización mediante el método Simplex exige las siguientes consideraciones:

- 1) Elegir una respuesta a optimizar así como las variables con las que se va a trabajar.
- 2) Construir el simplex inicial, de k dimensiones, que viene definido por la matriz  $S_0$  [1].

$$S_0 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ p & q & q & \dots & q \\ q & p & q & \dots & q \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ q & q & q & \dots & p \end{pmatrix} \quad [1]$$

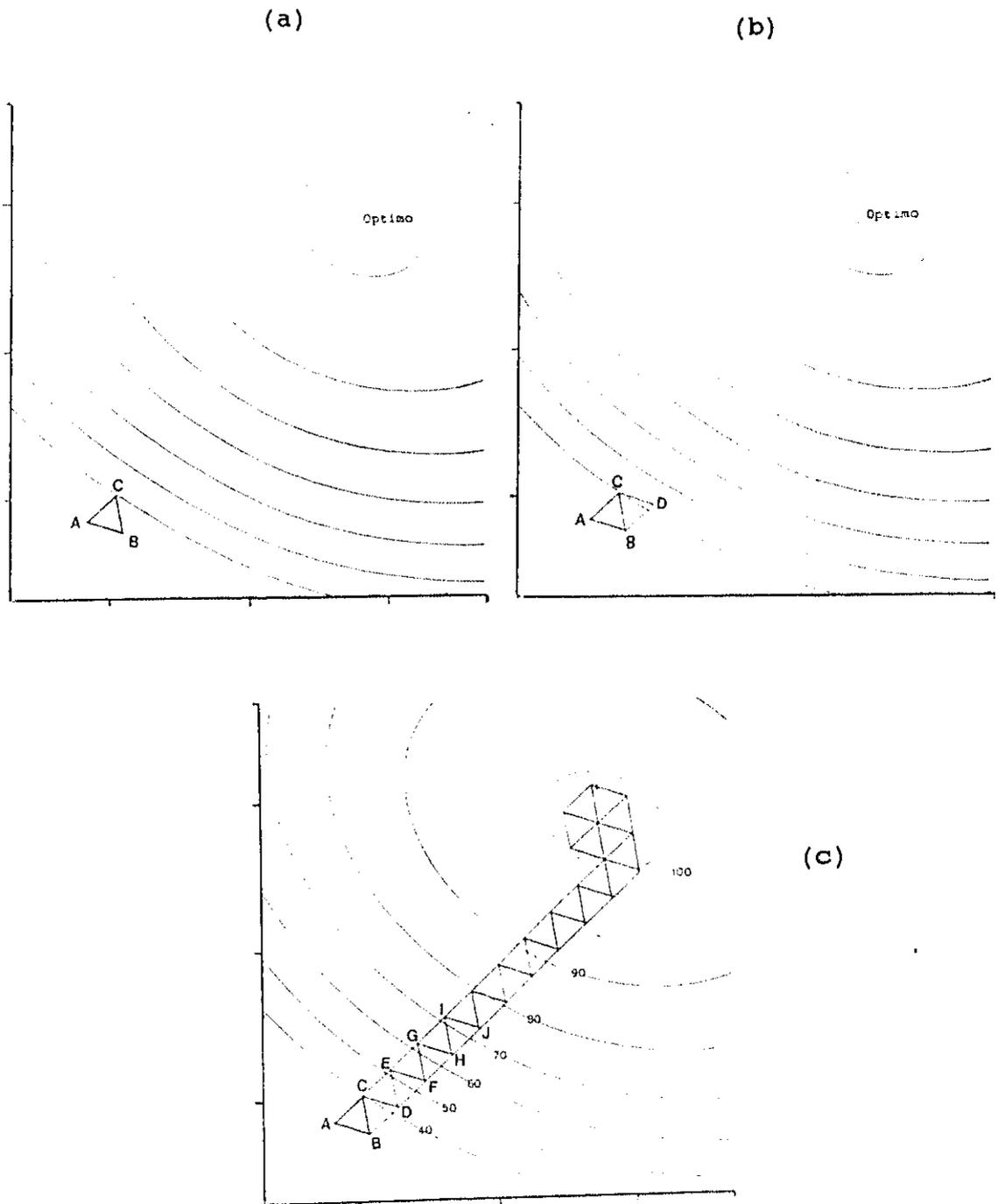


Figura 10. Representación gráfica del método Simplex de Optimización Autodirigida. (Para más detalles ver texto).

donde:

$$p = (1/1.414 k) [(k+1) + (k+1)^{1/2}] \quad [2]$$

$$q = (1/1.414 k) [(k+1)^{1/2} - 1] \quad [3]$$

Las filas de la matriz proporcionan las  $k$  coordenadas de los  $k+1$  vértices del simplex mientras que las columnas indican los distintos valores a ensayar para cada variable. Cada vértice representa una experiencia y cada coordenada el valor correspondiente de una de las variables consideradas.

Los valores de  $0$ ,  $p$  y  $q$  de las ecuaciones [1 a 3] son las coordenadas matemáticas. Los valores físicos de las variables investigadas pueden calcularse a partir de las matemáticas aplicando [4].

$$X_{fis} = X_0 + X_{mat} S_z \quad [4]$$

donde  $X_{fis}$  es el valor físico de la variable  $X$ ,  $X_{mat}$  es la correspondiente coordenada matemática,  $X_0$  el valor físico del punto de partida, (o nivel de base de dicha variable) y  $S_z$  su módulo de paso. El nivel de base de cada variable puede elegirse arbitrariamente. La primera fila de la matriz del simplex inicial representa el punto experimental de partida, en que todas las variables aparecen en su nivel de base. Suelen escogerse estos valores de modo que el punto de

partida corresponda a las mejores condiciones conocidas. El módulo de paso representa la magnitud relativa del cambio que sufre cada variable en cada paso. Se debe intentar utilizar valores de módulo de paso tales que la modificación del valor de cada factor en las distintas experiencias produzca un cambio comparable en la respuesta.

3) Generar los sucesivos símplexes. Una vez realizadas las experiencias del simplex inicial,  $S_0$ , se identifica el vértice  $V_p$  de peor respuesta y se lleva a cabo una nueva experiencia en un nuevo punto  $V_n$ , simétrico de  $V_p$  respecto al hiperplano formado por los vértices restantes. Se obtiene así un nuevo simplex,  $S_1$ , formado por  $V_n$  y todos los vértices de  $S_0$  excepto  $V_p$ . Las coordenadas del nuevo vértice, en notación vectorial, se calculan a partir de la ecuación [5]:

$$V_n = V_c + (V_c - V_p) \quad [5]$$

donde  $V_c$  es el centroide de los vértices retenidos (comunes a ambos símplexes) según [6]:

$$V_c = 1/k (V_1 + V_2 + \dots + V_{p-1} + V_{p+1} + \dots + V_k) \quad [6]$$

Para progresar en el proceso de optimización se aplica el mismo procedimiento para avanzar de  $S_1$  a  $S_2$ , de  $S_2$  a  $S_3$ , y así sucesivamente.

Se han descrito varias limitaciones del método Simplex, entre las que cabe destacar como fundamental que la elección del módulo de paso de cada etapa, el valor de  $S_z$ , al principio de la optimización condiciona tanto la velocidad de progreso a lo largo de todo el procedimiento como la precisión en la localización del óptimo al final del mismo, lo que le confiere cierta rigidez. Por ello, Nelder y Mead (1.965) introdujeron el **método Simplex Modificado**, mediante el cual se puede aumentar o disminuir el alcance de cada movimiento dependiendo de los resultados que se vayan obteniendo.

Las coordenadas del nuevo vértice se calculan en este caso mediante la ecuación [7].

$$V_n = V_c + \alpha (V_c - V_p) \quad [7]$$

donde  $\alpha$  es el denominado coeficiente de expansión o contracción. Si a  $\alpha$  se le da el valor 1, se realizará una reflexión normal obteniéndose el vértice simétrico de  $V_p$  (punto A de la Figura 11), del mismo modo que en el método no modificado. A lo largo del proceso de optimización los valores de  $\alpha$  se establecen mediante la aplicación de reglas concretas (Nelder y Mead, 1.965, Deming y Morgan, 1.973, Bayne y Rubin, 1.986, Tabera, 1.989), produciéndose

expansiones o contracciones negativas en los movimientos, según se ilustra en la Figura 11.

De acuerdo con las reglas del Simplex, se continúa avanzando según el procedimiento previamente descrito hasta que se produzca alguna o varias de las siguientes circunstancias:

- El tamaño de cada paso es muy pequeño, o dicho de otro modo, la modificación observada en las variables es muy escasa, lo cual puede estar predeterminado cuantitativamente.

- El nivel de optimización alcanzado se considera suficiente.

- El número de experiencias realizadas ha alcanzado un límite previamente fijado

- Durante varios símplex seguidos no se consigue mejorar la respuesta.

El método Simplex ha sido ampliamente utilizado para la optimización empírica de diversos procesos (Chubb y col., 1.980, Stieg y Nieman, 1.980, Siegel, 1.981, Berridge, 1.982, Leggett, 1.983, Burgess y Hayumbu, 1.984), incluyendo separaciones en Cromatografía de Gases (Holderith y col., 1.976, Yang y col., 1.978, Rubin y Bayne, 1.979, McMinn y col., 1.984, Tabera y col., 1.991, Ho y Tang, 1.992).

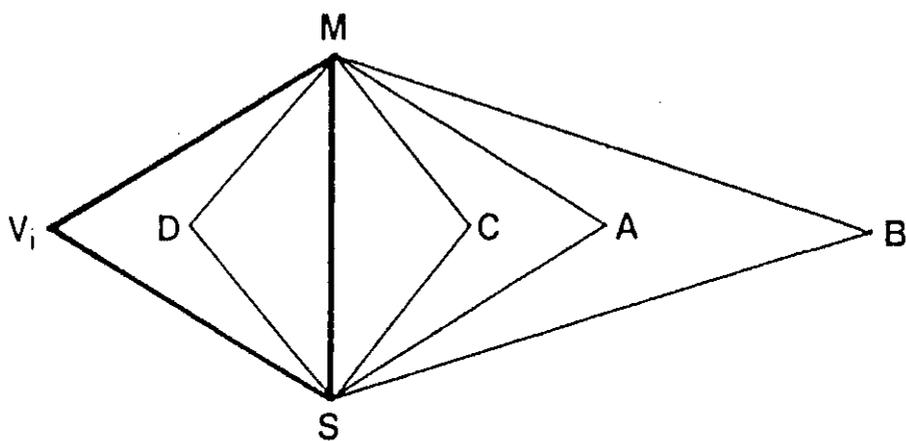


Figura 11. Método Simplex Modificado de Optimización Autodirigida. (Para más detalles ver texto).

**1.5. ANALISIS DEL AROMA DE BEBIDAS ALCOHOLICAS.**

El aroma de las bebidas alcohólicas está constituido por una mezcla compleja de compuestos volátiles de naturaleza variada, estando muchos de ellos presentes en muy baja concentración. Los componentes mayoritarios de la matriz son el agua y el etanol que, pese a ser muy volátiles, afectan negativamente al proceso gas cromatográfico. Por ello, el análisis de estas muestras se aborda mediante técnicas de preseparación y preconcentración.

La presencia de etanol, que puede encontrarse en concentraciones de hasta el 50% (v/v) en algunos destilados, limita las posibilidades de elección de la técnica de extracción a utilizar. En la mayoría de los casos se recurre a la extracción líquido-líquido y posterior concentración por evaporación del disolvente.

El análisis de componentes volátiles en vino y destilados es de gran interés en Enología para la caracterización de diversos productos y para la definición y control de su calidad, así como para la detección de posibles adulteraciones o de compuestos tóxicos.

Por otro lado, la idea de aplicar nuevos desarrollos analíticos al estudio del aroma de alimentos y bebidas se repite frecuentemente en la bibliografía desde hace unos años, ya que las características de este tipo de muestras las hacen especialmente indicadas para comprobar la validez de nuevos métodos relativos al análisis de compuestos volátiles en mezclas complejas.

Por estas razones se decidió llevar a cabo la aplicación del método de introducción directa de elevados volúmenes de muestra, desarrollado en esta Memoria, al análisis de bebidas alcohólicas de distinta graduación: vino y destilados vínicos. Entre estos se eligió el pisco chileno, destilado procedente de uva Moscatel, por su aroma de especial riqueza.

#### 1.5.1. Componentes del Aroma del Vino.

Hasta el momento se han identificado más de 500 compuestos volátiles en vinos de distintas procedencias y obtenidos a partir de diversas variedades de uva (Schreier y col., 1.976 y 1.979, Herraiz, 1.980, Williams, 1.982, Etievant y Bayonove, 1.983, Marais, 1.983, Nykänen y Suomalainen, 1.983, MacDonald y col, 1.984, Di Stefano, 1.985, Reglero, 1.985, Gonzalez, 1.986, Montedoro y Bertuccioli, 1.986, Nykänen, 1.986, Herraiz, 1.989, Maarse y

Visscher, 1.989). Los recientes desarrollos de tecnología analítica han contribuido decisivamente a incrementar el número de compuestos conocidos (Maarse y Belz, 1.985). Herraiz y col. (1.991) describen un total de 132 componentes volátiles en vinos españoles, incluyendo, entre otros compuestos, 24 alcoholes, 38 ésteres, 10 compuestos carbonílicos, 14 terpenos y 21 ácidos carboxílicos. Las concentraciones oscilan entre 0.1 y 200 mg/L.

#### 1.5.2. Componentes del Aroma del Pisco.

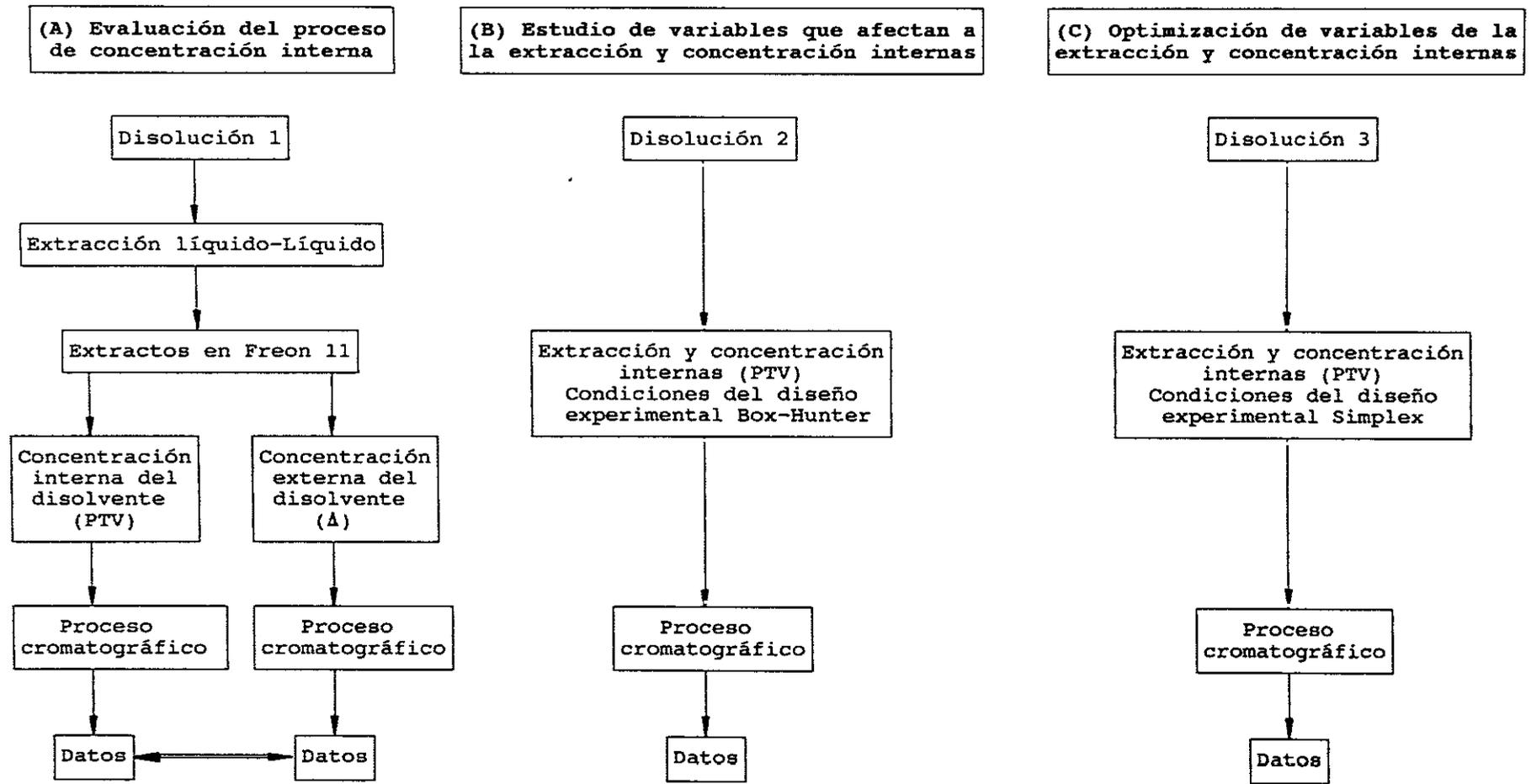
La composición volátil del pisco varía considerablemente, dependiendo de la procedencia de la muestra analizada (Ureta y col., 1.986, Loyola y col., 1.989). Un estudio detallado de la composición de este producto ha sido llevado a cabo por Herraiz y col. (1.990). Destaca el contenido en compuestos terpénicos, presentes en concentraciones entre 0.05 y 10 mg/L. Además, se han detectado ésteres, alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y otros compuestos comunes al resto de las bebidas alcohólicas.

## 2. MATERIAL Y METODOS

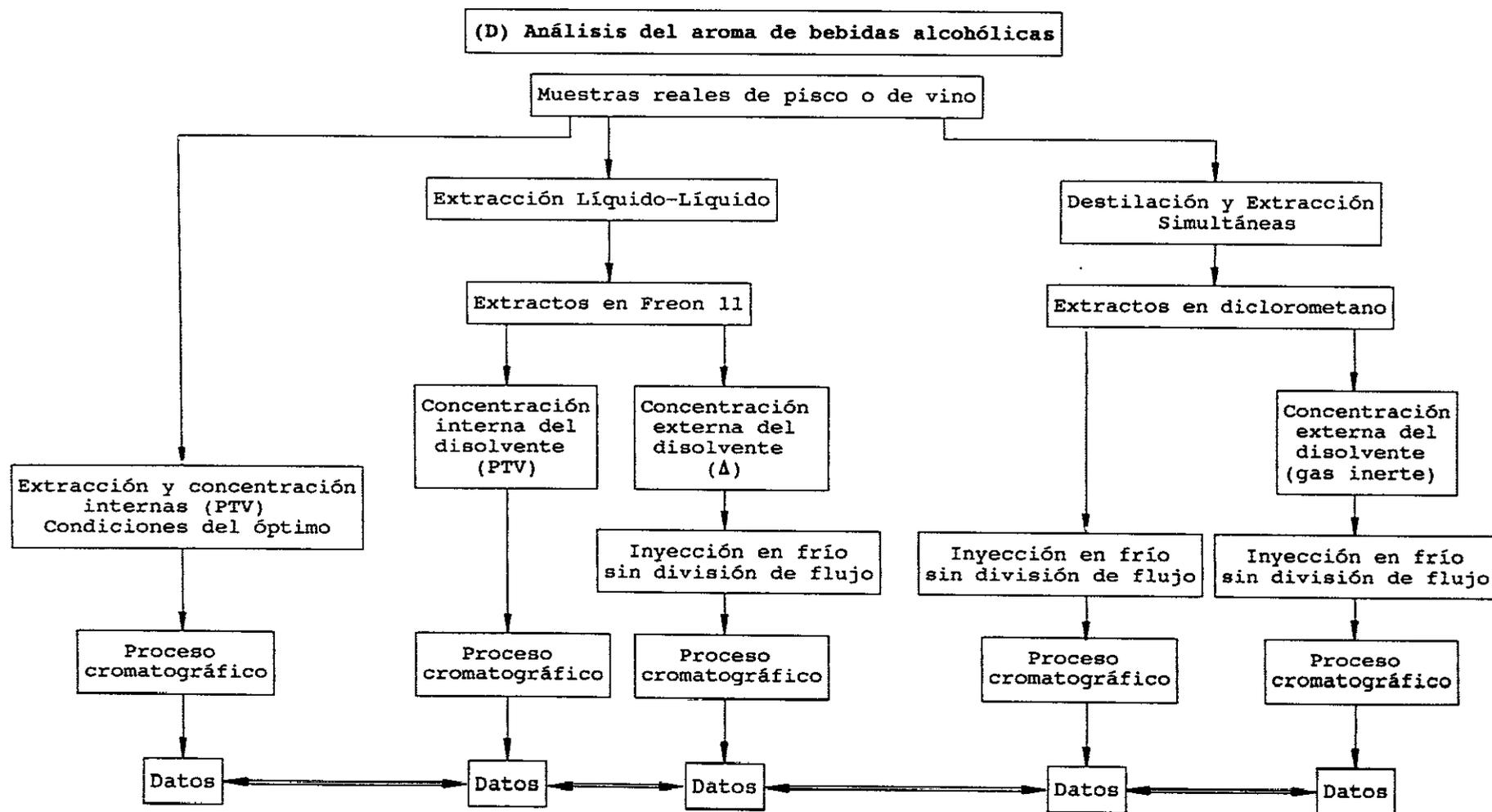
Los métodos experimentales estudiados incluyen la concentración externa (mediante calentamiento) e interna (en el inyector PTV) de la muestra, la extracción y concentración internas en el citado inyector y el análisis directo de muestras reales por inyección de volúmenes elevados en el cromatógrafo de gases. La experimentación realizada incluye igualmente la evaluación y optimización de las principales variables que afectan al proceso de extracción y concentración internas. Además, con objeto de comparar los resultados obtenidos a partir del método propuesto en esta Memoria con los proporcionados por otros procedimientos habitualmente empleados, se consideraron dos técnicas clásicas, la Extracción Líquido-Líquido y la Destilación y Extracción Simultáneas.

El procedimiento experimental aplicado, que se resume en el Esquema 1, se detalla posteriormente considerando por separado los distintos procesos estudiados (apartados A, B, C y D).

Esquema 1. Proceso experimental.



Esquema 1. Continuación.



## 2.1. MUESTRAS

Dependiendo del estudio a realizar en cada caso, se emplearon distintas disoluciones modelo y muestras reales cuya composición y características se resumen a continuación.

### 2.1.1. Disoluciones modelo.

Todos los compuestos volátiles incluidos en las distintas disoluciones modelo consideradas se encuentran habitualmente en alimentos y bebidas alcohólicas. El disolvente, así como los intervalos de concentración de los solutos, fueron escogidos de modo que la mezcla sintética presentase una composición volátil representativa de la de bebidas alcohólicas de distinta graduación.

#### (A) Evaluación del proceso de concentración interna con PTV.

##### Disolución 1

La disolución empleada contenía una mezcla de compuestos frecuentemente detectados en extractos líquido-líquido con Freon 11 de bebidas alcohólicas. Los compuestos incluidos en la disolución son los siguientes: Pentanoato de etilo, trans-2-hexenal, acetato de hexilo, cis-3-hexen-1-ol, octanoato de metilo, trans-2-hexen-1-ol, lactato de isoamilo,  $\alpha$ -terpineol,

succinato de dietilo, ácido pentanoico, acetato de 2-feniletilo (p.i.), ácido hexanoico, 2-feniletanol, ácido nonanoico y ácido decanoico. Con el propósito de cubrir las concentraciones más frecuentes descritas para este tipo de muestras, se utilizaron tres disoluciones distintas en las que cada compuesto se encontraba en cada caso en concentraciones de 0.5, 2 y 5 mg/L (Disoluciones 1a, 1b y 1c). La preparación de estas disoluciones se llevó a cabo a partir de una mezcla de los compuestos puros almacenada a -20°C. En el momento de iniciar la experimentación con cada disolución, se disolvieron en etanol/agua al 10% (v:v) las cantidades adecuadas de dicha mezcla para obtener cada una de las disoluciones con distinta concentración.

**(B) Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.**

### Disolución 2

La disolución modelo utilizada contenía una mezcla de compuestos representativa del intervalo de polaridad y volatilidad de los componentes del aroma de bebidas alcohólicas. Los solutos y sus concentraciones son los siguientes: Pentanoato de etilo (0.1 mg/L), trans-2-hexenal (0.1 mg/L), acetato de hexilo (0.1 mg/L), trans-2-hexen-1-ol (0.1 mg/L), succinato de dietilo (0.6 mg/L),  $\alpha$ -terpineol

(1.2 mg/L), acetato de 2-feniletilo (p.i.) (0.3 mg/L) y 2-feniletanol (0.3 mg/L). Para preparar esta disolución se partió de una mezcla de los compuestos puros en la proporción adecuada para obtener las concentraciones indicadas y se disolvió en etanol/agua al 12% en volumen (grado alcohólico típico del vino). Con objeto de evitar la evaporación de los compuestos más volátiles, la mezcla se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y se realizó la dilución correspondiente con anterioridad al comienzo de cada análisis.

**(C) Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.**

### Disolución 3

La disolución empleada contenía una mezcla de ésteres y alcoholes disueltos en etanol/agua al 50% (v:v) con una concentración de 0.1 mg/L. La utilización de una alta proporción de etanol en la muestra tenía como objetivo hacer extensivo el método de introducción directa a bebidas de mayor graduación alcohólica que el vino. Los compuestos incluidos son los siguientes: pentanoato de etilo, 1-butanol, hexanoato de etilo, 1-pentanol, heptanoato de etilo, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-octanol. Los citados solutos, integrantes de dos series homólogas, se eligieron en base a su facilidad de localización en cromatogramas que, debido a

las características del diseño experimental a realizar, se obtuvieron en condiciones cromatográficas muy diferentes. Por otro lado, se mantenía cubierto un amplio intervalo de polaridad y volatilidad. De modo análogo a la anterior, para obtener esta disolución se preparó previamente una mezcla de los compuestos con la misma cantidad de cada uno de ellos y se disolvió el volumen adecuado en etanol/agua (50% v:v). También en este caso, con objeto de evitar la evaporación de los compuestos más volátiles, la mezcla inicialmente preparada se mantuvo a -20°C, y se preparó una disolución nueva para cada experiencia.

#### 2.1.2. Muestras reales.

(D) **Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa.**

El análisis del aroma de bebidas alcohólicas se realizó a partir de muestras comerciales de pisco y de vino.

La muestra de pisco, que como ya se ha señalado es una bebida alcohólica originaria de Chile obtenida por destilación de vino elaborado con uva moscatel, tenía un grado alcohólico de 45°, mientras que la muestra de vino (D.O. Ribera del Duero), elaborado con uva de variedad Verdejo, tenía un grado alcohólico de 12°. Como se ha

comentado anteriormente, ambas muestras se seleccionaron considerando su riqueza aromática.

## 2.2. TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACION EXTERNAS.

### 2.2.1. Extracción Líquido-Líquido.

La Extracción Líquido-Líquido se llevó a cabo en un extractor clásico, representado en la Figura 3a (pg. 28), comercializado por la firma "Pobel". Se extrajeron 250 mL de muestra con 150 mL de Freon 11 bidestilado, durante 24 horas. Para calentar el matraz que contiene el disolvente se utilizó un baño de agua a 32°C. El líquido refrigerante, agua con etilenglicol, se enfrió a 1°C mediante un criostato Hetofrig.

Se realizaron extracciones líquido-líquido a partir de la Disolución 1 y de muestras reales. En todos los casos en los que se llevó a cabo la concentración externa del extracto obtenido se procedió al calentamiento de la muestra, empleando un baño de agua mantenida a 32°C, después de haberla depositado en un matraz conectado a una columna Vigreux de 50 cm. El extracto de la Disolución 1a (pg. 90) se concentró en una proporción 1:250, y los de las Disoluciones 1b y 1c en proporción 1:50.

En el caso de muestras reales, una vez terminada la extracción, se añadieron a cada uno de los extractos obtenidos 0.2  $\mu$ L de octanoato de metilo (patrón interno). Antes de la inyección en el cromatógrafo de gases, se concentró el extracto hasta un volumen final de unos 5 mL.

### 2.2.2. Destilación y Extracción Simultáneas.

La Destilación y Extracción Simultáneas se aplicó a muestras reales empleando la microversión del extractor descrita por Godefroot y col. (1.981 y 1.982), representado en la Figura 5 (pg. 36) y comercializado por la firma "Chrompack". El disolvente empleado fue diclorometano bidestilado.

Durante la experimentación se observó que al realizar la extracción con muestras de elevado grado alcohólico no se producía la necesaria separación de las fases de diclorometano y la mezcla hidroalcohólica. Para solucionar este problema se realizaron diversos ensayos y se estableció finalmente que una dilución de las muestras de vino y pisco hasta un grado alcohólico igual a 3 (lo que supuso una dilución 1:4 para el vino, y 1:15 para el pisco), permitían realizar la extracción.

El volumen de muestra diluida empleado para la extracción fue 250 mL, y el de diclorometano 2 mL. La muestra se calentó en un baño de silicona, el cual se mantuvo en agitación y a una temperatura de 120°C mediante una placa calefactora con agitador magnético. Para calentar el disolvente se empleó un baño de agua a 50°C. Por el lado frío del extractor se hizo circular una mezcla de agua y etilenglicol a una temperatura de -5°C, mediante un criostato Frigomix. El proceso de extracción se mantuvo durante un tiempo de 90 minutos. También en este caso se empleó octanoato de metilo (0.2 µL) como patrón interno.

### 2.3. CROMATOGRAFIA DE GASES.

#### 2.3.1. Equipo.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 8310, con inyector PTV Perkin-Elmer y con detector de ionización de llama.

El tratamiento de datos se llevó a cabo mediante dos sistemas. El primero de ellos, empleado para la (A) evaluación de la concentración interna con PTV y para el (B) estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV, fue el procesador de datos

Perkin Elmer incorporado al cromatógrafo de gases. El segundo sistema, utilizado en la (C) Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV y en el (D) Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa, fue el programa informático de tratamiento de datos Perkin-Elmer 2600 rev. 5.0. En este caso, los datos que suministra el cromatógrafo de gases se transfieren mediante una interfase a un ordenador personal en el que se procesan mediante el citado programa. Los cromatogramas quedan grabados en "diskettes" y se pueden reprocesar posteriormente.

Se emplearon dos columnas cromatográficas:

- Columna 1: Para la (A) evaluación del proceso de concentración interna con PTV, se utilizó una columna capilar SGE de sílice fundida de 50 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, con un espesor de película de fase de 0.25  $\mu\text{m}$  de Carbowax 20M.

- Columna 2: Para el resto de la experimentación se empleó una columna capilar SGE de sílice fundida de 50 m de longitud y 0.22 mm de diámetro interno, con un espesor de 0.25  $\mu\text{m}$  de fase entrecruzada BP-21.

El inyector PTV Perkin-Elmer utilizado fue el diseñado originalmente por Poy y col. (1.981 y 1.982), cuyo esquema está representado en la Figura 7 (pg. 49).

Se empleó un "glass liner" de cuarzo con una longitud de 90 mm, un diámetro interno de 1 mm, y un diámetro externo de 2 mm. La naturaleza y características del relleno utilizado en el "glass-liner" variaron en función del estudio realizado (A, B, C ó D), según se detalla a continuación.

**(A) Evaluación del proceso de concentración interna con PTV y (D) Análisis de extractos líquido-líquido de bebidas alcohólicas mediante concentración interna.**

La concentración interna de los extractos líquido-líquido se realizó utilizando el "glass-liner" relleno con Tenax GC 80/100 mesh (2 cm). Con objeto de evitar el desplazamiento del adsorbente, se situó 1 cm de lana de vidrio en ambos extremos. El disolvente se elimina recurriendo a la división de flujo, y la propia columna capilar, que se introduce 1 cm en el "glass liner", impide el avance del Tenax y la lana de vidrio, compensando de este modo el desplazamiento que en otras circunstancias podría ser causado por el gas portador.

**(B) Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.**

En este caso, el "glass liner" se rellenó con 2 cm de Tenax TA 80/100 mesh sujeto por 1 cm de lana de vidrio en cada extremo del adsorbente.

**(C) Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.**

Se empleó como material adsorbente una mezcla de Tenax TA 80/100 mesh y de GasChrom 220 80/100 mesh en la proporción y longitud indicados por el diseño experimental, según se detalla posteriormente. También en este caso se empleó 1 cm de lana de vidrio en cada extremo del adsorbente.

**(D) Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa.**

El análisis por inyección directa del aroma de bebidas hidroalcohólicas se llevó a cabo rellenando el "glass liner" tal y como se ha descrito en el apartado anterior, si bien la proporción y longitud de adsorbente utilizadas correspondían en este caso a los valores previamente optimizados: un 55.5% de GasChrom 220, un 44,5% de Tenax TA, y 4.5 cm de longitud de mezcla de adsorbentes.

Cuando la extracción y la concentración se realizan internamente en el PTV (es decir, en los casos B, C y en los análisis de muestras reales por inyección directa), la columna se desconecta del inyector durante la eliminación del disolvente para permitir la salida de este en forma gaseosa.

Con objeto de impedir el avance del adsorbente y de la lana de vidrio empujados por el gas portador, se practicó un estrechamiento en el extremo del "glass liner", y se introdujo entre la lana de vidrio y dicho estrechamiento un tubo de vidrio de 1 cm de longitud y 1 mm de diámetro externo para retener al adsorbente y a la lana de vidrio.

### 2.3.2. Condiciones de introducción de la muestra.

#### 2.3.2.1. Inyecciones en frío con o sin división de flujo.

El procedimiento clásico de análisis, incluyendo extracción, concentración e inyección del extracto concentrado se aplicó tanto a disoluciones modelo como a muestras reales. En la evaluación del proceso de concentración interna con PTV, la introducción de la muestra se llevó a cabo en frío con división de flujo. El "glass liner" se rellenó con 2 cm de lana de vidrio silanizada. La relación de división de flujo fue 1:50, y la temperatura 40°C. La jeringa se descargó en el "glass liner" a 1 cm aproximadamente de la lana de vidrio. Posteriormente, el inyector se calentó balísticamente (valor medio del gradiente de temperatura  $\bar{u}$ : 14°C/s) hasta 375°C, manteniendo esta temperatura durante 5 minutos. El volumen de inyección de cada extracto concentrado correspondiente a las tres concentraciones anteriormente mencionadas (Disoluciones 1a,

1b y 1c, pg. 90) fue el necesario para introducir en la columna 20 ng de cada compuesto, resultando por tanto 5  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  y 2.5  $\mu\text{L}$  de las muestras de 0.5, 2 y 5 mg/L respectivamente. Obviamente, el cálculo realizado incluye la consideración del factor de concentración, citado en la página 93, que se aplica a cada una de las disoluciones empleadas.

Con objeto de calcular los factores de recuperación de los distintos procedimientos, se inyectaron en las mismas condiciones disoluciones de referencia preparadas con la concentración que tendrían los compuestos considerados si no se hubiesen producido pérdidas durante el proceso de concentración evaluado.

Para calcular la exactitud en el estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV, se inyectó en frío sin división de flujo 1  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrones en diclorometano.

Para el análisis del aroma de bebidas alcohólicas se inyectaron en frío, sin división de flujo, 2  $\mu\text{L}$  del extracto líquido-líquido concentrado y del extracto SDE sin concentrar y concentrado con corriente de gas inerte.

En todas estas inyecciones se empleó una jeringa SGE de 10  $\mu\text{L}$  modelo R-GP.

### 2.3.2.2. Concentración interna de los extractos líquido-líquido.

(A) Evaluación del proceso de concentración interna con PTV y (D) Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación.

Cuando la concentración del extracto líquido-líquido se realizó en el PTV, la inyección se llevó a cabo manteniendo el inyector a 30°C y con eliminación selectiva de disolvente, siendo 1:50 la relación de división de flujo. Con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de disolvente, se estableció un tiempo de purga de 30 segundos. Pasado este tiempo se cerró la válvula de división de flujo y se calentó balísticamente el PTV ( $\dot{u}$ : 14°C/s) hasta 375°C, manteniéndolo a esta temperatura durante 5 minutos, con objeto de transferir a la columna los volátiles adsorbidos en el Tenax.

Se inyectó un volumen de extracto que contenía aproximadamente 20 ng de cada compuesto, esto es, 25  $\mu$ L, 6  $\mu$ L y 2.5  $\mu$ L respectivamente para los extractos correspondientes a las Disoluciones 1a, 1b, y 1c (pg 90). Los análisis de extractos de muestras reales fueron realizados inyectando 25  $\mu$ L de muestra en cada caso. La introducción de la muestra se llevó a cabo descargando la jeringa lentamente para evitar una sobrecarga en la cámara de vaporización. La elección del

material adsorbente, el flujo de gas que circula a través del mismo, la temperatura del adsorbente durante la eliminación del disolvente y la desorción, y el tiempo de eliminación del disolvente, se basó en experiencias anteriormente llevadas a cabo en nuestro laboratorio (Herraiz y col., 1.987).

Las inyecciones se realizaron con jeringas Hamilton 810 de 10 y de 25  $\mu\text{L}$  (longitud de aguja: 5 cm).

Con objeto de poder calcular la recuperación del método, se preparó una disolución de referencia con la concentración que tendrían los solutos considerados en el caso de que el proceso de extracción se hubiese desarrollado sin pérdidas. La citada disolución de referencia fue inyectada en frío con eliminación de disolvente.

#### 2.3.2.3. Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.

Para evitar el grave problema que supone la inundación de la columna con el disolvente al introducir grandes volúmenes de muestra, se propone un método de operación original, que se detalla seguidamente. La muestra se introduce en el inyector con una jeringa Hamilton de 100  $\mu\text{L}$  modelo 810. En el momento de iniciar la introducción de la muestra, la columna se mantiene desconectada del inyector y

la válvula de división de flujo cerrada. En estas condiciones se logra la estabilización del inyector, a la temperatura de eliminación del disolvente, mientras es atravesado por el flujo de gas portador (helio) necesario para lograr que dicha eliminación se produzca.

Las inyecciones se realizaron descargando la jeringa lentamente a una velocidad de  $0.2 \mu\text{L/s}$  con objeto de no producir sobrecargas en la cámara de vaporización. Al mismo tiempo que se inyecta, se produce la eliminación del disolvente a través del punto de conexión de la columna. Terminada la inyección, se mantiene un tiempo extra de purga de un minuto, después del cual se interrumpe el paso de gas a través del inyector y se conecta la columna. A continuación se establece nuevamente la circulación del gas, a la presión necesaria para que la columna tenga una eficacia óptima, y se mantiene durante tres minutos con objeto de eliminar restos de aire que pudieran afectar al Tenax. Finalmente, se calienta rápidamente el inyector ( $\dot{u}$ :  $14^\circ\text{C/s}$ ) hasta alcanzar la temperatura de desorción ( $350^\circ\text{C}$ ).

El estudio de la influencia de variables que afectan al proceso descrito fue abordado aplicando el **diseño compuesto central y rotativo propuesto por Box y Hunter (1.957)**.

El volumen de muestra introducido, el flujo de gas

durante la eliminación del disolvente y la temperatura inicial del PTV fueron variados de acuerdo con el diseño aplicado. Los intervalos experimentales considerados para cada variable fueron los siguientes: 25-250  $\mu\text{L}$  para el volumen inyectado, 50-500 mL/min para el flujo durante la eliminación del disolvente, y 10-50°C para la temperatura inicial del PTV.

El modelo polinómico de segundo orden [8] fue ajustado a los datos experimentales.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad [8]$$

donde  $X_i$  son las variables independientes ( $X_1$ : volumen de muestra,  $X_2$ : flujo de gas durante la eliminación del disolvente y  $X_3$ : temperatura inicial del PTV). Como variable dependiente ( $y$ ) se considera la respuesta medida en las experiencias, mientras que  $b_i$  representan los coeficientes a estimar.

De acuerdo con el diseño aplicado, los datos experimentales fueron obtenidos realizando, en orden aleatorio, veinte experiencias. El valor de cada respuesta se obtuvo a partir de cinco replicados para cada grupo de parámetros.

#### 2.3.2.4. Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV.

Las variables que se consideraron para optimizar el método de extracción y concentración internas se indican en la Tabla 2, así como el nivel base y el módulo de paso de cada una de ellas.

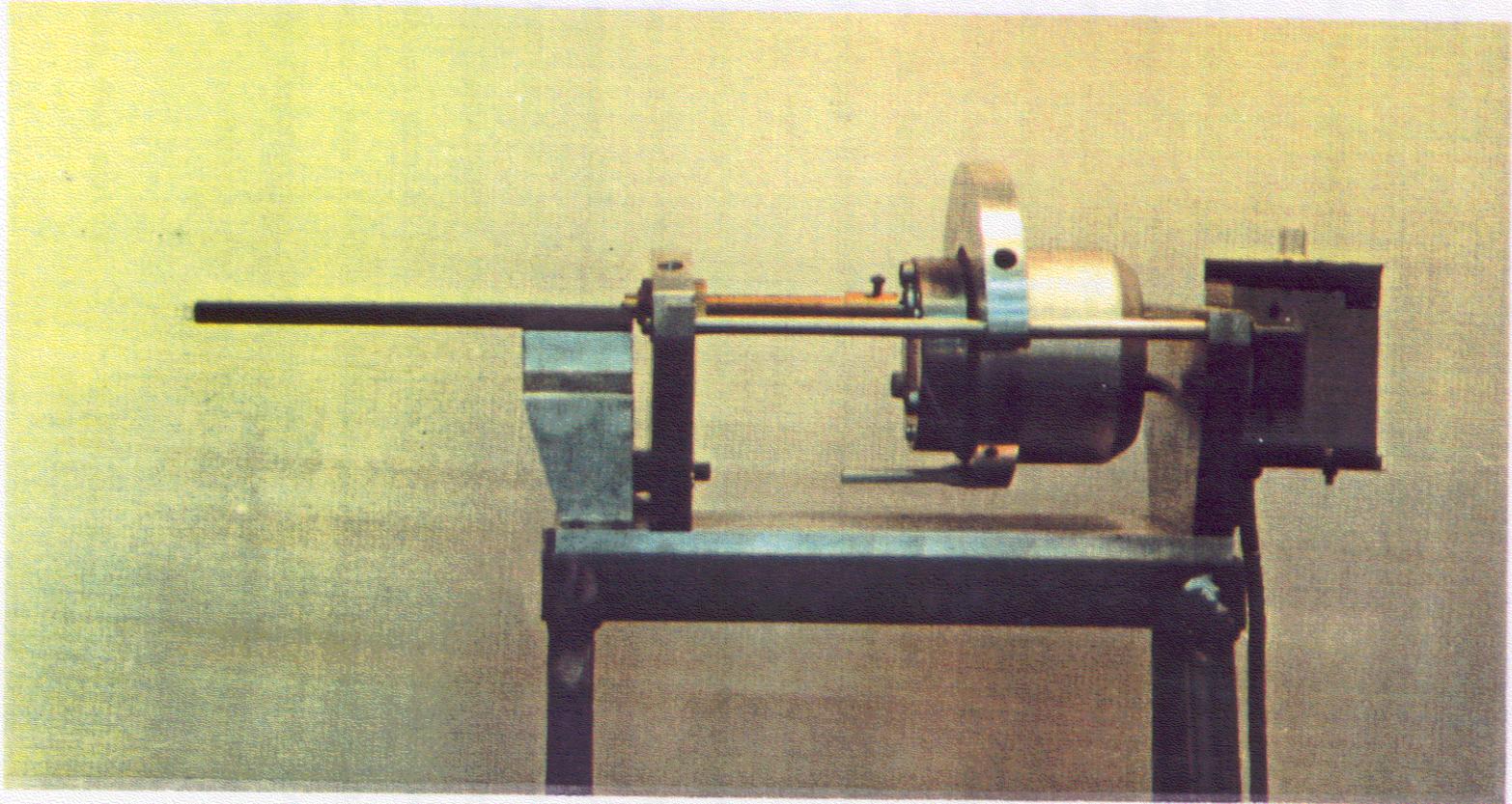
La inyección se realizó utilizando el instrumento que se muestra en la página 107, y que se describe detalladamente en el apartado 2.3.2.5., para facilitar el control de la velocidad de introducción de muestra. Se empleó una jeringa SGE de 500  $\mu\text{L}$ , modelo ARN-GSG. La temperatura de desorción fue de 250°C, debido a que el GasChrom 220 es inestable a temperaturas superiores.

#### 2.3.2.5. Dispositivo para la introducción de muestra a velocidad controlada.

Para poder abordar las distintas experiencias que exige el desarrollo del procedimiento de optimización, y puesto que una de las variables consideradas es la velocidad de introducción de muestra, fue preciso diseñar y construir un dispositivo que permitiera realizar una inyección reproducible en un amplio intervalo de velocidades. El empleo del citado dispositivo es especialmente necesario para el

**Tabla 2.** Variables experimentales consideradas en la optimización de la extracción y concentración internas y valores del nivel base y del módulo de paso inicialmente establecidos para cada una de ellas.

Variables experimentales	Nivel base	Módulo de paso
Volumen de muestra, $V_{IO}$ ( $\mu\text{L}$ )	300	150
Flujo de gas durante la inyección, F (mL/min)	600	300
Temperatura inicial del PTV, $T_i$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	15
Longitud del adsorbente, L (cm)	2	2
% de GasChrom 220 en el adsorbente, %	0	45
Velocidad de inyección, $v_i$ ( $\mu\text{L/s}$ )	0,2	0,07
Volumen de gas de eliminación de disolvente, $V_{OE}$ (ml)	3000	3000
Temperatura de eliminación del disolvente, $T_e$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	15



Dispositivo para la introducción de muestra a velocidad controlada

estudio planteado, ya que la introducción manual de elevados volúmenes de muestra no ofrece la suficiente precisión, además de ser experimentalmente tediosa.

El dispositivo diseñado consiste en un motor eléctrico de velocidad de giro baja y variable, acoplado mediante un eje roscado a una tuerca fija en una bancada. El giro del motor produce un movimiento de avance del conjunto motor-eje respecto a la tuerca fija, movimiento que se comunica al émbolo de la jeringa, en contacto con el extremo de dicho eje. La jeringa descansa en una pletina horizontal de perfil en forma de "V". Manualmente se introduce la aguja en el inyector a través del septum y se pone en contacto el émbolo con el eje roscado del dispositivo de inyección; a partir de ese momento se conecta el motor y se inicia la inyección mecánicamente, a velocidad controlada. El movimiento de retroceso, necesario para iniciar una nueva inyección, se realiza manualmente. El paso de rosca del eje es pequeño, lo que permite realizar desplazamientos longitudinales del émbolo muy lentos. El regulador de velocidad del motor tiene una escala graduada de 0 a 10.

#### **Calibración del motor.**

Aunque la velocidad de inyección ( $v_1$ ,  $\mu\text{L/s}$ ) depende del volumen de la jeringa a utilizar, la velocidad de avance del

eje (v, mm/min) que empuja al émbolo solamente es función de la velocidad de giro del motor. Para calibrar el regulador del mismo se estimó que podrían realizarse buenas medidas de la velocidad de avance del eje cronometrando el tiempo de paso del extremo de dicho eje entre dos marcas realizadas en la pletina en "V" del soporte de la jeringa, distantes entre sí unos 60 mm.

**a) Repetibilidad de las medidas.**

Para comprobar si el procedimiento de medida de la velocidad de avance era adecuado se procedió a realizar varias medidas a una posición fija del regulador, sin moverlo de una determinación a otra. La repetibilidad de las medidas así obtenidas sería una indicación de la precisión del procedimiento utilizado. La distancia entre marcas, tras varias medidas realizadas con un calibre, resultó ser 59.90 mm. Todas las determinaciones se hicieron con el regulador en la posición 10. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 3. Evidentemente, el bajo coeficiente de variación de las medidas indica que el método propuesto tiene suficiente precisión.

**b) Calibrado del regulador de velocidad del motor.**

Se realizaron tres medidas de la velocidad de avance del eje para cada una de los siguientes valores de la escala de

**Tabla 3.** Calibración del dispositivo para la introducción de muestras a velocidad controlada. Estimación de la repetibilidad de las medidas realizadas.

<u>Medida</u>	<u>Tiempo de paso</u>
1	5' 57'' 15
2	5' 56'' 63
3	5' 57'' 32
4	5' 55'' 73
5	5' 57'' 11
6	5' 57'' 15
7	5' 57'' 61
8	5' 56'' 76

$$n = 8$$

$$\text{med} = 356.72 \text{ s}$$

$$s^2 = (\Sigma(x_i - \text{med})^2) / n = 0.5179 \text{ s}^2$$

$$s = 0.7196 \text{ s}$$

$$\text{C.V.} = 0.2\%$$

regulación: 0, 2, 4, 6, 8 y 10. En cada una de las medidas se volvió a situar el mando del regulador en la posición deseada (aunque la medida anterior se hubiera hecho con la misma regulación) en un intento de reproducir todas las posibles causas de error en el uso real del dispositivo. Las medidas se llevaron a cabo en orden aleatorio. En la Tabla 4 se indican, en el orden de realización, las posiciones del mando de regulación, los tiempos de paso del extremo del eje entre marcas y la velocidad de avance calculada.

Teniendo en cuenta que la variable que posteriormente se iba a fijar en cada experiencia a través de la velocidad de avance  $v$ , era la velocidad de inyección, y que para ello habría que establecer el correspondiente valor del mando de regulación ( $r$ ), es evidente que interesaba realizar la regresión  $r = f(v)$ . Al representar  $r$  frente a  $v$  se observó que la relación no era lineal (Figura 12), sin que se consiguiera mejorar con las transformaciones de datos más habituales. Se recurrió entonces a realizar una regresión múltiple expresando  $r$  en función de las sucesivas potencias de  $v$  obteniéndose el siguiente modelo polinómico (entre paréntesis, debajo de cada coeficiente, se indica su error estándar):

$$r = -1.684 + 2.808 v - 0.236 v^2 + 0.007 v^3 \quad [9]$$

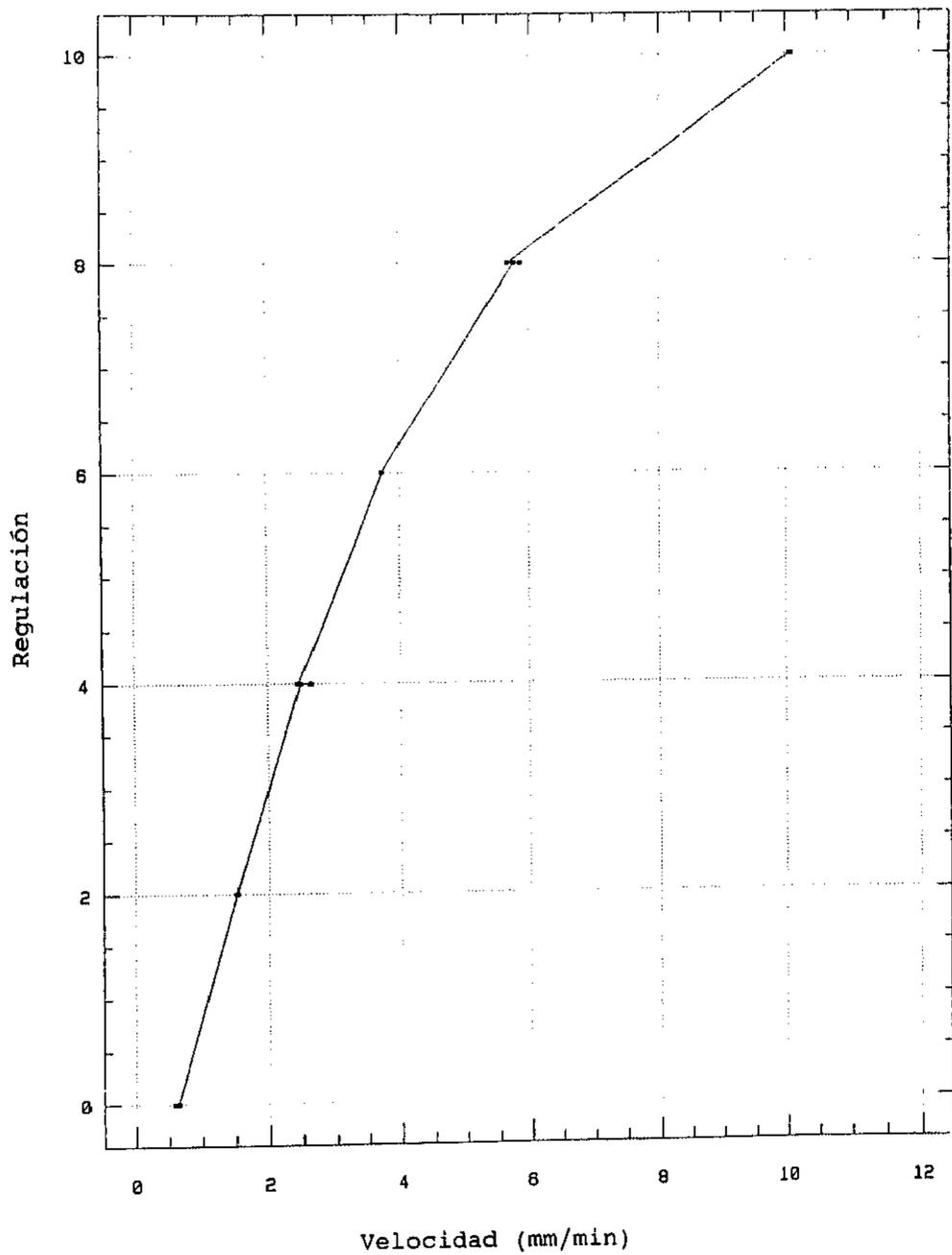
$$(0.090) \quad (0.088) \quad (0.021) \quad (0.001)$$

$$R^2=0.9995 \quad R^2 \text{ ajustado por g.l.} = 0.9994$$

**Tabla 4.** Calibración del dispositivo para la introducción de muestras a velocidad controlada. Tiempo de paso del extremo del eje entre marcas y velocidad de avance en distintas posiciones de regulación del mando.

Posición	t (min)	v (mm/min)
4	23.95	2.50
10	5.95	10.07
10	5.95	10.07
4	22.80	2.63
6	15.97	3.75
6	16.07	3.73
8	10.40	5.76
0	101.18	0.59
10	5.93	10.10
0	92.98	0.64
2	39.05	1.53
2	39.78	1.51
8	10.23	5.86
2	39.60	1.51
6	16.57	3.61*
0	94.72	0.63
4	24.33	2.46
8	10.58	5.66

\*: Valor no considerado en el calibrado por sufrir excesiva desviación del conjunto (véase regresión, pg. 114)



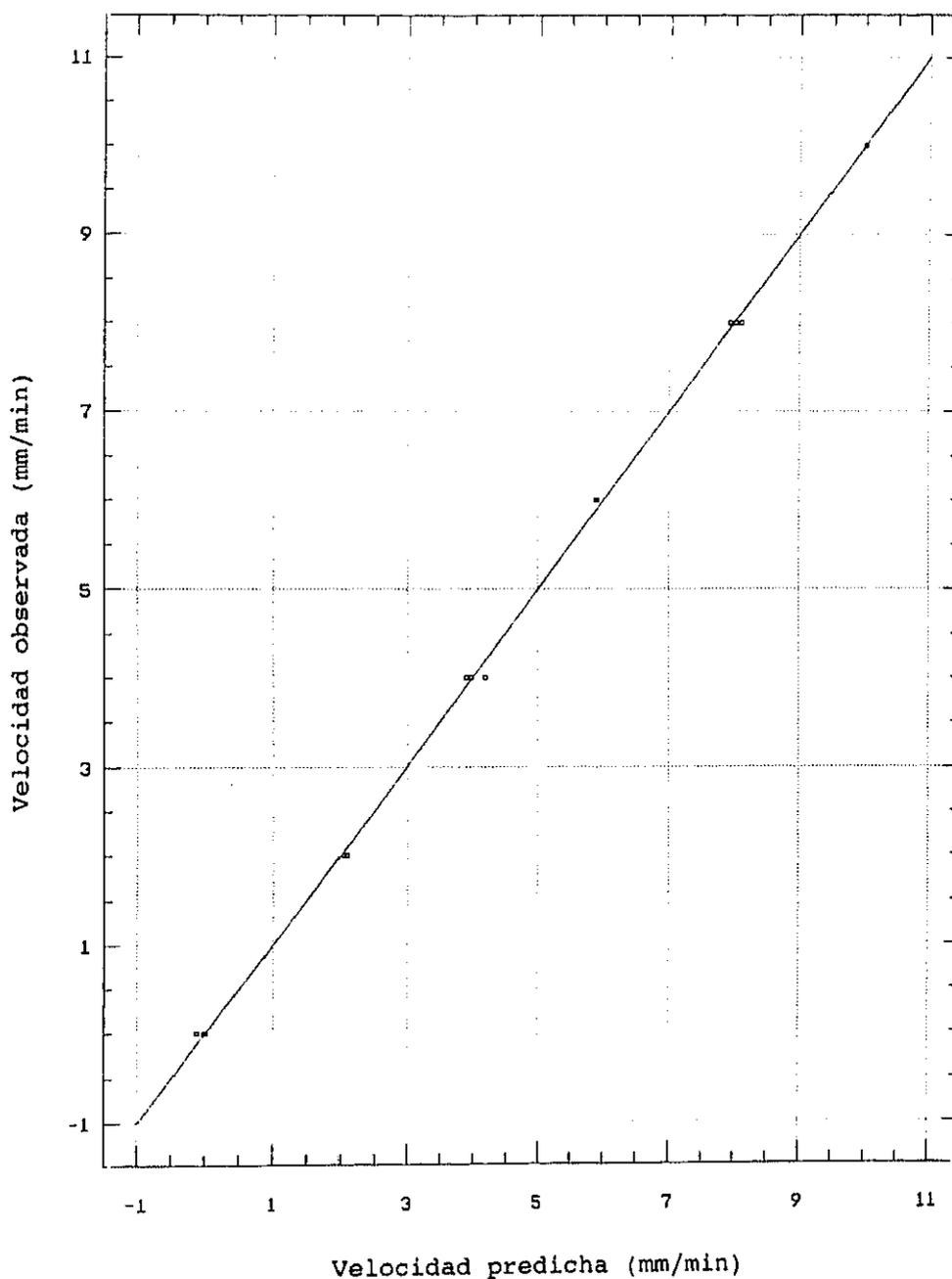
**Figura 12.** Representación de la regulación del mando del dispositivo utilizado para la introducción de muestras a velocidad controlada frente a la velocidad de avance del émbolo.

Los altos valores de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) así como el gráfico de valores observados frente a valores predichos (Figura 13) indican que el modelo es altamente explicativo y se ajusta muy bien a los datos experimentales. El análisis de los residuos no evidencia faltas de normalidad, independencia ni homocedasticidad, una vez eliminado el valor atípico  $r=6$ ,  $v=3.61$  (Tabla 4).

Para poder fijar en cada experiencia la velocidad de inyección ( $v_i$ , expresado en  $\mu\text{L/s}$ ) era necesario, todavía, establecer su equivalencia con la velocidad de avance del émbolo ( $v$ , expresada en  $\text{mm/min}$ ) que es la magnitud utilizada en la ecuación de regresión. Esto depende, como ya se ha dicho, de la jeringa a utilizar. En nuestro caso concreto, para una jeringa de  $500 \mu\text{L}$ , cuyo recorrido de émbolo entre 0 y 500 se estableció, tras 8 medidas independientes con un calibre, en  $63.32 \text{ mm}$ , el recorrido de émbolo correspondiente a  $1 \mu\text{L}$  (suponiendo homogeneidad de sección en el cuerpo de jeringa) es de  $0.1266 \text{ mm}$ , de donde resultó la siguiente equivalencia:

$$v \text{ (mm/min)} = v_i \text{ (\muL/s)} \cdot 60 \text{ (s/min)} \cdot 0.1266 \text{ (mm/\muL)} \quad [10]$$

$$v = v_i \cdot 7.60 \text{ mm/min}$$



**Figura 13.** Representación de los valores observados de la velocidad de avance del émbolo del dispositivo utilizado para la introducción de muestras a velocidad controlada, en función de la regulación en el mando frente a los valores predichos por la ecuación polinómica calculada por regresión.

2.3.2.6. Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa.

La introducción de la muestra se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que en la optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas, tomando valores de las variables en base a los resultados de dicha optimización.

Dado el elevado número de picos que configura el cromatograma obtenido por extracción y concentración internas de las muestras de vino y pisco, no se consideró conveniente introducir un soluto de referencia para efectuar los cálculos cuantitativos por el método de patrón interno. Dichos cálculos se realizaron en relación al área del pico correspondiente a la inyección por separado de octanoato de metilo a razón de 0.8 mg/L.

2.3.3. Condiciones cromatográficas.

Las programaciones de temperatura durante el proceso cromatográfico fueron las siguientes:

Columna 1 (pg. 96), empleada para la (A) evaluación del proceso de concentración interna con PTV:

- Inyecciones en frío sin división de flujo: 40°C durante 5 minutos, y calentamiento a 2°C por minuto hasta 150°C.

- Inyecciones en frío con eliminación selectiva de disolvente, 30°C durante 6 minutos, y calentamiento a 2°C por minuto hasta 170°C.

Columna 2 (pg. 96):

- (B) Estudio de variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV: 40°C durante tres minutos y calentamiento a 5°C/min hasta 180°C.

- (C) Optimización de las principales variables que afectan a la extracción y concentración internas con PTV: 35°C durante ocho minutos, calentamiento a 2°C/min hasta 60°C, y calentamiento a 4°C/min hasta 180°C.

- (D) Análisis de componentes minoritarios del aroma de bebidas alcohólicas de distinta graduación por inyección directa: 35°C durante ocho minutos y calentamiento a 2°C/min hasta 180°C.

El gas portador empleado fue en todos los casos el helio, con una presión en cabeza de columna de 2.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante el desarrollo cromatográfico.

El detector se mantuvo a una temperatura de 250°C durante todos los análisis realizados.

## 2.4. ESPECTROMETRIA DE MASAS.

### 2.4.1. Equipo.

Se empleó un detector selectivo de masas Perkin-Elmer modelo ITD-50, acoplado a un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 8310 (el mismo cromatógrafo que se empleó en el resto de la experimentación). El acoplamiento se realizó mediante una línea de transferencia mantenida a una temperatura de 200°C, haciendo pasar la muestra de la columna cromatográfica al capilar de la citada línea de transferencia mediante una interfase del tipo "open split".

### 2.4.2. Identificación.

Para la identificación de los compuestos volátiles de las muestras reales estudiadas, se comparó el espectro de masas obtenido en cada caso con los espectros contenidos en distintas librerías. Concretamente se utilizó una obtenida en nuestro laboratorio empleando patrones, y también se recurrió a la del National Bureau of Standards.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. EVALUACION DEL PROCESO DE CONCENTRACION INTERNA EN UN PTV.

La primera aproximación al método de extracción y concentración internas en el PTV que pretendíamos desarrollar, se llevó a cabo mediante la evaluación del procedimiento experimental a aplicar para lograr la concentración interna del extracto de la muestra. Este estudio consistió básicamente en la comparación de los resultados del análisis de una disolución modelo (Disolución 1, pg. 89) mediante extracción líquido-líquido en continuo con Freon 11 y concentración externa, con los obtenidos por el mismo procedimiento de extracción, pero realizando una concentración interna del extracto en el PTV.

El objetivo propuesto exigía en primer lugar evaluar la aptitud del "glass liner" del PTV relleno con Tenax GC para retener selectivamente, con relación a un disolvente de bajo punto de ebullición como es el Freon 11, compuestos volátiles. Además, se debía tener la seguridad de que, en tales condiciones, la desorción térmica de la muestra adsorbida era eficaz, así como de que era posible descartar cualquier efecto negativo sobre la separación cromatográfica.

Por otro lado, pareció aconsejable conocer si la sustitución de la etapa de concentración de un extracto por la inyección directa del mismo aportaba claros beneficios en cuanto a la fiabilidad del análisis cuantitativo.

### **3.1.1. Precisión**

En la Tabla 5 se presentan los coeficientes de variación de las áreas normalizadas y de las relativas a un patrón interno de los picos obtenidos, para distintas concentraciones de la muestra modelo, cuando se concentró el extracto por evaporación externa del disolvente. La Tabla 6 contiene los resultados correspondientes a la concentración interna del extracto en el inyector. Como patrón interno se eligió el acetato de 2-feniletilo por ofrecer poca variabilidad y eluirse en la zona central del cromatograma.

Los valores de los coeficientes de variación indicados en las mencionadas Tablas 5 y 6 incluyen la variabilidad del proceso completo, es decir, de la extracción con Freon 11, de la concentración (bien por calefacción o bien en el PTV), y del análisis cromatográfico.

Es evidente que, en general, la precisión es mayor cuando la concentración del extracto se realiza en el inyector que cuando se concentra por calefacción con una

**Tabla 5.** Coeficientes de variación (n=4) de las áreas normalizadas y de las áreas referidas al patrón interno (acetato de 2-feniletilo) de los picos obtenidos en el análisis de los extractos con Freon 11 de las disoluciones modelo con concentración externa. Inyección en frío con división de flujo.

Compuesto	0.5 mg/L		2.0 mg/L		5.0 mg/L	
	CV%*	CV%**	CV%*	CV%**	CV%*	CV%**
Pentanoato de etilo	13.8	11.7	18.7	21.9	10.1	11.8
trans-2-Hexenal	14.2	13.2	19.7	22.6	12.9	14.7
Acetato de hexilo	12.9	9.2	12.9	15.8	5.4	7.5
cis-3-Hexen-1-ol	12.1	9.1	5.1	8.8	8.6	10.1
Octanoato de metilo	8.9	5.8	2.7	5.4	3.9	5.7
trans-2-Hexen-1-ol	11.9	10.3	11.9	13.2	9.8	11.0
Lactato de isoamilo	7.5	3.4	5.5	7.7	3.3	4.8
$\alpha$ -Terpineol	6.1	3.7	2.2	1.9	4.0	2.6
Succinato de dietilo	4.7	4.3	4.3	2.3	2.5	1.9
Acido pentanoico	27.9	26.7	34.4	32.2	4.5	6.3
Acido hexanoico	11.3	9.3	12.1	9.8	11.4	12.7
2-Feniletanol	7.1	3.9	11.7	9.4	4.0	3.8
Acido nonanoico	11.0	13.0	3.0	6.6	9.8	8.4
Acido decanoico	13.9	15.8	1.5	5.3	10.9	9.2
Media	11.7	9.9	10.4	11.6	7.2	7.9

\*) Areas normalizadas.

\*\*\*) Areas relativas al patrón interno.

**Tabla 6.** Coeficientes de variación (n=4) de las áreas normalizadas y de las áreas referidas al patrón interno (acetato de 2-feniletilo) de los picos obtenidos en el análisis de los extractos con Freon 11 de las disoluciones modelo con concentración interna en el PTV.

Compuesto	0.5 mg/L		2.0 mg/L		5.0 mg/L	
	%CV*	%CV**	%CV*	%CV**	%CV*	%CV**
Pentanoato de etilo	4.8	12.7	6.5	4.2	2.9	2.3
trans-2-Hexenal	6.5	12.0	5.7	5.8	1.8	2.3
Acetato de hexilo	5.1	5.2	5.0	8.3	0.9	0.5
cis-3-Hexen-1-ol	15.6	16.2	14.3	17.1	8.6	9.8
Octanoato de metilo	3.7	7.4	2.1	2.9	2.8	3.8
trans-2-Hexen-1-ol	19.1	19.4	7.1	9.4	3.5	4.6
Lactato de isoamilo	20.0	22.1	7.4	7.8	10.3	11.3
$\alpha$ -Terpineol	5.4	7.4	2.8	4.7	1.1	1.4
Succinato de dietilo	4.5	7.5	2.8	2.6	1.4	2.5
Acido pentanoico	8.4	13.8	28.8	30.6	10.8	10.8
Acido hexanoico	5.8	3.8	6.3	7.5	7.3	6.0
2-Feniletanol	4.0	6.6	10.9	10.7	4.7	5.9
Acido nonanoico	7.4	8.6	8.2	7.0	9.8	8.5
Acido decanoico	4.0	7.9	11.3	9.9	7.9	6.7
Media	8.2	10.7	8.5	9.2	5.3	5.5

\*) Areas normalizadas.

\*\*\*) Areas relativas al patrón interno.

columna Vigreux. Comparando individualmente cada valor de la Tabla 5 con el correspondiente de la Tabla 6, se puede observar que los coeficientes de variación son menores, en la mayoría de los casos, cuando se concentra en el PTV, especialmente para los compuestos más volátiles.

En términos generales, la concentración interna de extractos en el PTV, puede reducir aproximadamente en un 20% la variabilidad observada en el análisis mediante Extracción Líquido-Líquido con concentración posterior por calentamiento. Ello es debido probablemente a la reducción del manejo de la muestra junto con el mejor control de las condiciones de la operación, ya que en el caso de que la concentración se realice internamente en el PTV, se emplea instrumentación más precisa.

### **3.1.2. Exactitud.**

Las Tablas 7 y 8 contienen los factores de recuperación (%) resultantes al realizar, respectivamente, la concentración externa y la interna del extracto correspondiente a partir de la disolución modelo (Disolución 1), en los tres niveles de concentración ya mencionados. Dichos factores se calcularon por comparación de las áreas obtenidas en el análisis de las muestras estudiadas con las resultantes de la inyección de patrones en frío, sin división

**Tabla 7.** Porcentajes de recuperación para distintas concentraciones de la muestra modelo obtenidos por análisis de los correspondientes extractos en Freon 11 con concentración externa. Inyección en frío con división de flujo.

Compuesto	0.5 mg/L	2.0 mg/L	5.0 mg/L
Pentanoato de etilo	42.7	48.5	60.0
trans-2-Hexenal	44.1	47.1	59.7
Acetato de hexilo	54.2	63.1	73.8
cis-3-Hexen-1-ol	37.5	44.0	53.8
Octanoato de metilo	64.3	70.3	78.6
trans-2-Hexen-1-ol	41.7	43.2	60.0
Lactato de isoamilo	73.6	80.9	83.7
$\alpha$ -Terpineol	94.7	96.4	97.9
Succinato de dietilo	89.1	92.9	97.9
Acido pentanoico	33.1	34.7	44.3
Acido hexanoico	86.7	82.5	87.2
2-Feniletanol	86.9	76.2	76.1
Acido nonanoico	35.6	67.3	84.7
Acido decanoico	31.6	79.5	82.7
Media	58.3	64.7	74.0

**Tabla 8.** Porcentajes de recuperación para distintas concentraciones de la muestra modelo obtenidos por análisis de los correspondientes extractos en Freon 11 con concentración interna en el PTV.

Compuesto	0.5 mg/L	2.0 mg/L	5.0 mg/L
Pentanoato de etilo	23.8	60.4	98.0
trans-2-Hexenal	85.7	80.0	97.9
Acetato de hexilo	95.1	80.4	95.9
cis-3-Hexen-1-ol	85.3	80.6	77.7
Octanoato de metilo	91.3	94.2	90.7
trans-2-Hexen-1-ol	78.5	89.3	81.5
Lactato de isoamilo	81.5	85.8	92.4
$\alpha$ -Terpineol	92.9	96.5	96.7
Succinato de dietilo	90.6	90.4	96.8
Acido pentanoico	64.9	43.3	47.8
Acido hexanoico	94.6	73.7	90.1
2-Feniletanol	93.8	58.7	82.4
Acido nonanoico	84.5	88.8	90.8
Acido decanoico	79.5	87.2	94.0
Media	81.6	79.2	88.0

de flujo, tal y como se indicó en Materiales y Métodos.

Los factores de recuperación obtenidos por concentración interna en el PTV son en promedio superiores, en un 30% aproximadamente, a los correspondientes a la concentración externa, donde las pérdidas observadas pueden ser debidas a coevaporación con el disolvente. Sólo en un caso, pentanoato de etilo en concentración de 0.5 mg/L, se detecta una clara pérdida en el caso de que la concentración se lleve a cabo en el PTV.

### 3.1.3. Influencia en la separación cromatográfica

La separación cromatográfica no se vio afectada negativamente por el procedimiento de inyección con eliminación selectiva del disolvente, no observándose ninguna alteración destacable en el cromatograma para los tres volúmenes de inyección ensayados (25, 6 y 2.5  $\mu$ L). En las Figuras 14, 15, y 16 se presentan los cromatogramas obtenidos en cada uno de los tres casos, que corresponden al análisis de las tres disoluciones modelo citadas anteriormente (Disoluciones 1a, 1b y 1c). En la zona central de los cromatogramas pueden observarse dos picos correspondientes a distintos isómeros de dimetilestireno procedentes del adsorbente (Tenax GC). En el cromatograma del análisis de mayor volumen de muestra, el área del mencionado pico es

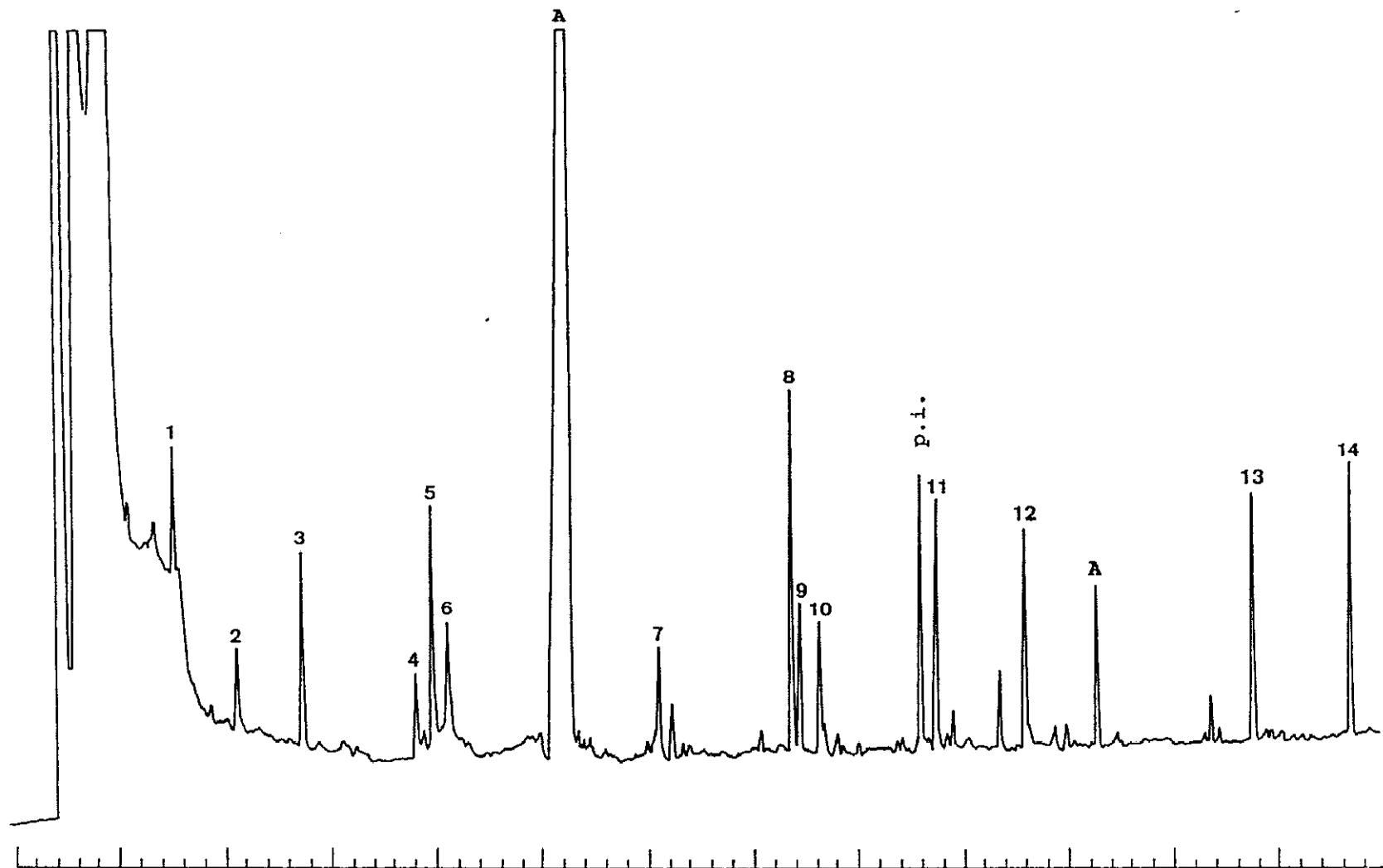


Figura 14. Cromatograma del extracto líquido-líquido de la Disolución 1a, conteniendo 0.5 mg/L de cada compuesto, obtenido por concentración interna en el PTV. Volumen de muestra 25  $\mu$ L. Identidad de los picos: 1. pentanoato de etilo, 2. trans-2-hexenal, 3. acetato de hexilo, 4. cis-3-hexen-1-ol, 5. octanoato de metilo, 6. trans-2-hexen-1-ol, 7. lactato de isoamilo, 8.  $\alpha$ -terpineol, 9. succinato de dietilo, 10. ácido pentanoico, 11. ácido hexanoico, 12. 2-feniletanol, 13. ácido nonanoico, 14. ácido decanoico, A. Producto de descomposición del adsorbente.

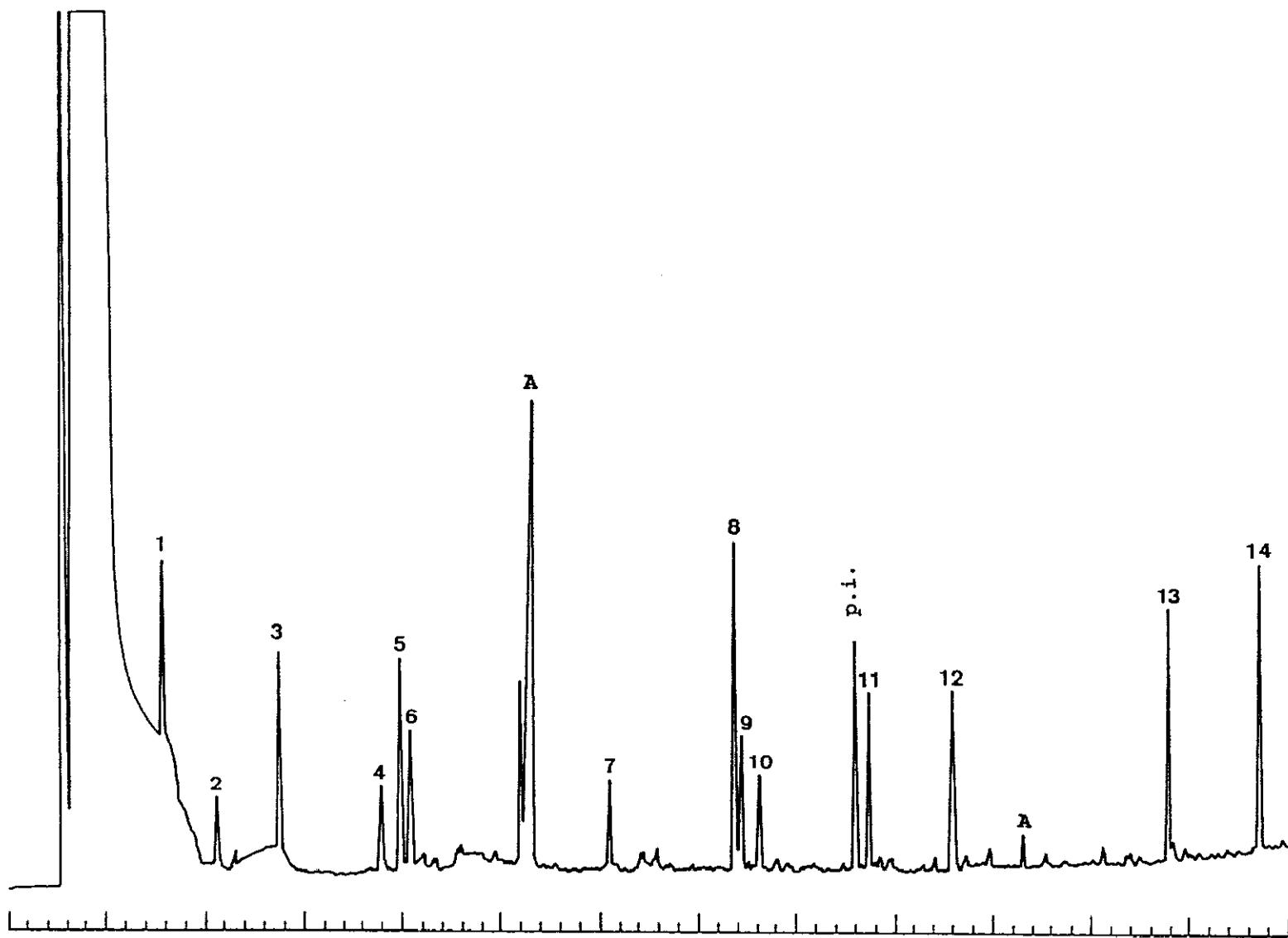


Figura 15. Cromatograma del extracto líquido-líquido de la Disolución 1b, conteniendo 2 mg/L de cada compuesto, obtenido por concentración interna en el PTV. Volumen de muestra 6  $\mu$ L. Identidad de los picos como en la Figura 14.

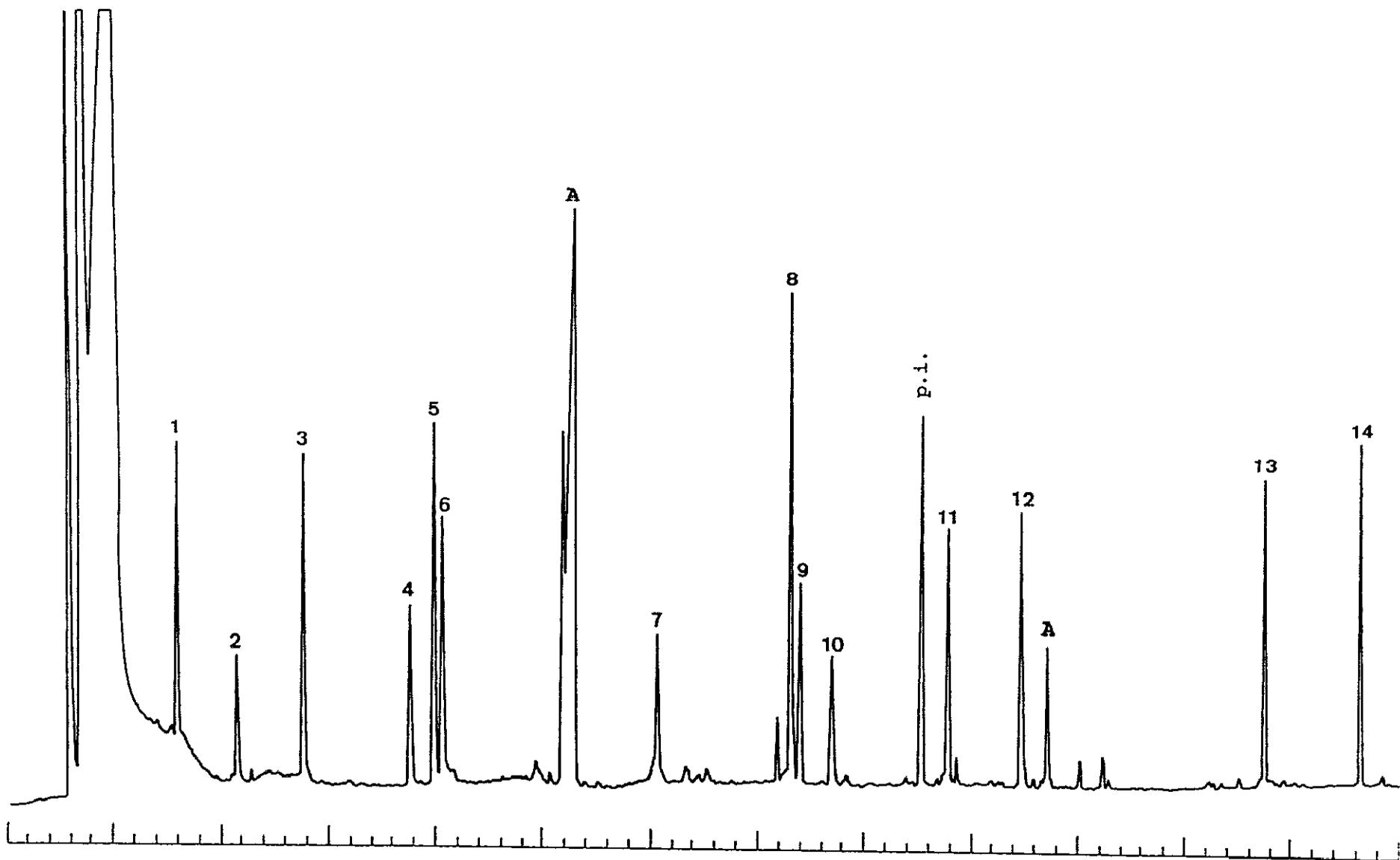


Figura 16. Cromatograma del extracto líquido-líquido de la Disolución 1c, conteniendo 5 mg/L de cada compuesto, obtenido por concentración interna en el PTV. Volumen de muestra 2.5  $\mu$ L. Identidad de los picos como en la Figura 14.

considerable, probablemente debido al mayor arrastre de monómeros por el disolvente.

Los resultados presentados hasta este punto se consideraron satisfactorios como datos preliminares relativos a la posibilidad de introducir elevados volúmenes de muestra en columnas capilares, sugiriendo la necesidad de una optimización cuidadosa del procedimiento, especialmente cuando se aborde el análisis de solutos muy volátiles y en muy baja concentración.

**3.2. ESTUDIO DE VARIABLES QUE AFECTAN A LA EXTRACCION Y CONCENTRACION INTERNAS CON PTV.**

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el estudio de un procedimiento de introducción directa de muestras, con aislamiento y concentración internas en un PTV, utilizando un diseño compuesto central y rotativo, propuesto por Box y Hunter (1.957), que se aplicó al análisis de la Disolución 2 (pg. 90). Como se ha indicado en la Introducción, los métodos de diseño experimental basados en superficies de respuesta permiten estudiar las relaciones existentes entre una determinada variable dependiente (respuesta) y un grupo de variables independientes (factores). Además de conducir a la localización de la combinación de variables que proporciona la mejor respuesta, estas técnicas describen el comportamiento global del sistema, por lo que son especialmente útiles para llevar a cabo una aproximación al conocimiento del mismo realizando un moderado esfuerzo experimental.

**3.2.1. Diseño compuesto central y rotativo.**

Como se ha detallado en Materiales y Métodos, se consideraron tres variables que pueden afectar significativamente al volumen de ruptura de cada soluto en el

"glass liner" (relleno con 2 cm de Tenax TA), en un procedimiento que suponga el empleo de un PTV en la modalidad de eliminación selectiva del disolvente: Volumen de muestra ( $X_1$ ), flujo de gas portador durante la eliminación del disolvente ( $X_2$ ) y temperatura inicial del PTV ( $X_3$ ). El estudio de estas variables se realizó en los siguientes intervalos experimentales: ( $X_1$ ): 25-250  $\mu$ L, ( $X_2$ ): 50-500 mL/min y ( $X_3$ ): 10-50°C, considerando los niveles establecidos por el diseño aplicado, según se indica en la Tabla 9, de acuerdo con la matriz de coordenadas matemáticas recogidas en la Tabla 1.

La citada Tabla 9 incluye igualmente los valores de las variables que corresponden a los niveles de los factores codificados que definen la región experimental. En la Tabla 10 se muestran los valores máximos y mínimos de las distintas respuestas evaluadas (área, porcentaje de error y porcentaje del coeficiente de variación), que expresan la sensibilidad, exactitud y precisión del método para cada compuesto en las veinte experiencias realizadas. Los valores de las respuestas obtenidas en cada una de las condiciones fijadas por el diseño están recogidas en la Tabla 11. Según se puede apreciar, la máxima sensibilidad se obtiene en el punto 2, mientras que el mínimo porcentaje de error corresponde al punto 9.

**Tabla 9.** Diseño compuesto central y rotativo. Variables experimentales, niveles estudiados y matriz del diseño.

Factor	<u>Variable experimental</u>	<u>Niveles</u>				
		<u>-1.682</u>	<u>-1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1.682</u>
X <sub>1</sub>	Volumen de inyección (μL)	25	71	137	204	250
X <sub>2</sub>	Flujo de eliminación del disolvente (mL/min)	50	141	275	409	500
X <sub>3</sub>	Temperatura inicial del PTV (°C)	10	18	30	42	50

<u>Experiencia</u>	<u>X<sub>1</sub></u>	<u>X<sub>2</sub></u>	<u>X<sub>3</sub></u>	<u>Experiencia</u>	<u>X<sub>1</sub></u>	<u>X<sub>2</sub></u>	<u>X<sub>3</sub></u>
1	71	141	18	11	137	50	30
2	204	141	18	12	137	500	30
3	71	409	18	13	137	275	10
4	204	409	18	14	137	275	50
5	71	141	42	15	137	275	30
6	204	141	42	16	137	275	30
7	71	409	42	17	137	275	30
8	204	409	42	18	137	275	30
9	25	275	30	19	137	275	30
10	250	275	30	20	137	275	30

**Tabla 10.** Valores máximos y mínimos de sensibilidad, exactitud y precisión obtenidos para cada compuesto en el diseño experimental.

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración<sup>(1)</sup></u>	<u>Sensibilidad<sup>(2)</sup></u>		<u>Exactitud<sup>(3)</sup></u>		<u>Precisión<sup>(4)</sup></u>	
		<u>Max.</u>	<u>Min.</u>	<u>Max.</u>	<u>Min.</u>	<u>Max.</u>	<u>Min.</u>
Pentanoato de etilo	0.1	1.03	0.19	65.84	21.01	28.02	3.66
trans-2-Hexenal	0.1	1.68	0.35	51.60	5.33	22.49	1.08
Acetato de hexilo	0.1	1.10	0.16	64.37	7.14	33.85	1.74
trans-2-Hexen-1-ol	0.1	2.99	0.55	104.82	9.16	21.08	0.96
Succinato de dietilo	0.6	16.58	1.24	47.07	5.04	27.88	1.11
$\alpha$ -Terpineol	1.2	43.78	6.56	8.68	0.63	4.78	0.46
Acetato de 2-feniletilo	0.3	15.46	1.46	52.51	5.68	9.33	1.35
2-Feniletanol	0.3	8.73	1.01	21.40	3.74	17.89	0.70

(1) Concentración (mg/L)

(2) Valores máximos y mínimos de las áreas absolutas de los picos de cada compuesto.

(3) Valores máximos y mínimos de los porcentajes de error obtenidos a partir de las áreas normalizadas de los picos.

(4) Valores máximos y mínimos de los coeficientes de variación de las áreas normalizadas de los picos (n = 5).

**Tabla 11.** Valores de las respuestas en cada punto del diseño experimental.

<u>Experiencia</u>	<u>Y<sub>1</sub><sup>(1)</sup></u>	<u>Y<sub>2</sub><sup>(2)</sup></u>	<u>Y<sub>3</sub><sup>(3)</sup></u>	<u>Y<sub>4</sub><sup>(4)</sup></u>	<u>Experiencia</u>	<u>Y<sub>1</sub><sup>(1)</sup></u>	<u>Y<sub>2</sub><sup>(2)</sup></u>	<u>Y<sub>3</sub><sup>(3)</sup></u>	<u>Y<sub>4</sub><sup>(4)</sup></u>
1	34.58	29.51	0.422	18.73	11	66.95	20.21	0.645	38.48
2	103.42	25.35	1.106	52.09	12	42.12	25.70	0.426	22.47
3	31.19	22.79	0.407	17.78	13	72.37	26.70	0.770	37.70
4	74.24	32.96	0.991	38.39	14	45.81	23.94	0.188	24.41
5	31.53	24.57	0.500	17.48	15	50.14	33.20	0.612	26.98
6	80.75	24.81	0.766	43.78	16	60.39	27.36	0.765	32.65
7	38.72	18.44	0.357	20.99	17	61.13	26.25	0.745	32.00
8	71.69	33.37	0.646	32.65	18	56.33	30.13	0.668	28.96
9	11.53	16.69	0.206	6.56	19	57.97	28.96	0.730	30.98
10	87.52	37.04	1.032	43.14	20	57.45	27.61	0.724	30.82

(1) Respuesta: Suma de áreas.

(2) Respuesta: % de error.

(3) Respuesta: Area del pentanoato de etilo.

(4) Respuesta: Area del  $\alpha$ -terpineol.

No se observa ajuste, para los coeficientes de variación obtenidos, utilizando el modelo descrito por la ecuación [8] (pg. 104). Por tanto, del análisis del diseño  $2^3$  factorial incluido en el diseño compuesto central y rotativo se puede deducir que las tres variables consideradas no afectan apreciablemente a la precisión del método. Sin embargo, es interesante destacar que en la mayoría de los casos, el coeficiente de variación medio obtenido es inferior al 10%, lo que, teniendo en cuenta que dicho valor se refiere al método completo de análisis y que, por tanto, incluye las etapas de aislamiento, concentración y separación, se considera satisfactorio.

Las ecuaciones [11] y [12] resultaron del ajuste de los modelos empíricos a los datos experimentales obtenidos al considerar, respectivamente, la sensibilidad (suma de áreas) y la exactitud (% error) como respuestas:

$$y_1 = 57.02 + 23.57X_1 - 5.58X_2 - 4.79X_3 - 1.86X_1^2 + 1.52X_3^2 - 5.25X_1X_2 - 3.71X_1X_3 + 3.84X_2X_3. \quad [11]$$

$$y_2 = 28.56 + 4.06X_1 + 0.92X_2 - 1.03X_3 - 1.72X_2^2 - 0.88X_3^2 + 3.63X_1X_2 + 1.14X_1X_3. \quad [12]$$

En las Tablas 12 y 13 se muestran los valores estimados de los coeficientes ( $b_i$ ) y el correspondiente análisis de la

**Tabla 12.** Coeficientes estimados (obtenidos al recalcular las regresiones considerando únicamente los coeficientes mayores que sus errores standard) de la ecuación [11] (Respuesta: Suma de áreas de todos los picos) y tabla del análisis de la varianza.

<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>	<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>
$b_0 = 57.023$	1.730	$b_{33} = 1.521$	1.310
$b_1 = 23.569$	1.352	$b_{12} = -5.255$	1.767
$b_2 = -5.579$	1.352	$b_{13} = -3.712$	1.767
$b_3 = -4.789$	1.352	$b_{23} = 3.837$	1.767
$b_{11} = -1.860$	1.310		

Tipo de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada	F* tabulada ( $\alpha = 0.05$ )
Términos de primer orden	8324.824	3	2774.941	180.50	5.41
Términos de segundo orden	541.248	5	108.250	7.04	5.05
Falta de ajuste	197.834	6	32.972	2.14	4.95
<u>Puro error</u>	<u>76.869</u>	<u>5</u>	<u>15.374</u>		
Total	9140.775	19			

Coeficiente de determinación:  $R^2 = 0.9699$

\* F de Snédécor

**Tabla 13.** Coeficientes estimados (obtenidos al recalcular las regresiones considerando únicamente los coeficientes mayores que sus errores standard) de la ecuación [12] (respuesta: % de error) y tabla del análisis de la varianza.

<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>	<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>
$b_0 = 28.558$	0.926	$b_{22} = -1.720$	0.701
$b_1 = 4.057$	0.724	$b_{33} = -0.884$	0.701
$b_2 = 0.919$	0.724	$b_{12} = 3.627$	0.946
$b_3 = -1.030$	0.724	$b_{13} = 1.145$	0.946

Tipo de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada	F* tabulada ( $\alpha = 0.05$ )
Términos de primer orden	250.787	3	83.596	13.45	5.41
Términos de segundo orden	166.615	4	41.654	6.70	5.19
Falta de ajuste	54.870	7	7.839	1.26	4.88
<u>Puro error</u>	<u>31.063</u>	<u>5</u>	<u>6.213</u>		
Total	503.335	19			

Coeficiente de determinación:  $R^2 = 0.8293$

\* F de Snédécor

varianza obtenidos, respectivamente, a partir de las ecuaciones [11] y [12]. Son destacables los altos valores del coeficiente de  $X_1$ , que confirman que el volumen de inyección es la variable que, como era previsible, más condiciona la sensibilidad. Asimismo, se obtuvieron valores apreciables para algunos coeficientes de interacción ( $b_{ij}$ ), que habrían sido difíciles de detectar si se hubiesen evaluado la influencia de las distintas variables independientemente.

Los términos de primer y segundo orden resultaron significativos, mientras que no lo fue la falta de ajuste (con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ ). Los valores del coeficiente de determinación,  $R^2$ , indican que el modelo explica en gran proporción la variabilidad de los datos experimentales, especialmente los que corresponden a la sensibilidad.

### 3.2.2. Curvas de isorrespuesta.

En las Figuras 17 a 22 se pueden observar distintas gráficas de curvas de isorrespuesta. Para obtener las representaciones bidimensionales correspondientes se ha fijado en cada caso una de las tres variables. Fijando la variable  $X_1$  (volumen de muestra) al máximo nivel codificado (1.682) en la ecuación [11] se obtuvo la Figura 17; la Figura 18 es el resultado de fijar la variable  $X_2$  (flujo de

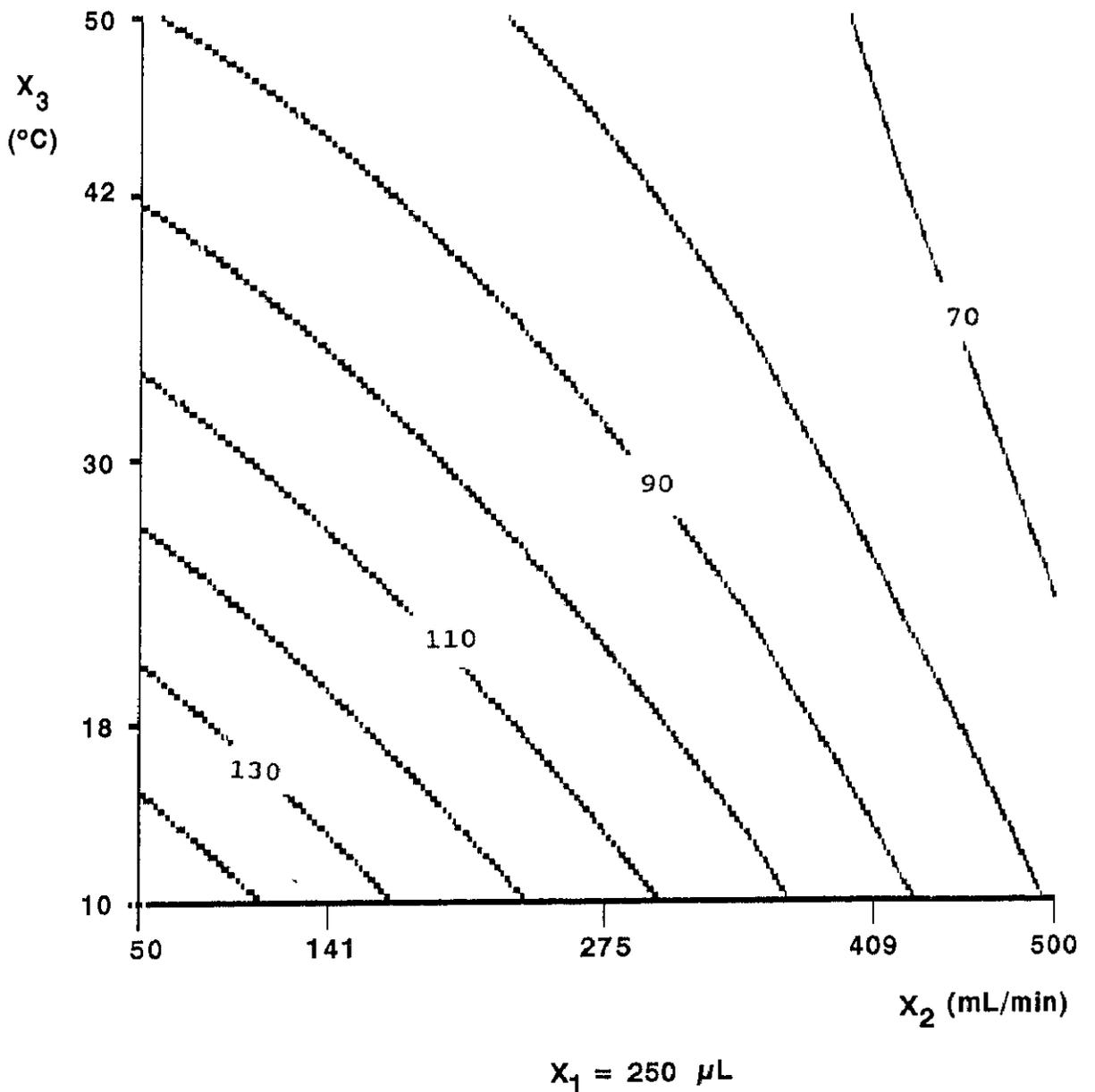


Figura 17. Curvas de isorrespuesta que representan la variación de la suma de áreas (ecuación [11]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en  $250 \mu\text{L}$ .

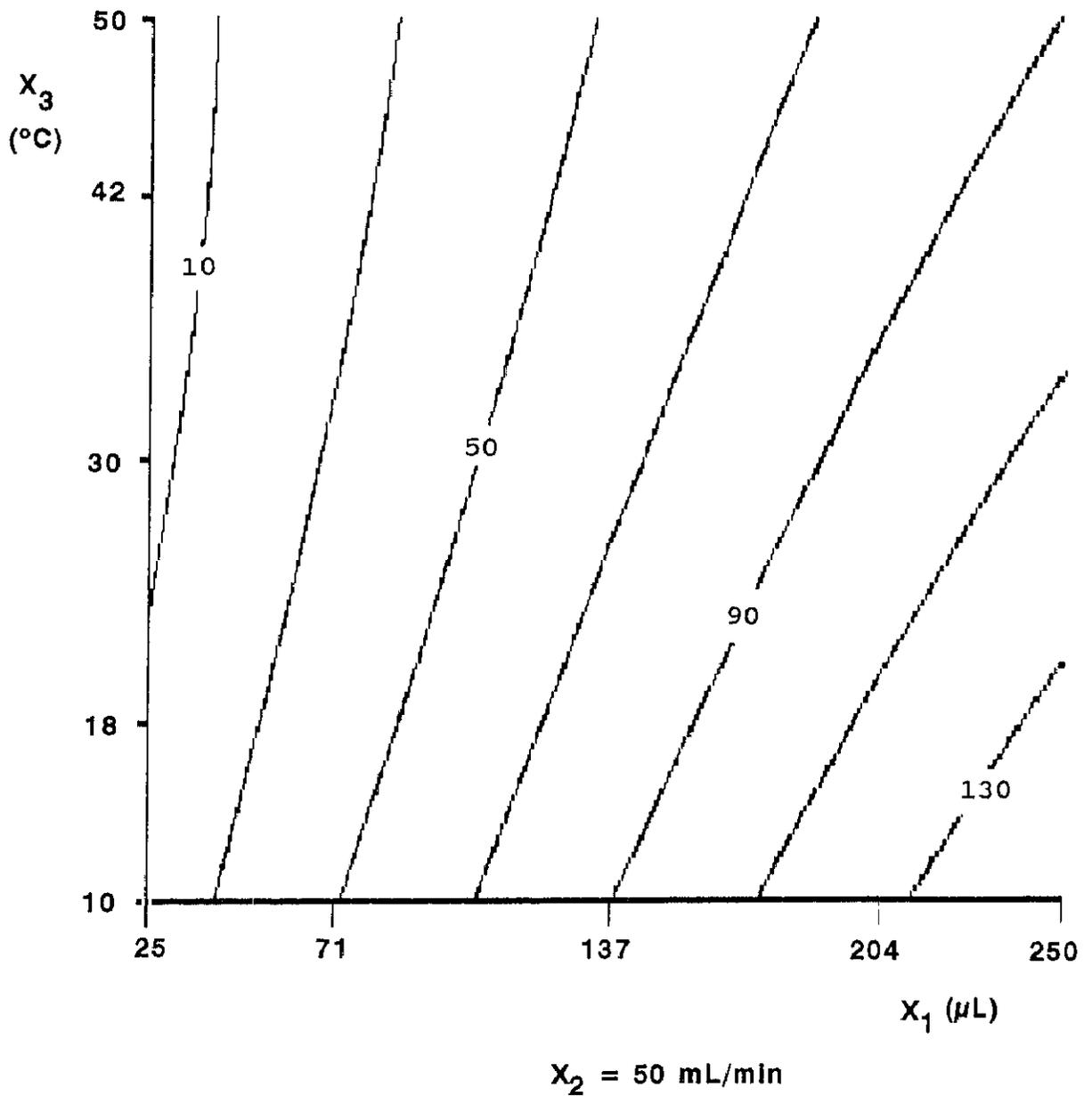
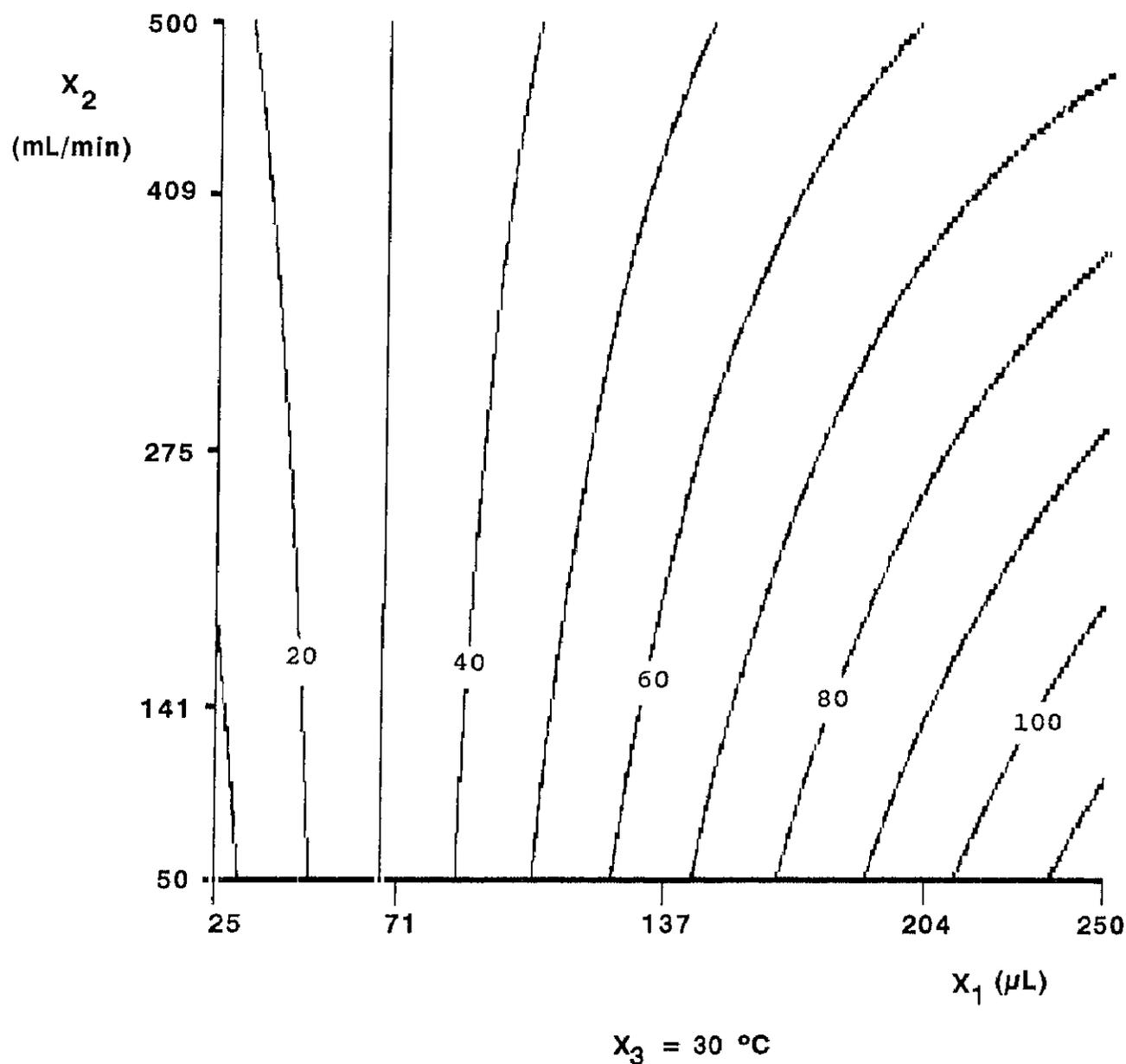


Figura 18. Curvas de isorrespuesta que representan la variación de la suma de áreas (ecuación [11]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el flujo de gas ( $X_2$ ) en  $50 \text{ mL/min}$ .



**Figura 19.** Curvas de isorrespuesta que representan la variación de la suma de áreas (ecuación [11]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y el flujo de gas ( $X_2$ ) manteniendo constante la temperatura del inyector ( $X_3$ ) en  $30^\circ\text{C}$ .

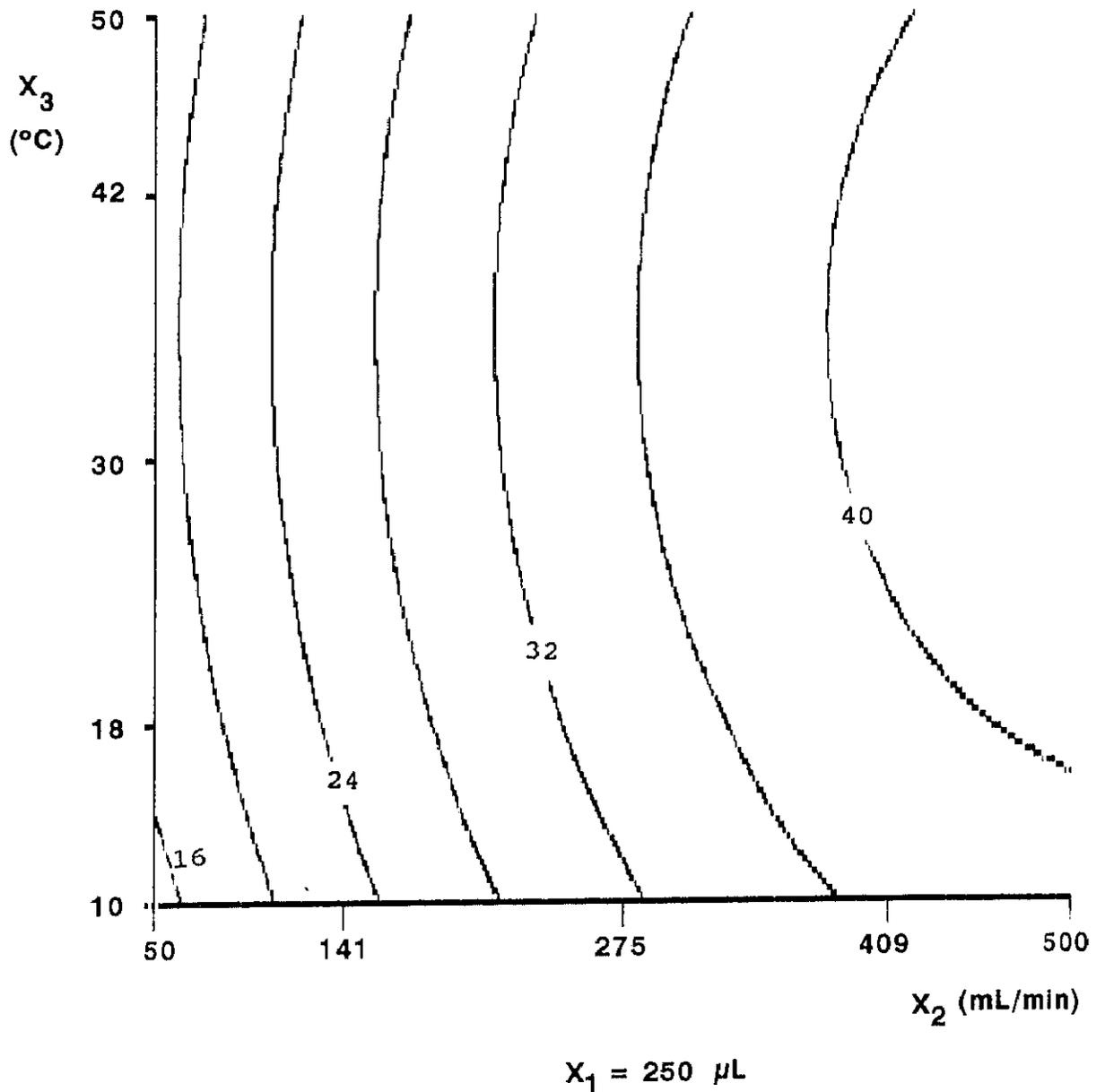


Figura 20. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del % de error (ecuación [12]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en  $250 \mu\text{L}$ .

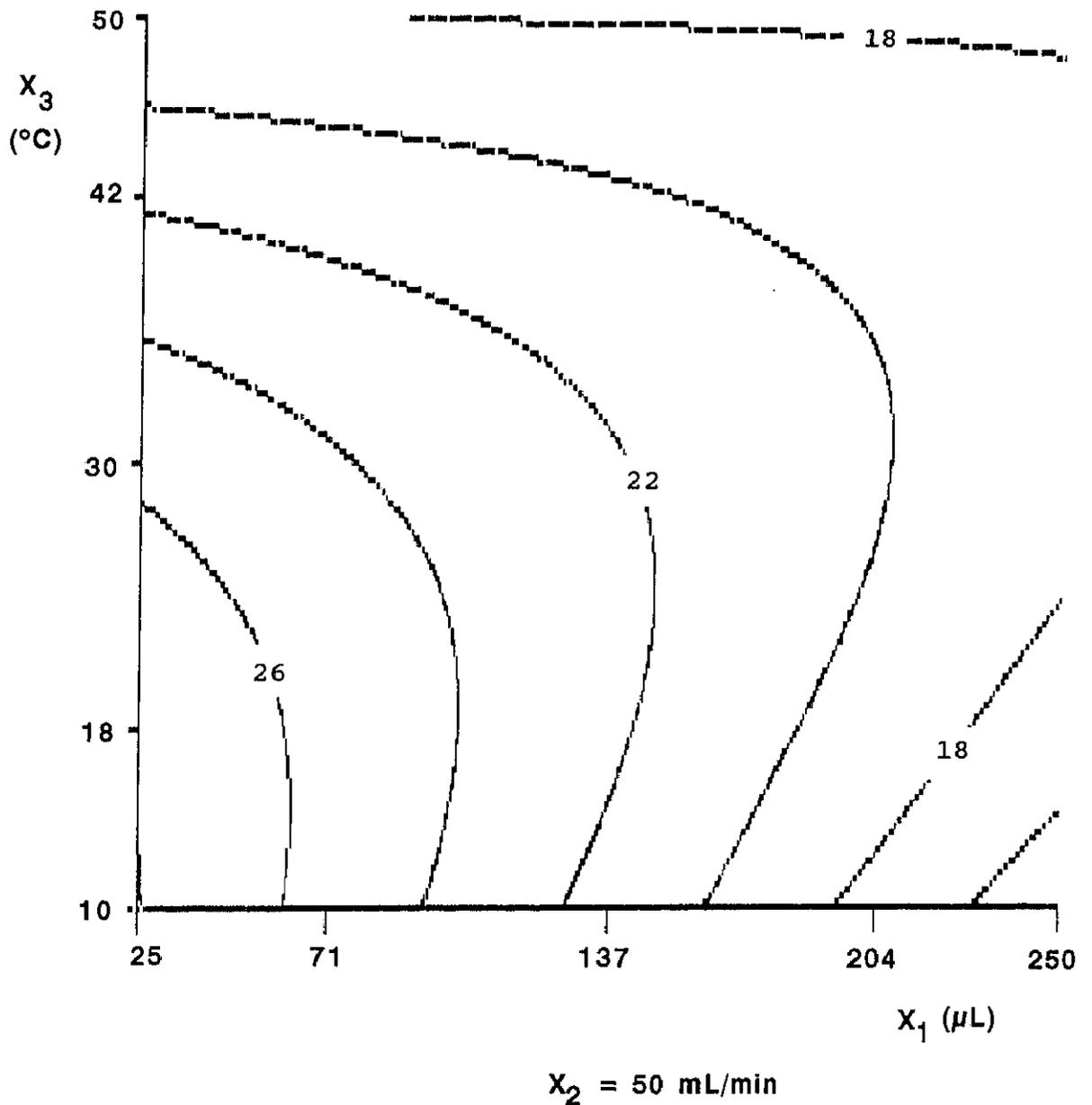


Figura 21. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del % de error (ecuación [12]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el flujo de gas ( $X_2$ ) en 50 mL/min.

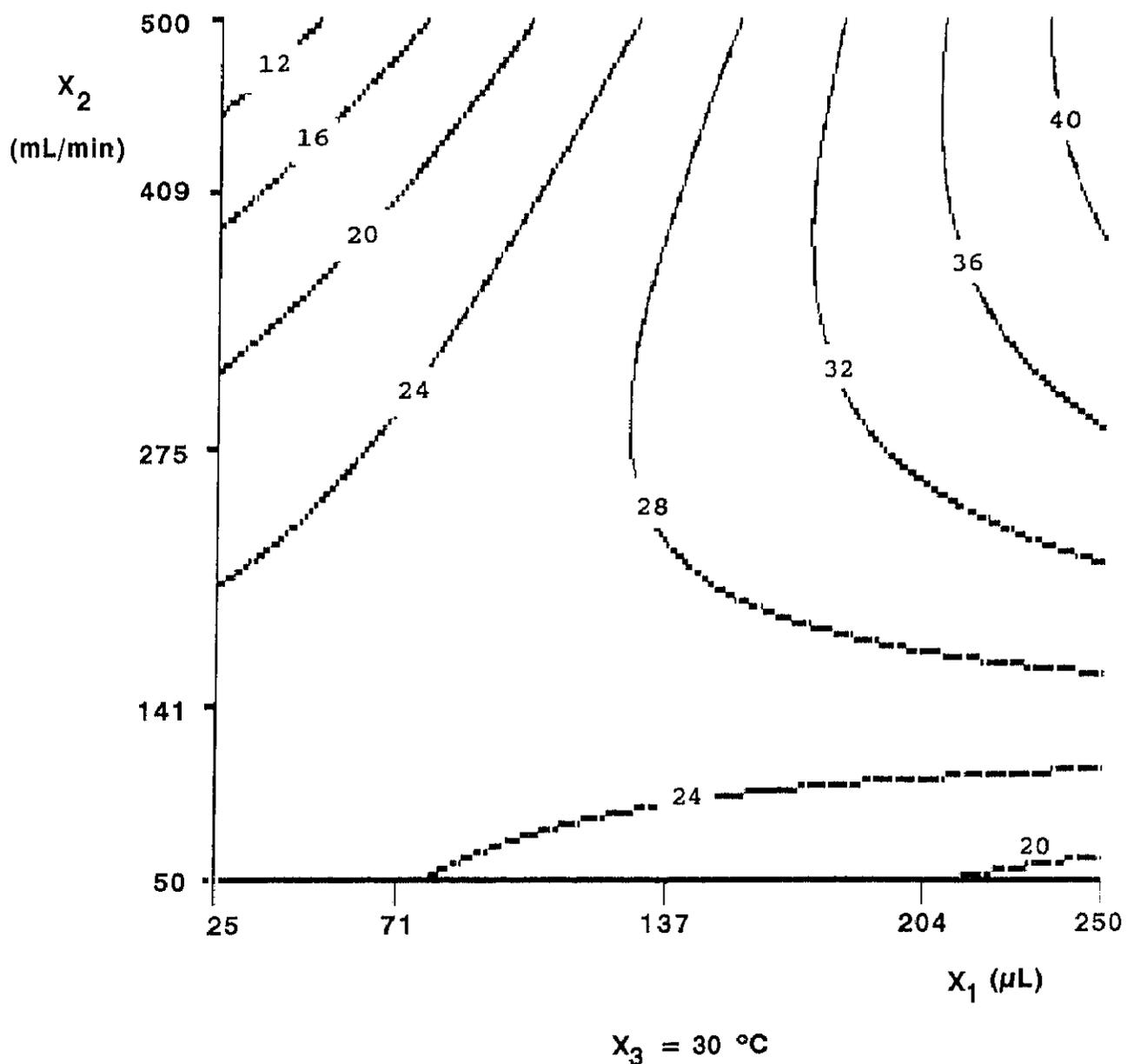


Figura 22. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del % de error (ecuación [12]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y el flujo de gas ( $X_2$ ) manteniendo constante la temperatura del inyector ( $X_3$ ) en  $30^\circ\text{C}$ .

eliminación del disolvente) al mínimo nivel codificado (- 1.682), mientras que la Figura 19 se obtiene fijando la variable  $X_3$  (temperatura del PTV durante la eliminación del disolvente) al nivel medio (0). Análogamente, se han obtenido las Figuras 20, 21 y 22 fijando respectivamente  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  en la ecuación [12] al máximo, mínimo y medio nivel codificado. Se han elegido estas representaciones, entre las múltiples que se pueden obtener fijando las variables a distintos niveles, por considerar que proporcionan una información suficientemente ilustrativa sobre el proceso evaluado.

La Figura 17 muestra la influencia del flujo de gas portador y de la temperatura del inyector durante la eliminación selectiva del disolvente, en la sensibilidad del análisis, cuando se inyecta el máximo volumen experimentado (250  $\mu$ L). Se puede apreciar que la sensibilidad del método aumenta cuando disminuyen el flujo y la temperatura, y simultáneamente se produce una mejoría de la exactitud del análisis, como puede observarse, en este caso, en la Figura 20. Resulta también interesante comentar que la influencia del flujo durante la eliminación del disolvente en la sensibilidad depende de la temperatura inicial del inyector y viceversa: a temperaturas altas el flujo influye en la sensibilidad menos apreciablemente que a temperaturas bajas, mientras que a flujos altos, la influencia de la temperatura

en la sensibilidad es mucho menor que a flujos bajos. Estas observaciones evidencian la interacción existente entre  $X_2$  y  $X_3$ .

De la inclinación de las curvas de nivel de la Figura 20 se puede deducir que, cuando se inyecta el máximo volumen de muestra (250  $\mu\text{L}$ ), el flujo de gas tiene una marcada influencia en la exactitud del análisis a cualquier valor dado de  $X_3$ , mientras que la temperatura del PTV apenas influye a cualquier valor de  $X_2$ .

Cuando la experimentación se realiza al mínimo nivel de  $X_2$  (flujo durante la eliminación del disolvente = 50 mL/min), un incremento del volumen inyectado junto con una disminución de la temperatura inicial del PTV, proporciona un aumento de la sensibilidad (Figura 18). En cuanto a la exactitud (Figura 21), la influencia de la temperatura del PTV es claramente mayor cuando se inyectan volúmenes pequeños de muestra (interacción  $X_1X_3$ ). Por tanto, el porcentaje de error obtenido cuando el flujo de eliminación del disolvente es de 50 mL/min y el volumen inyectado es cercano a los 25  $\mu\text{L}$ , puede ser reducido aumentando la temperatura inicial del inyector. Por otra parte, la variación del volumen de muestra apenas afecta a la exactitud del análisis si la temperatura del inyector se mantiene entre 40 y 50°C (Figura 21).

De la Figura 19, que representa las líneas de nivel de sensibilidad correspondientes al valor medio del intervalo considerado para la temperatura del inyector, se puede deducir que la influencia de la variable  $X_2$  en la sensibilidad es escasa cuando el análisis se lleva a cabo con los valores más pequeños de  $X_1$ . Sin embargo, a medida que aumenta el volumen inyectado, se aprecia que el efecto del flujo de eliminación del disolvente comienza a ser más evidente (interacción  $X_1X_2$ ), y que esta tendencia se acentúa si la experimentación se realiza a los valores más altos de  $X_1$ . A este respecto, es de destacar que cuando se inyecta un volumen de aproximadamente  $70 \mu\text{L}$ , la variación del flujo no afecta a la sensibilidad del análisis, puesto que en este caso se obtiene la misma respuesta sea cual sea el valor considerado de  $X_2$ , ya que la línea de respuesta resultante es prácticamente paralela al eje de ordenadas.

En la Figura 22 se puede observar que el análisis realizado inyectando  $25 \mu\text{L}$  y manteniendo la temperatura inicial del PTV a  $30^\circ\text{C}$  y el flujo durante la eliminación del disolvente a  $500 \text{ mL/min}$ , proporciona una exactitud razonable. El porcentaje de error obtenido puede variar significativamente (del 12% al 40%) si se aumenta el volumen inyectado y el flujo de eliminación del disolvente se mantiene en su valor más elevado. Sin embargo, la variación del volumen inyectado entre  $25 \mu\text{L}$  y  $137 \mu\text{L}$  (niveles

codificados -1.682 y 0), no produce diferencias relevantes en la exactitud en un amplio intervalo de valores de flujo de eliminación del disolvente (aproximadamente entre 50 y 400 mL/min).

### 3.2.3. Comportamiento individual de solutos de distintas características.

Con objeto de comprobar en qué medida afectan las propiedades particulares de los solutos a su comportamiento en un método analítico como el que se propone, se estudiaron de forma aislada las mismas variables dependientes que en el caso anterior, para dos de los compuestos de la disolución modelo elegidos de forma que la diferencia de volatilidad entre ellos fuera apreciable: pentanoato de etilo y  $\alpha$ -terpineol.

El objetivo de este estudio era evaluar la aplicabilidad del procedimiento propuesto para el análisis de solutos muy volátiles, ya que su posible coelución con el disolvente es una evidente dificultad del método y podría, por consiguiente, suponer una seria limitación para su aplicación posterior a muestras reales.

Al igual que ocurrió cuando se evaluó la respuesta promedio del grupo de compuestos, en este caso las tres

variables estudiadas no influyeron significativamente en la repetibilidad de las áreas correspondientes a los dos solutos considerados. Por otro lado, es evidente que cuando se trata de un solo compuesto, la sensibilidad y la exactitud están relacionadas ya que un incremento del factor de recuperación contribuye tanto a aumentar la primera como a disminuir el porcentaje de error. Por ello el estudio de compuestos de forma individual se centró en la sensibilidad (suma de áreas absolutas siendo cinco el número de replicados), como única respuesta.

**Pentanoato de etilo.**

Ajustando el modelo empírico a los resultados experimentales se obtiene la ecuación [13].

$$\begin{aligned}
 Y_3 = & 0.70 + 0.23X_1 - 5.6 \cdot 10^{-2}X_2 - 0.12X_3 - 3.6 \cdot 10^{-2}X_2^2 \\
 & - 5.6 \cdot 10^{-2}X_3^2 - 8.9 \cdot 10^{-2}X_1X_3
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

La Tabla 14 contiene los coeficientes del modelo estimados y el análisis de la varianza de la ecuación [13]. Es evidente que en la sensibilidad alcanzable en la determinación del pentanoato de etilo debe influir de forma destacada el volumen de muestra en relación con las otras dos variables estudiadas, así como con la interacción entre ellas, dado el alto valor relativo del coeficiente de  $X_1$ . El

**Tabla 14.** Coeficientes estimados (obtenidos al recalcular las regresiones considerando únicamente los coeficientes mayores que sus errores standard) de la ecuación [13] (respuesta: Area del pentanoato de etilo) y tabla del análisis de la varianza.

<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>	<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>
$b_0 = 0.698$	0.029	$b_{22} = -0.036$	0.022
$b_1 = 0.235$	0.028	$b_{33} = -0.056$	0.022
$b_2 = -0.056$	0.028	$b_{13} = -0.089$	0.030
$b_3 = -0.120$	0.028		

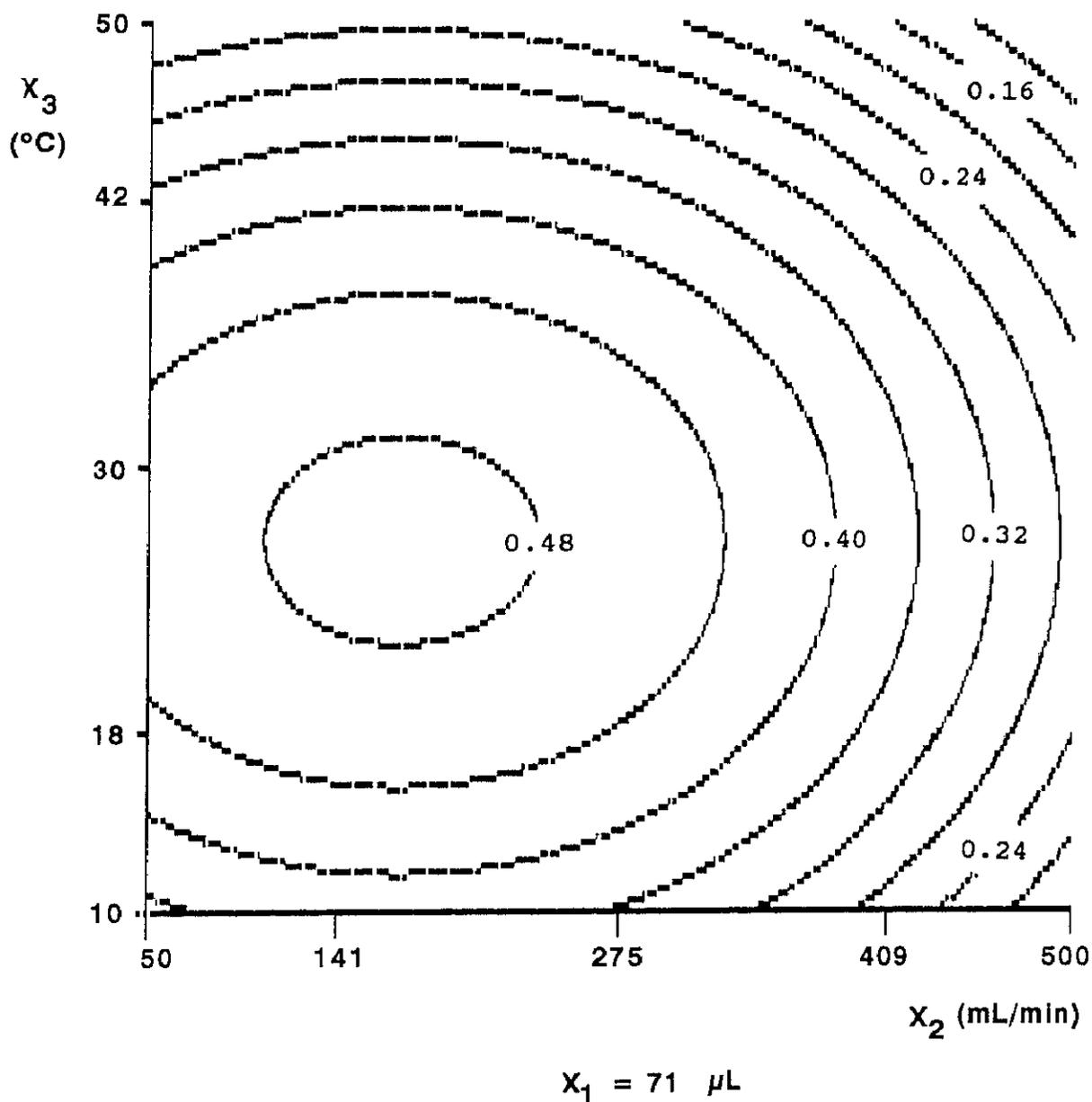
<u>Tipo de variación</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Cuadrados medios</u>	<u>F calculada</u>	<u>F* tabulada (<math>\alpha = 0.05</math>)</u>
Términos de primer orden	0.994	3	0.331	102.43	5.41
Términos de segundo orden	0.123	3	0.041	12.66	5.41
Falta de ajuste	0.077	8	0.010	2.97	4.82
<u>Puro error</u>	<u>0.016</u>	<u>5</u>	0.003		
Total	1.210	19			

Coeficiente de determinación:  $R^2 = 0.9231$

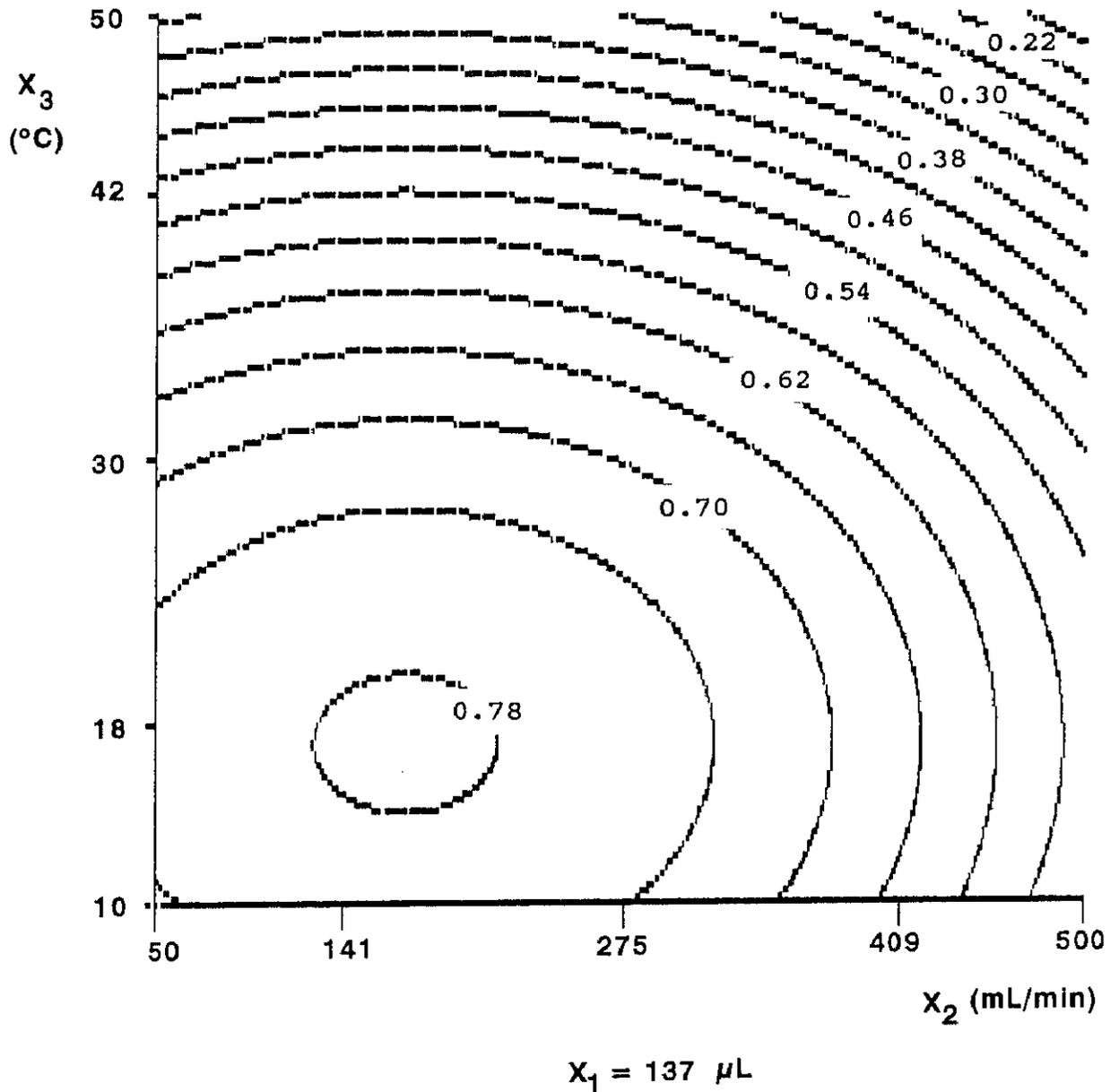
\* F de Snédécór

análisis de la varianza revela que los términos de primer y segundo orden son significativos, no siéndolo la falta de ajuste ( $\alpha = 0.05$ ). El valor del coeficiente de determinación,  $R^2$ , indica que el modelo explica suficientemente la variabilidad observada.

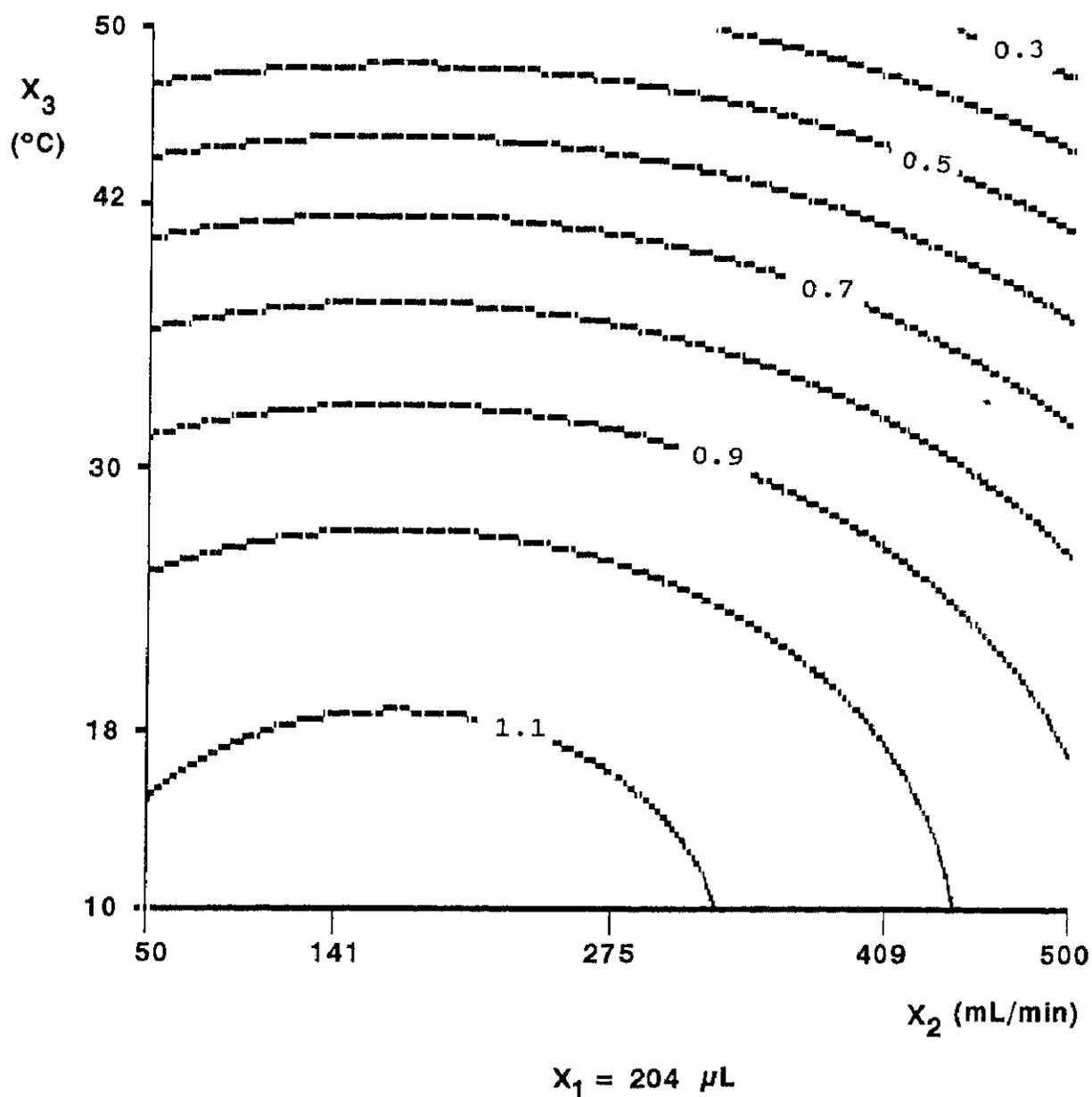
En las Figuras 23 a 27 se presentan las curvas de isorrespuesta obtenidas al fijar, respectivamente, la variable  $X_1$  (volumen inyectado) a los niveles codificados -1, 0 y 1, y las variables  $X_2$  (flujo de eliminación del disolvente) y  $X_3$  (temperatura del PTV durante la eliminación del disolvente) al nivel codificado 0. Las Figuras 23 y 24 indican que para ciertas combinaciones de flujo de gas portador y temperatura del PTV se obtiene un óptimo de sensibilidad. Dicha combinación de valores es distinta según sea el volumen de muestra inyectado, y sugiere la existencia de interacción entre las variables  $X_1$  y  $X_3$ . En este sentido, es interesante comentar que, entre los niveles -1 y 0 (Figuras 23 y 24), si bien el flujo óptimo no varía apreciablemente al modificar el volumen de inyección, la temperatura óptima sí lo hace. El grado de interacción comentado es tan acusado que el máximo de sensibilidad puede incluso desplazarse, quedando fuera de la región experimental cuando el volumen de inyección es elevado, como puede observarse en la Figura 25.



**Figura 23.** Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del pentanoato de etilo (ecuación [13]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en  $71 \mu\text{L}$ .



**Figura 24.** Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del pentanoato de etilo (ecuación [13]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en 137  $\mu\text{L}$ .



**Figura 25.** Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del pentanoato de etilo (ecuación [13]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en  $204 \mu\text{L}$ .

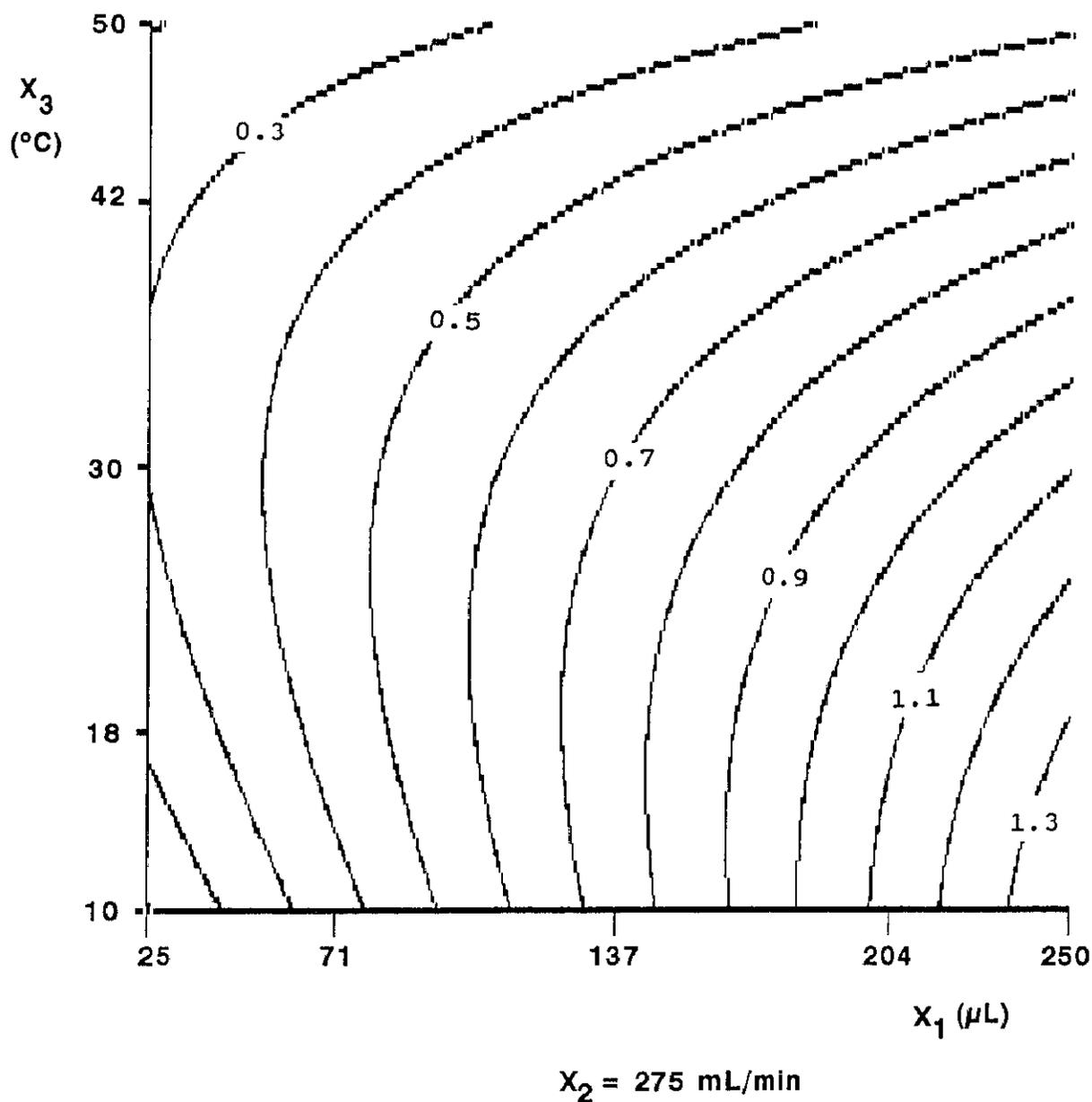


Figura 26. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del pentanoato de etilo (ecuación [13]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el flujo de gas ( $X_2$ ) en 275 mL/min.

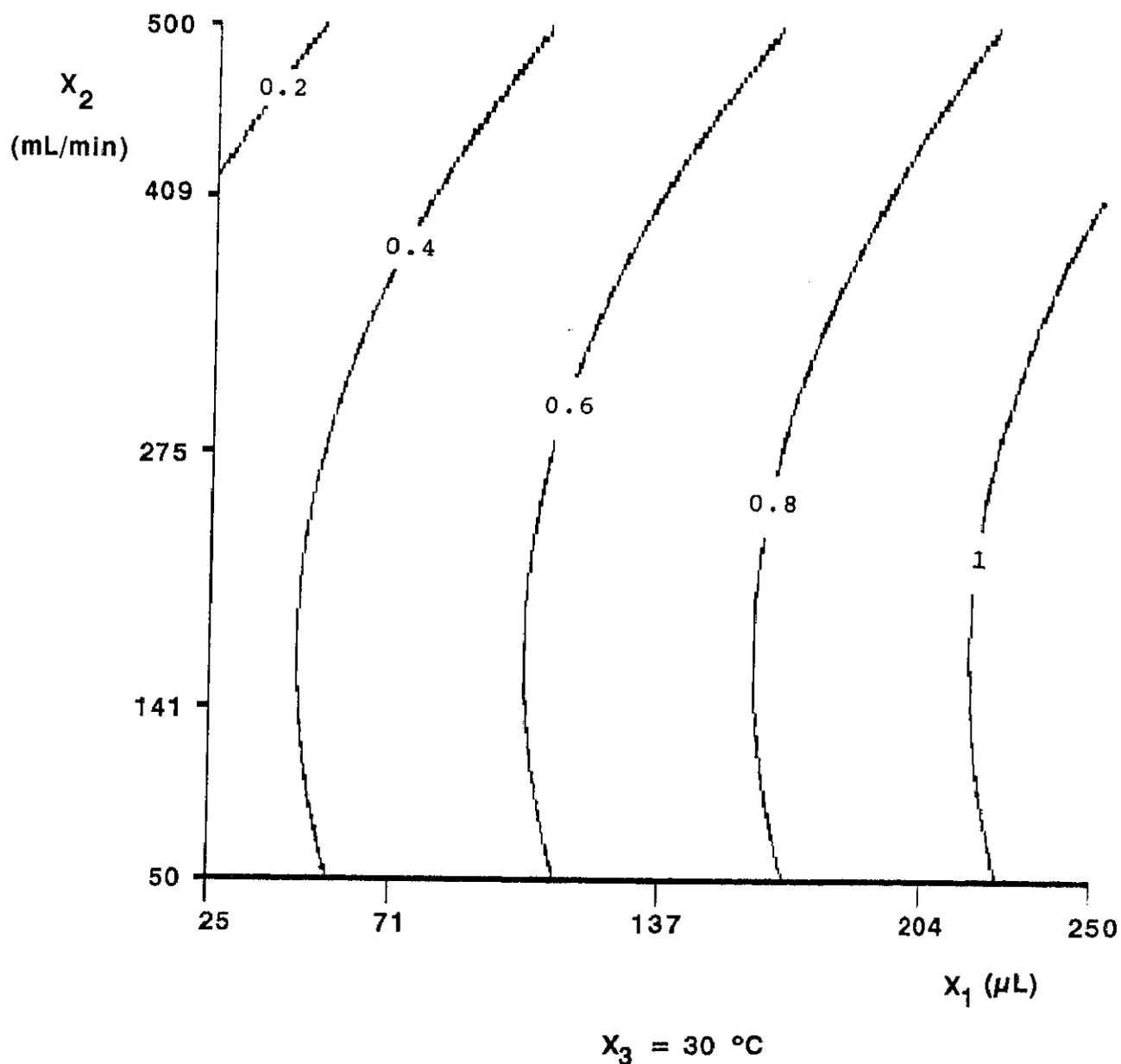


Figura 27. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del pentanoato de etilo (ecuación [13]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y el flujo de gas ( $X_2$ ) manteniendo constante la temperatura del inyector ( $X_3$ ) en  $30^\circ\text{C}$ .

La Figura 26 representa la influencia del volumen de inyección y de la temperatura inicial del PTV en la sensibilidad de la determinación del pentanoato de etilo para un flujo de gas correspondiente al valor central del intervalo experimental estudiado. Se observa que a temperatura baja, un aumento del volumen de inyección origina un fuerte incremento de la sensibilidad. Sin embargo, a altas temperaturas, la influencia del volumen de inyección es menor. De la misma Figura se deduce también que al aumentar el volumen de inyección se debería establecer una temperatura inicial del PTV lo más baja posible con objeto de estar en condiciones de alcanzar mayor sensibilidad en el análisis.

En la Figura 27 se puede observar el efecto del flujo de gas portador y del volumen de muestra al valor medio de la temperatura del PTV. Si se compara con la Figura 26, se aprecia que la influencia del flujo en la sensibilidad del análisis es muy similar a la observada para la temperatura. Sin embargo, existe una clara diferencia ya que, la influencia del flujo en la respuesta no varía con el volumen de inyección. Por tanto, no se detecta interacción entre las variables, o bien dicha interacción es inferior al error standard del ajuste.

**$\alpha$ -terpineol**

Ajustando el modelo empírico a los resultados experimentales correspondientes al  $\alpha$ -terpineol, se obtiene la ecuación [14].

$$Y_4 = 31.0 + 11.2X_1 - 3.6 X_2 - 2.52X_3 - 1.7X_2^2 - 3.4X_1X_2 - 2.0X_1X_3 \quad [14]$$

En la Tabla 15 se pueden observar los coeficientes del modelo estimados y los resultados del análisis de la varianza de la ecuación [14]. Al igual que para el pentanoato de etilo y para el conjunto de todos los compuestos, en la sensibilidad de la determinación del  $\alpha$ -terpineol tiene una gran influencia el volumen de inyección, como se deduce del alto valor relativo del coeficiente de  $X_1$ . El análisis de la varianza indica que los términos de primer y segundo orden son significativos, no siéndolo la falta de ajuste ( $\alpha = 0.05$ ). El valor del coeficiente de determinación,  $R^2$ , indica además que el modelo es suficientemente explicativo.

En las Figuras 28, 29 y 30 se representan las curvas de nivel obtenidas respectivamente al fijar las variables  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  al nivel codificado 0.

**Tabla 15.** Coeficientes estimados (obtenidos al recalcular las regresiones considerando únicamente los coeficientes mayores que sus errores standard) de la ecuación [14] (respuesta: Area del  $\alpha$ -terpineol) y tabla del análisis de la varianza.

<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>	<u>Coeficientes</u>	<u>Error standard</u>
$b_0 = 31.026$	0.690	$b_{11} = -1.719$	0.630
$b_1 = 11.236$	0.653	$b_{12} = -3.424$	0.854
$b_2 = -3.602$	0.653	$b_{13} = -2.001$	0.854
$b_3 = -2.522$	0.653		

Tipo de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada	F* tabulada ( $\alpha \approx 0.05$ )
Términos de primer orden	1988.254	3	662.751	151.28	5.41
Términos de segundo orden	169.165	3	56.388	12.87	5.41
Falta de ajuste	53.881	8	6.735	1.54	4.82
<u>Puro error</u>	<u>21.905</u>	<u>5</u>	4.381		
Total	2233.205	19			

Coeficiente de determinación:  $R^2 = 0.9661$

\* F de Snédécor

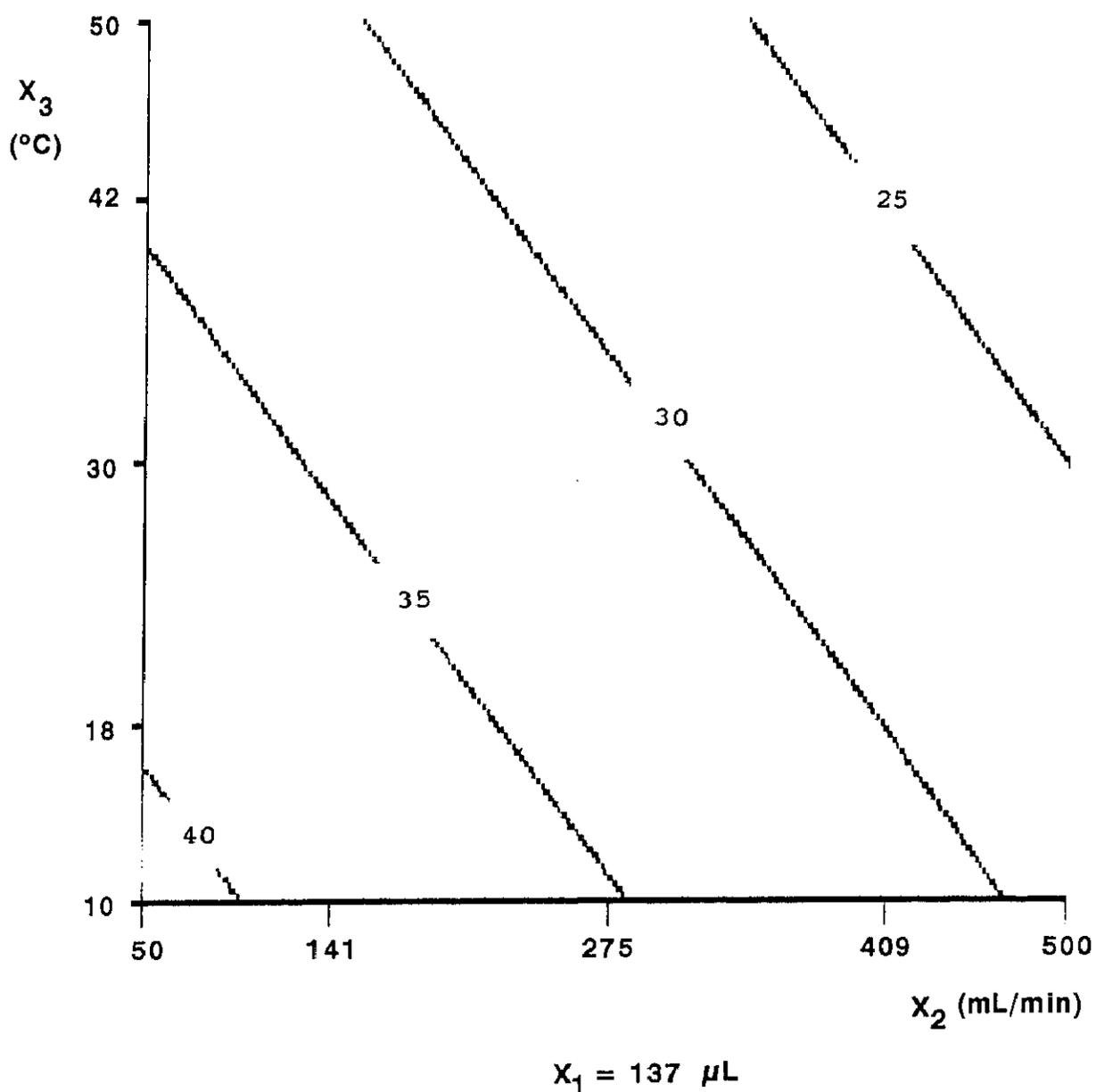


Figura 28. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del  $\alpha$ -terpineol (ecuación [14]) con el flujo de gas ( $X_2$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el volumen de inyección ( $X_1$ ) en  $137 \mu\text{L}$ .

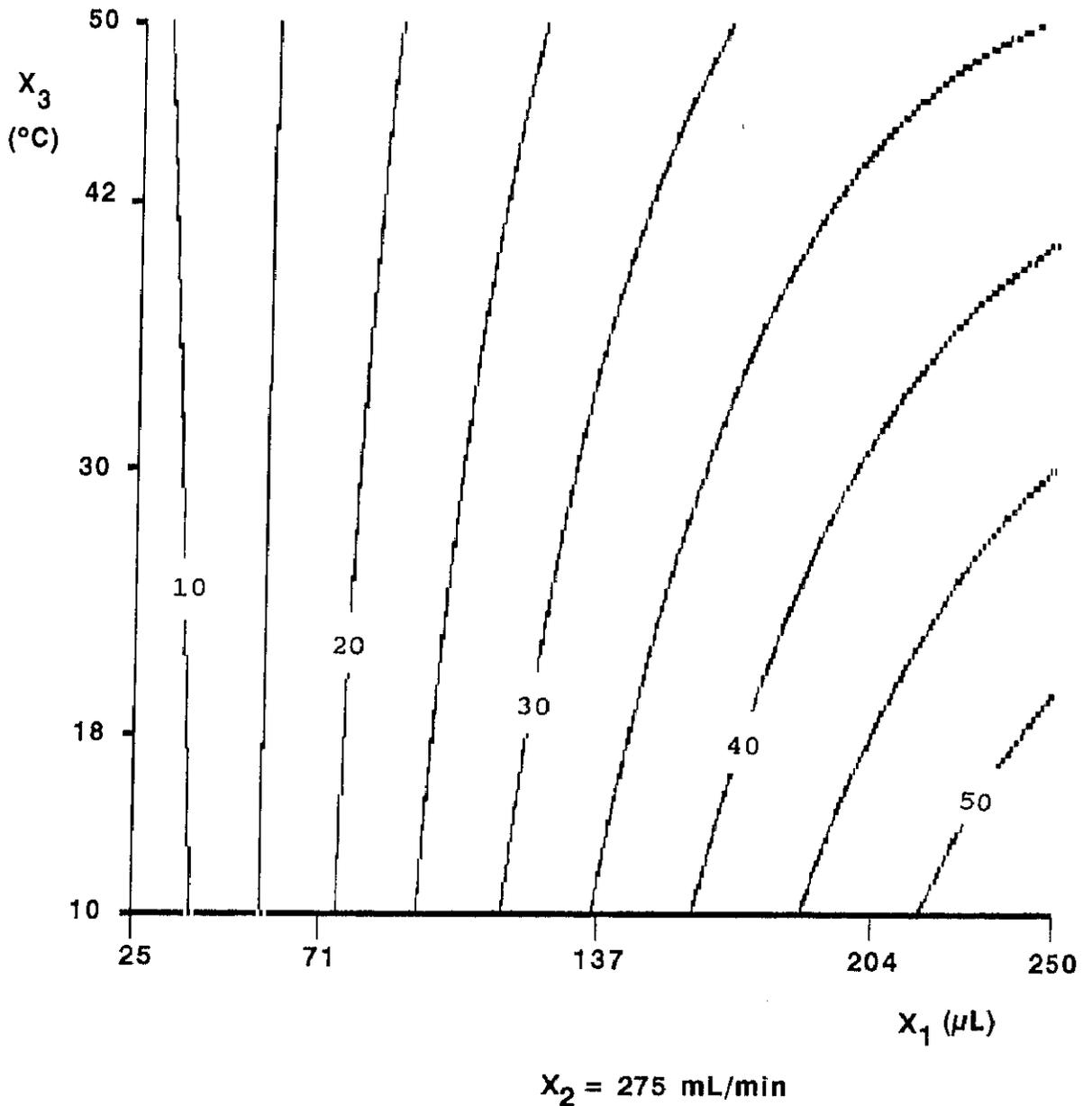


Figura 29. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del  $\alpha$ -terpineol (ecuación [14]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y la temperatura del inyector ( $X_3$ ) manteniendo constante el flujo de gas ( $X_2$ ) en 275 mL/min.

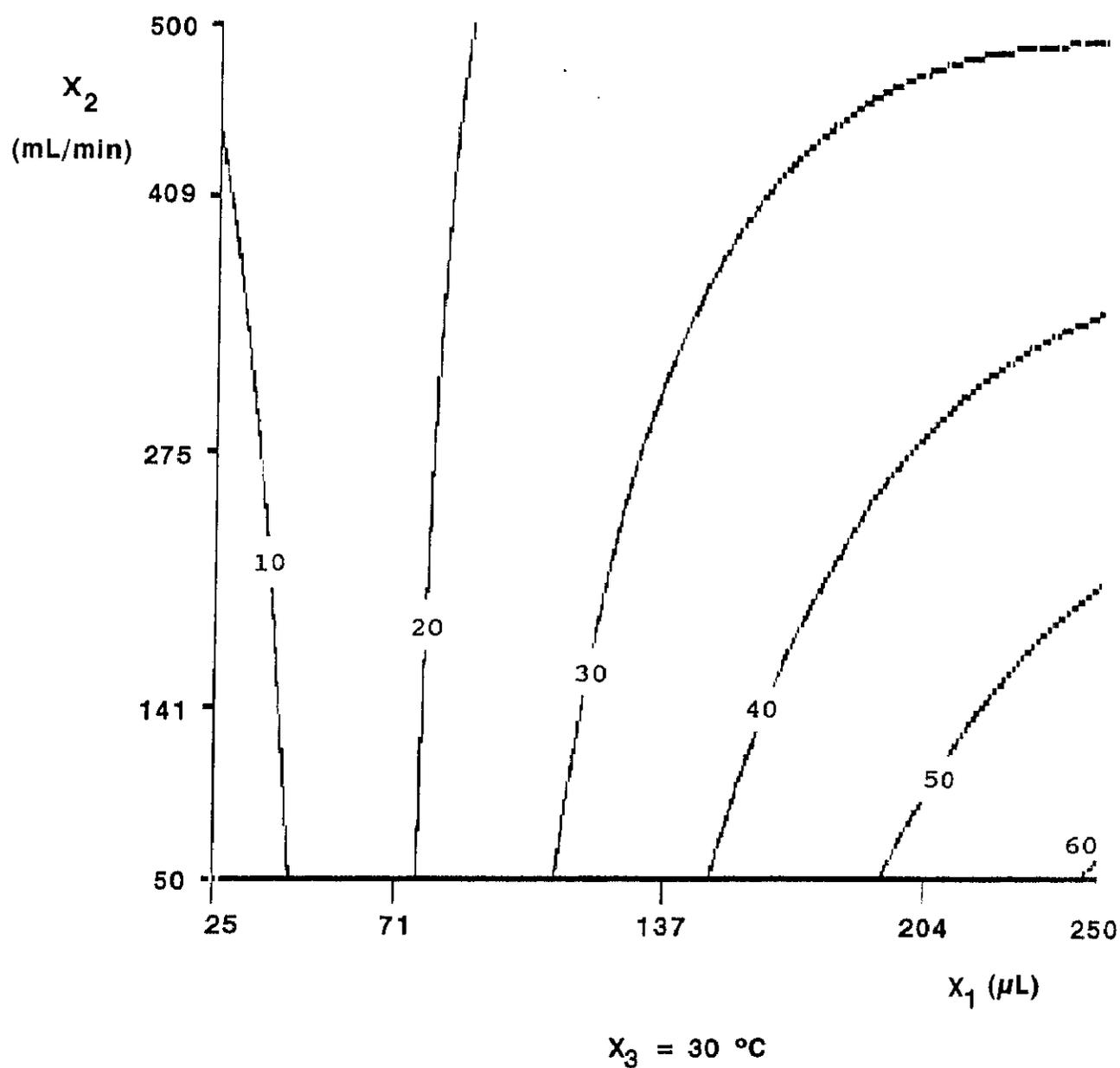


Figura 30. Curvas de isorrespuesta que representan la variación del área del  $\alpha$ -terpineol (ecuación [14]) con el volumen de inyección ( $X_1$ ) y el flujo de gas ( $X_2$ ) manteniendo constante la temperatura del inyector ( $X_3$ ) en  $30^\circ\text{C}$ .

La Figura 28 expresa la influencia del flujo y de la temperatura del PTV en la sensibilidad cuando se inyectan 137  $\mu$ L de muestra. Se puede apreciar cómo la disminución de la temperatura o del flujo provocan un aumento de la sensibilidad. En contraste con el pentanoato de etilo, para el  $\alpha$ -terpineol no sólo no se encuentra dentro de la región experimental una combinación de valores de las variables que proporcionen un valor óptimo de sensibilidad, sino que las curvas de isorrespuesta son en realidad líneas rectas, lo cual indica que dicha combinación óptima de valores se encuentra lejos de la región experimental, de forma que el modelo no aprecia la curvatura que, en otro caso, debería revelar.

En la Figura 29 se puede observar la influencia de la temperatura y del volumen de inyección en la sensibilidad, y en la Figura 30 la influencia del flujo de gas y del volumen de inyección en la misma respuesta. De estas gráficas se puede deducir que un aumento del volumen de inyección da lugar nuevamente a un aumento de sensibilidad, sobre todo cuando la temperatura y el flujo no son altos. También se puede ver cómo las curvas de isorrespuesta son similares en ambas Figuras, lo que sugiere que la temperatura y el flujo de gas influyen de modo análogo en la sensibilidad. Así, se deduce que cuando el volumen de inyección es pequeño, la temperatura y el flujo apenas influyen en la respuesta

evaluada, mientras que a volúmenes de inyección medios o elevados, una disminución de la temperatura o del flujo manteniendo constante respectivamente el flujo de gas (Figura 29) o la temperatura inicial del PTV (Figura 30), provoca en ambos casos un aumento evidente de la sensibilidad.

### 3.3. OPTIMIZACION DE LAS PRINCIPALES VARIABLES QUE AFECTAN A LA EXTRACCION Y CONCENTRACION INTERNAS CON PTV.

#### 3.3.1. Planteamiento de la optimización.

Las tres variables estudiadas en el apartado anterior proporcionan una aproximación muy útil al proceso de extracción y concentración internas en un PTV. Sin embargo, para abordar una optimización más completa del método es necesario ampliar el número de variables inicialmente seleccionadas.

Con esta idea se planificó el presente estudio, en el que se pretendió encontrar los valores óptimos de las principales variables que influyen en el proceso. Considerando como punto de partida el trabajo comentado previamente, se estableció la necesidad de evaluar las ocho variables descritas en Materiales y Métodos y que se enumeran a continuación:

- Volumen de muestra.
- Flujo de gas portador a través del inyector durante la inyección.
- Temperatura del PTV durante la inyección.
- Longitud de "glass liner" relleno de adsorbente.

- Composición del adsorbente.
- Velocidad de introducción de la muestra.
- Volumen de gas empleado para la eliminación del disolvente tras la inyección.
- Temperatura del PTV durante la eliminación del disolvente.

La optimización llevada a cabo en el capítulo anterior se realizó mediante un diseño de experiencias empleando un método de Superficie de Respuesta, lo que permitió estudiar la influencia de las variables en diversos aspectos del análisis, tal y como se ha comentado anteriormente. La posibilidad, que el citado procedimiento ofrece, de predecir la respuesta alcanzable en cualquier punto del intervalo de experimentación es indudablemente de gran ayuda en la planificación de cualquier análisis. Sin embargo, para más de tres variables el número de experiencias que hay que realizar para aplicar un método de Superficie de Respuesta es muy elevado, y la interpretación de los resultados resulta compleja. Por ello, en este caso se utilizó el método Simplex Modificado. Partiendo de los niveles de base y los módulos de paso de las distintas variables indicados en la Tabla 2.

La experimentación realizada inicialmente en el laboratorio puso de manifiesto la crítica influencia de la

velocidad de introducción de muestra para el adecuado funcionamiento del método, coincidiendo con observaciones posteriores de otros autores (Staniewski y Rijks, 1.992). En este sentido, se consideró la necesidad de llevar a cabo la introducción de la muestra mediante un sistema que permitiese controlar su velocidad de entrada de forma exacta y precisa. Para ello se utilizó el dispositivo, diseñado y construido en el propio laboratorio, para realizar inyecciones a velocidad controlada, que se ha descrito en Materiales y Métodos.

### 3.3.2. Desarrollo de la optimización.

Puesto que el método Simplex permite optimizar sólo una respuesta, se optó por evaluar la sensibilidad del procedimiento aplicado. Para ello se eligió el valor de la suma de las áreas correspondientes a cada soluto, divididas por su número de orden de elución, y se estableció como objetivo aumentar significativamente la respuesta alcanzable. De esta forma se trató de minimizar específicamente las pérdidas de los solutos mas volátiles. Para esta optimización se empleó la Disolución 3 (pg. 91).

La Tabla 16 contiene los resultados de la secuencia de experiencias realizadas. Puesto que un simplex es una figura geométrica definida por  $k + 1$  puntos en un espacio de  $k$  dimensiones, donde  $k$  es el número de variables, el simplex

**Tabla 16.** Desarrollo de la optimización mediante el método Simplex Modificado del análisis por inyección directa de elevados volúmenes de muestra.

Vér- tice nº	Sim- plex nº	Niveles de los factores (valores físicos)*								Res- pues- ta**
		V <sub>IO</sub>	F	T <sub>i</sub>	L	%	v <sub>i</sub>	V <sub>OE</sub>	T <sub>e</sub>	
1	1	300	600	40	2.0	0.0	0.200	3000	20.0	3311
2	1	433	653	43	2.3	7.9	0.212	3530	22.6	3974
3	1	326	865	43	2.3	7.9	0.212	3530	22.6	3206
4	1	326	653	53	2.3	7.9	0.212	3530	22.6	3588
5	1	326	653	43	3.8	7.9	0.212	3530	22.6	6367
6	1	326	653	43	2.3	39.8	0.212	3530	22.6	7953
7	1	326	653	43	2.3	7.9	0.262	3530	22.6	2931
8	1	326	653	43	2.3	7.9	0.212	5651	22.6	3997
9	1	326	653	43	2.3	7.9	0.212	3530	33.2	2522
10	2	346	692	45	2.6	13.9	0.220	3928	11.4	5514
11	3	351	702	45	2.7	15.4	0.160	4027	19.0	5646
12	4	357	450	45	2.8	17.3	0.199	4151	18.3	5172
13	5	398	677	50	3.1	29.5	0.211	4970	20.5	6888
14	6	389	630	36	3.2	27.0	0.191	4799	17.3	9218
15	7	421	619	27	3.6	36.5	0.197	5434	14.7	12212
16	8	453	608	18	4.0	46.0	0.184	6069	12.0	13830
17	9	485	597	9	4.5	55.5	0.177	6703	9.0	14957
18	10	297	616	38	3.7	39.0	0.189	5593	14.0	9269
19	11	395	608	37	4.1	46.6	0.184	3457	11.8	10493

\*: V<sub>IO</sub> (μL); F (mL/min); T<sub>i</sub> (°C); L (cm); % (% GasChrom); v<sub>i</sub> (μL/s); V<sub>OE</sub> (mL); T<sub>e</sub> (°C).

\*\* : Suma de las relaciones entre las áreas de los picos integrados y el correspondiente orden de elución.

inicial correspondiente a la optimización de ocho variables está formado por nueve puntos, cuyos valores experimentales constituyen las nueve primeras experiencias. El vértice nº 1 queda definido por el nivel base de cada variable y corresponde al punto inicial del estudio experimental. Los restantes ocho puntos vienen dados por el método, en función de los valores del nivel base y del módulo de paso.

Después de haber realizado las nueve primeras experiencias, se evaluaron las respuestas obtenidas y se rechazó la peor observación (la correspondiente al vértice con el valor más bajo de la respuesta). Por consiguiente, el primer vértice rechazado fue el nº 9. A continuación se llevó a cabo el movimiento en la dirección dada por las reglas del Simplex Modificado, obteniendo de este modo los valores físicos correspondientes al vértice nº 10. El siguiente simplex quedó formado por los ocho puntos no rechazados y el nuevo vértice. La experimentación se continuó hasta dejar de observar en algún movimiento una mejora de la respuesta seleccionada.

En todos los casos se realizó un mínimo de dos replicados de cada análisis.

En la Tabla 16 se puede observar el aumento de la respuesta a lo largo del proceso de optimización. La

estimación de la evolución de la sensibilidad puede realizarse muy fácilmente a partir de los cromatogramas de las Figuras 31-49, que corresponden a los análisis llevados a cabo en todos los vértices considerados. Como se puede apreciar, las condiciones experimentales del vértice nº 17 (volumen de muestra 485  $\mu\text{L}$ ; flujo de gas durante la inyección 597 mL/min; temperatura inicial del PTV 9°C; longitud del adsorbente en el "glass liner" 4.5 cm; porcentaje de GasChrom 220 en la mezcla de adsorbentes 55.5%; velocidad de inyección 0.18  $\mu\text{L/s}$ ; volumen de eliminación 6703 mL; y temperatura de eliminación de disolvente 9°C) son, entre las estudiadas, las que proporcionan la máxima respuesta.

En todos los cromatogramas aparecen inevitablemente algunos picos debidos a monómeros del adsorbente. Sin embargo, la interferencia que suponen es mínima y no representa ningún tipo de impedimento para progresar en el diseño utilizado.

Las Figuras 31 y 47 muestran respectivamente los cromatogramas inicial y final resultantes de la optimización. Comparando estos cromatogramas, resulta evidente que el procedimiento empleado permite obtener una significativa mejora de la sensibilidad del análisis, puesto que el valor obtenido es casi cinco veces mayor en el óptimo que en las condiciones experimentales iniciales. No obstante, incluso

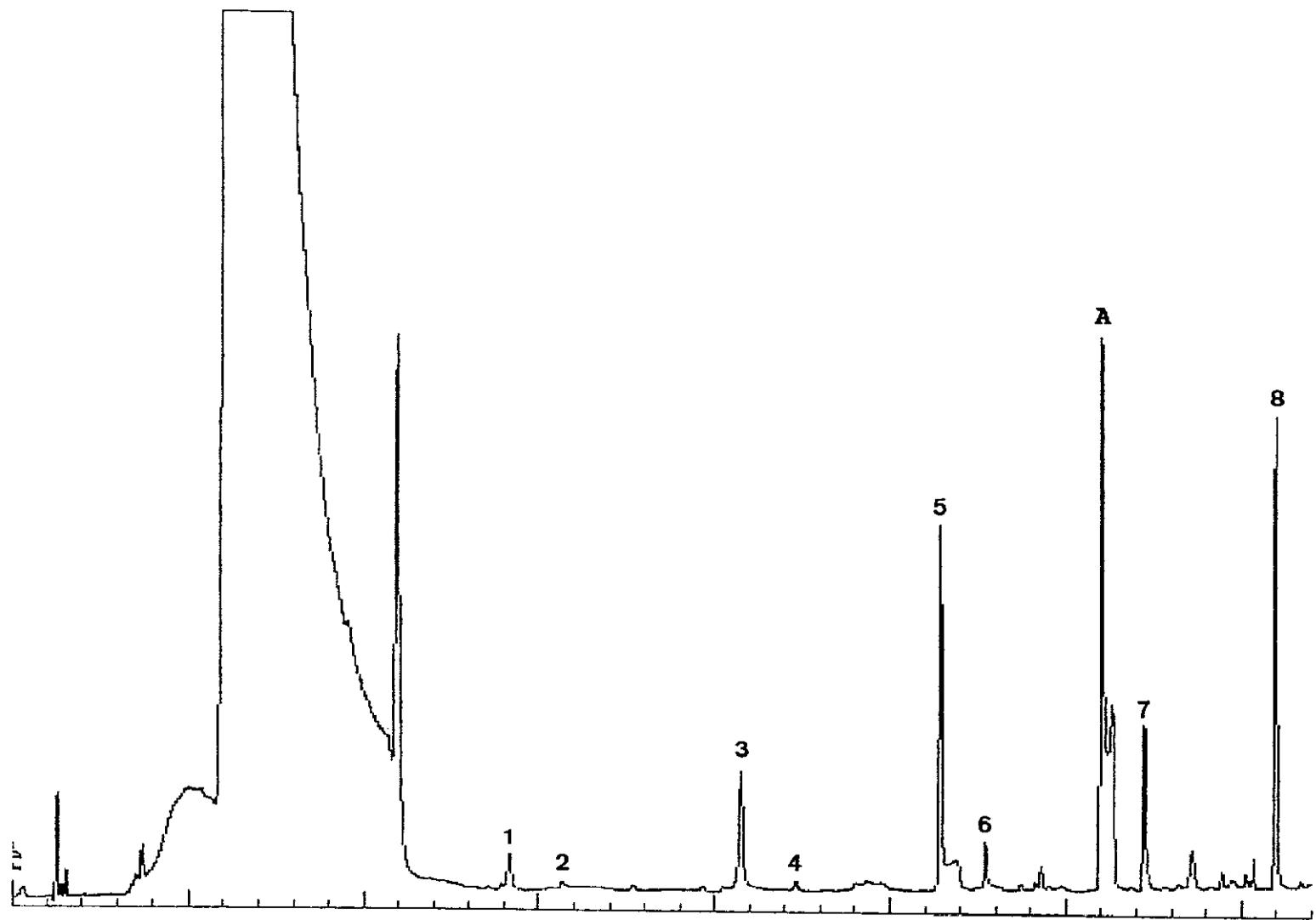


Figura 31. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 1 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos: 1. pentanoato de etilo, 2. 1-butanol, 3. hexanoato de etilo, 4. 1-pentanol, 5. heptanoato de etilo, 6. 1-hexanol, 7. 1-heptanol, 8. 1-octanol, A. Producto de descomposición del adsorbente.

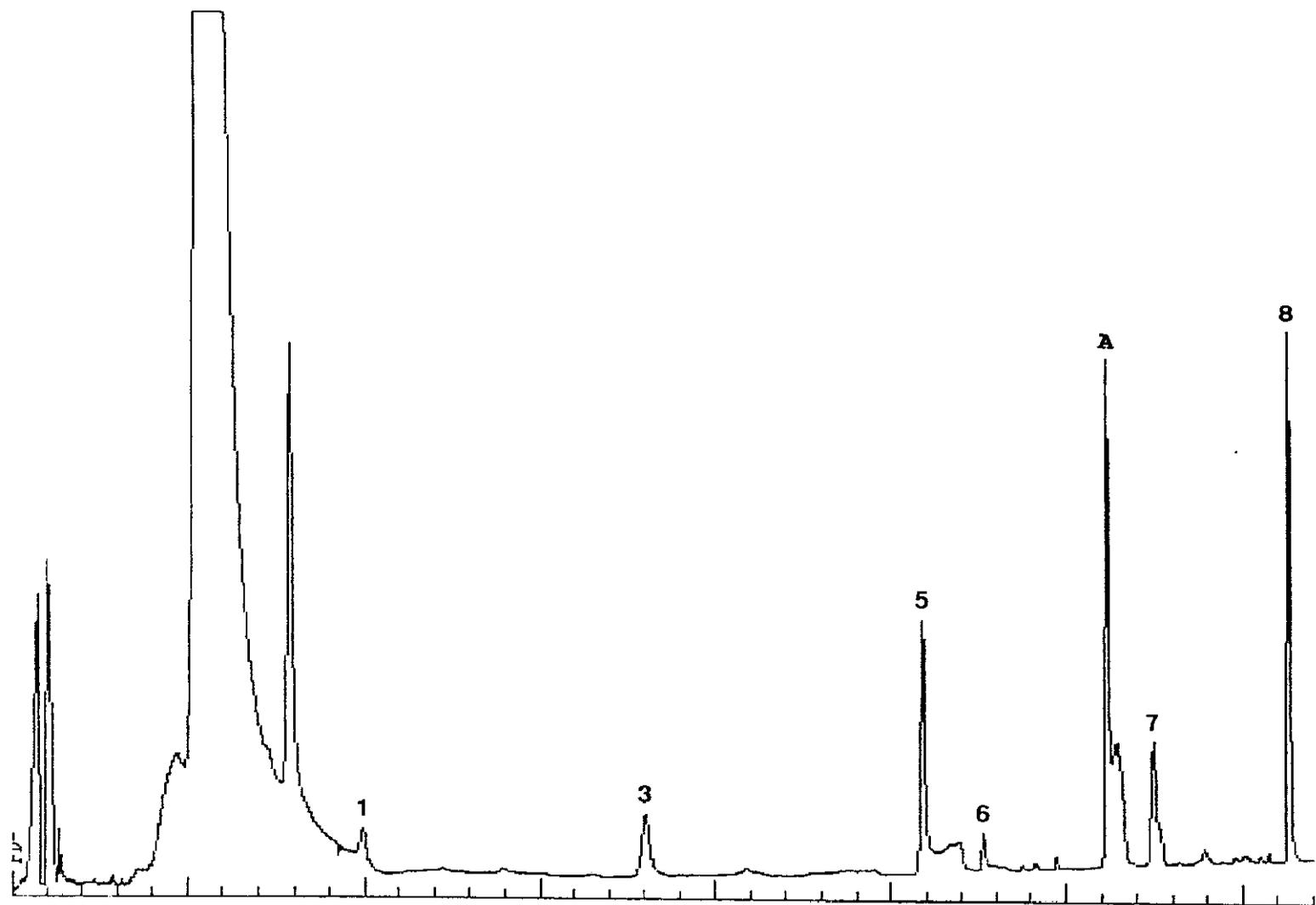


Figura 32. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 2 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado.

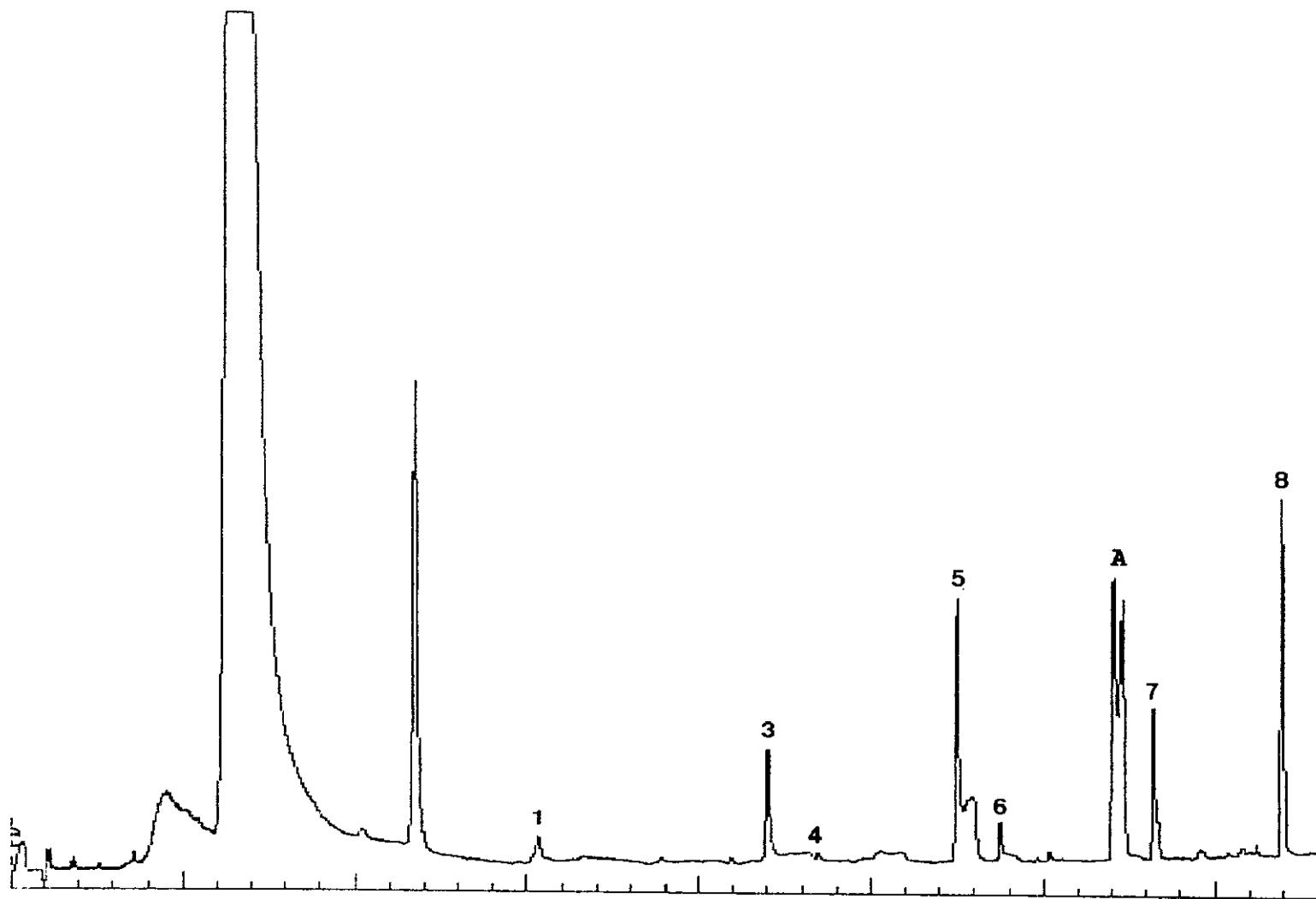


Figura 33. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 3 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

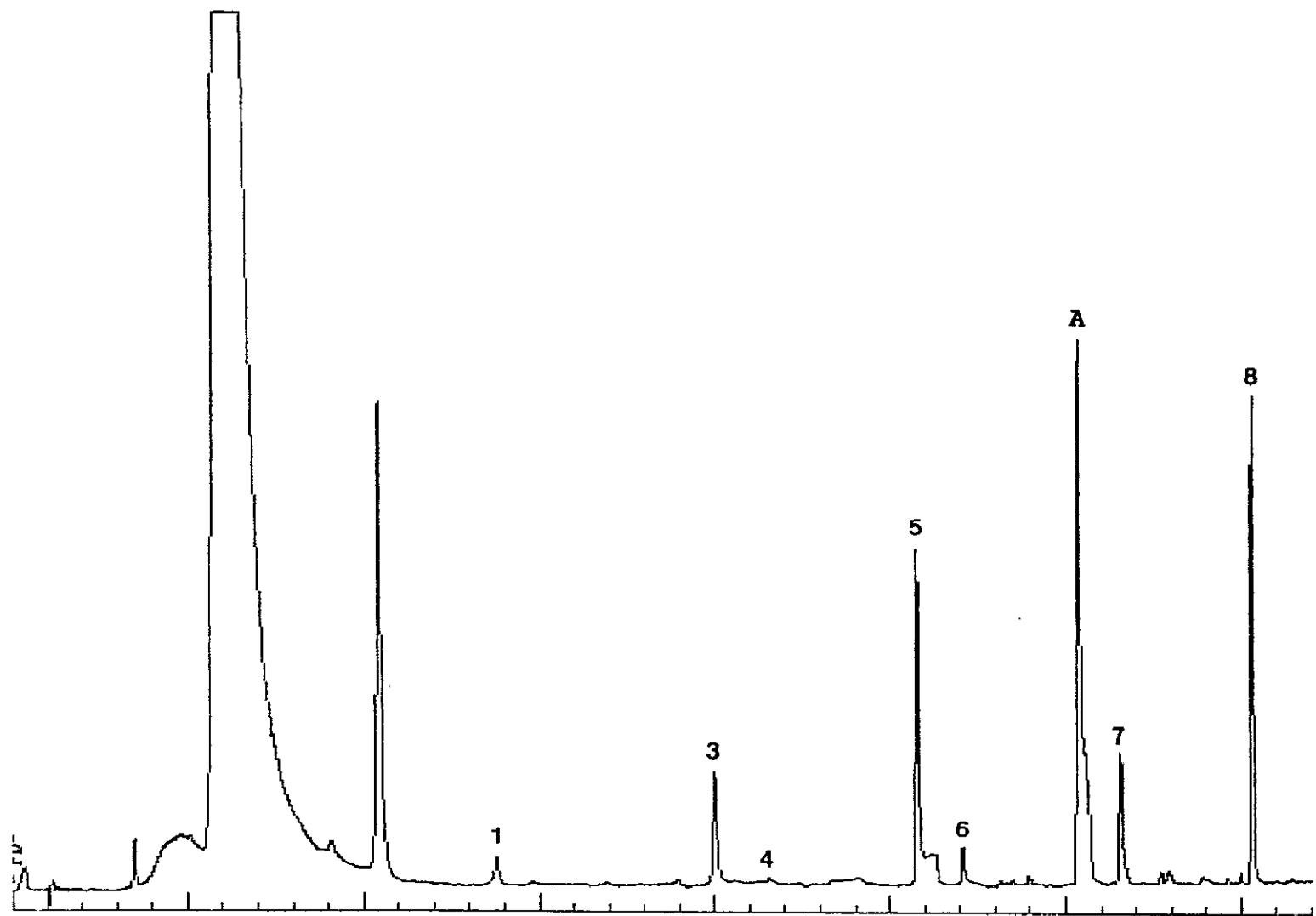


Figura 34. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 4 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

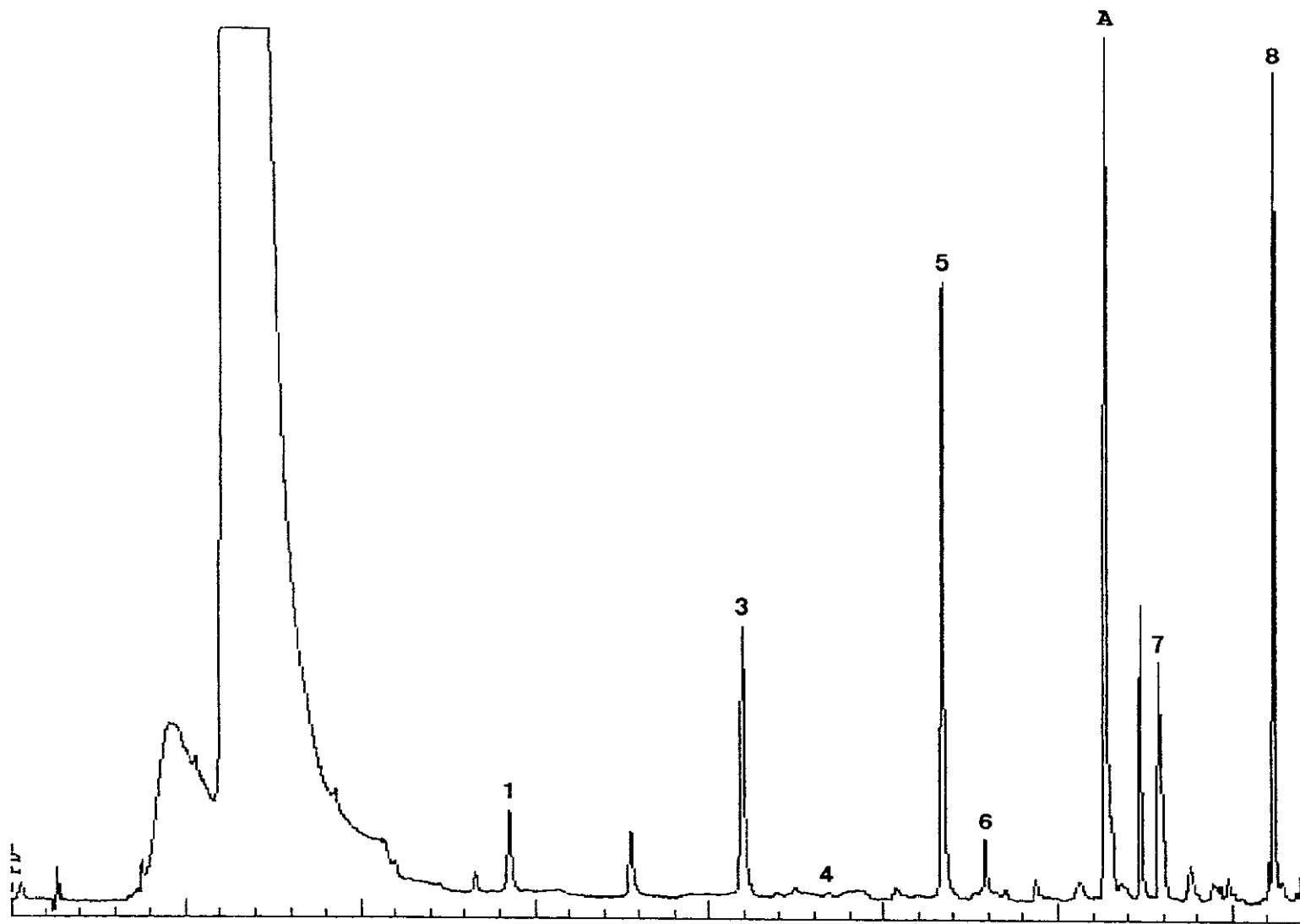


Figura 35. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 5 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

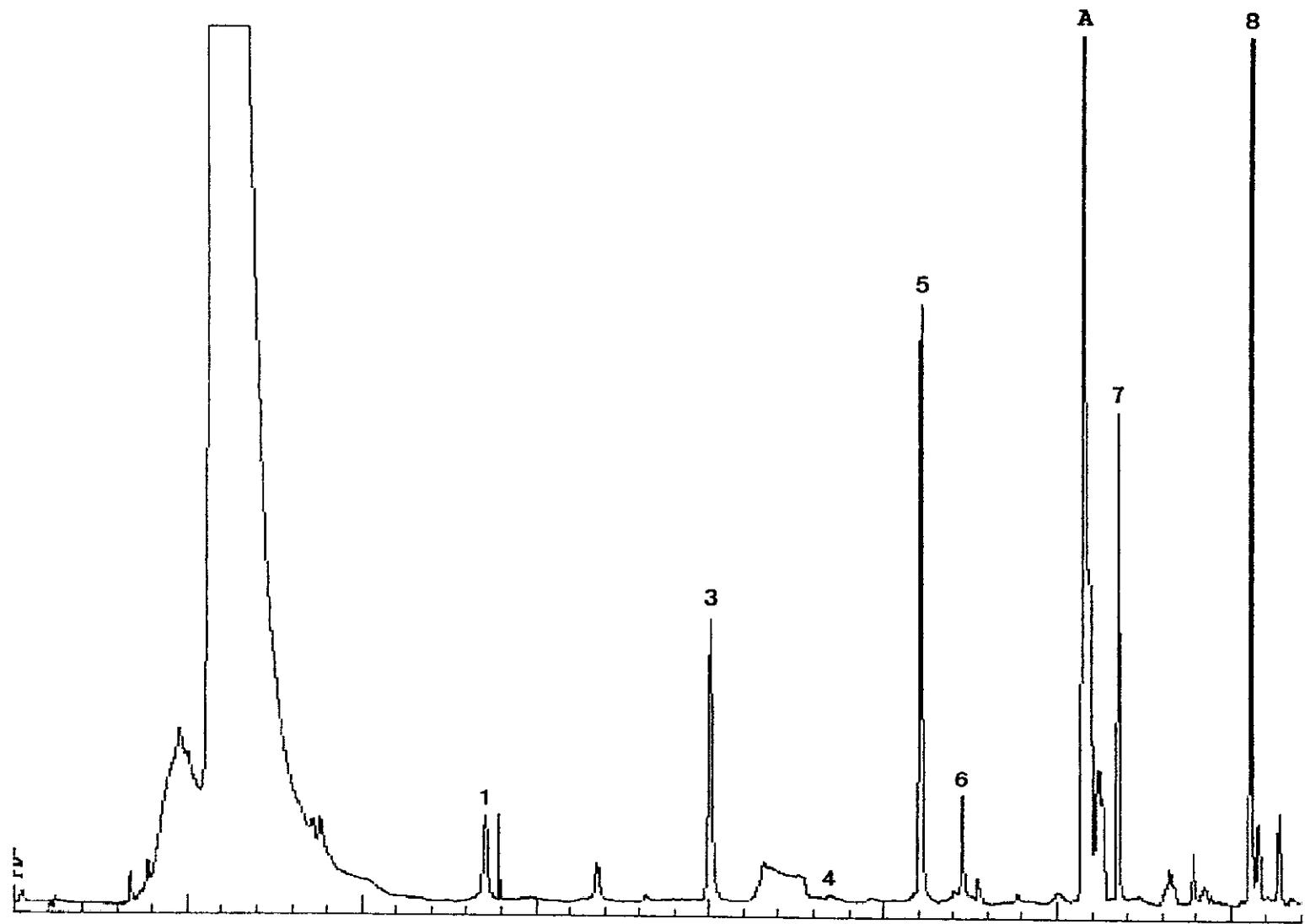


Figura 36. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 6 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

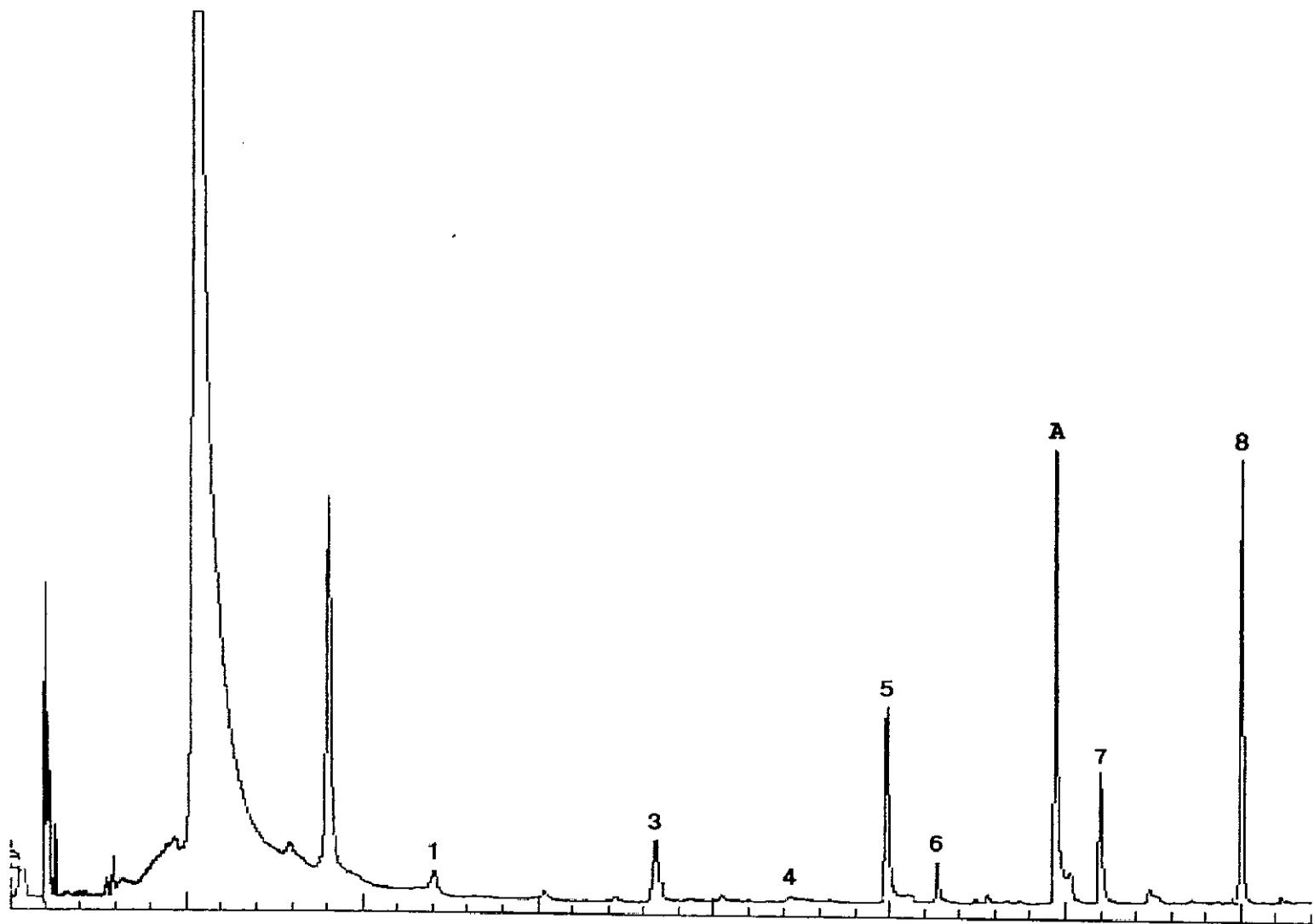


Figura 37. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 7 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

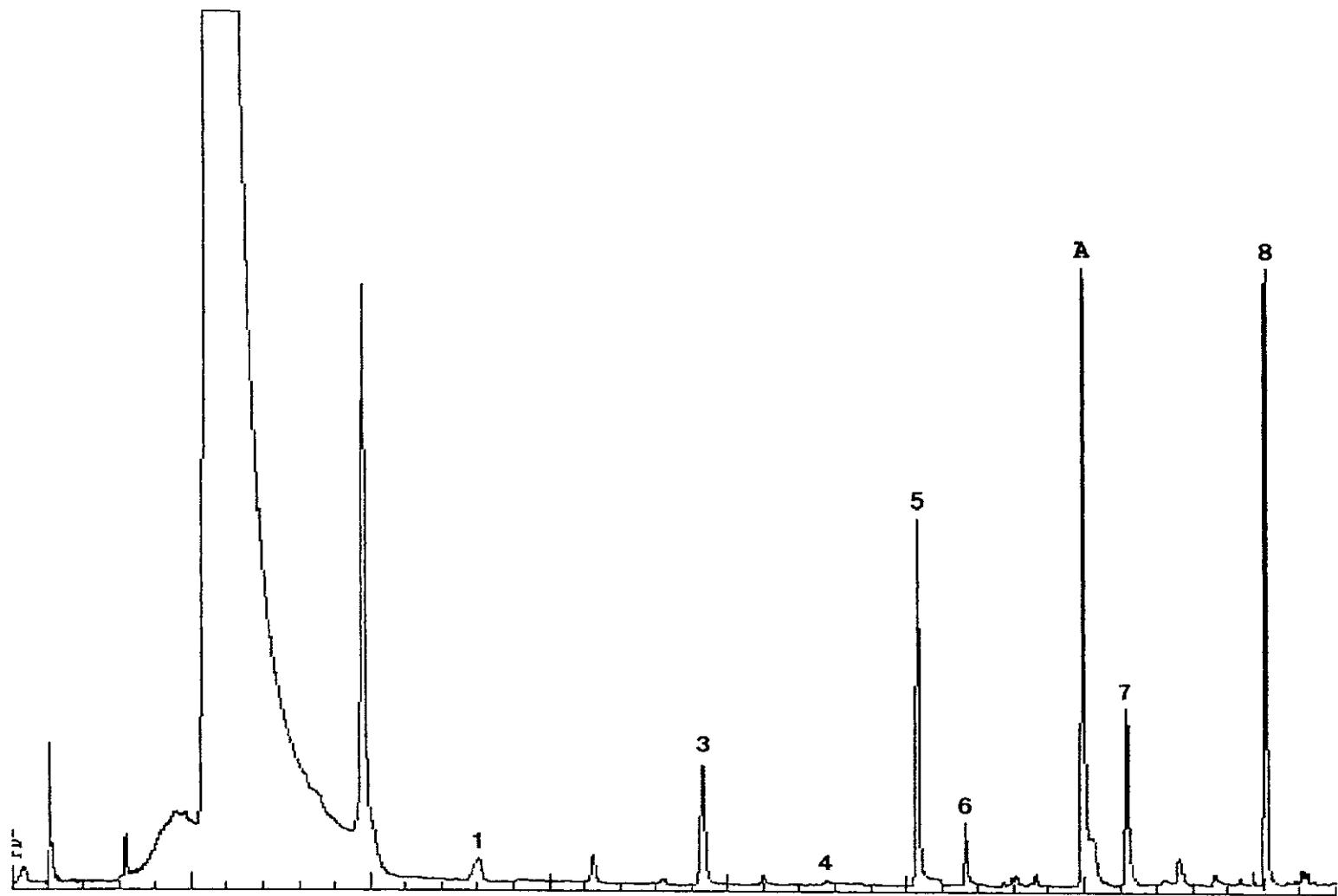


Figura 38. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 8 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

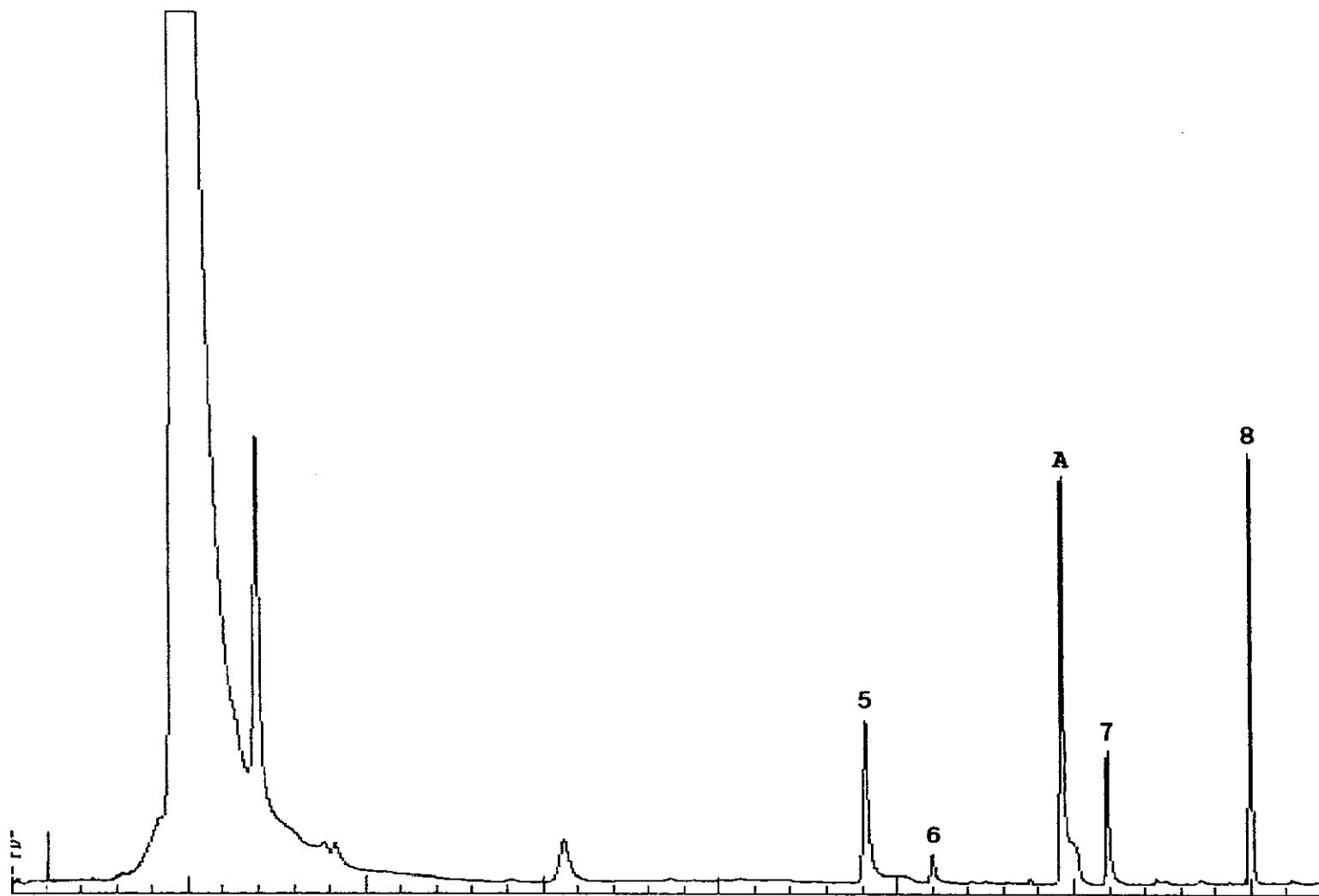


Figura 39. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 9 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

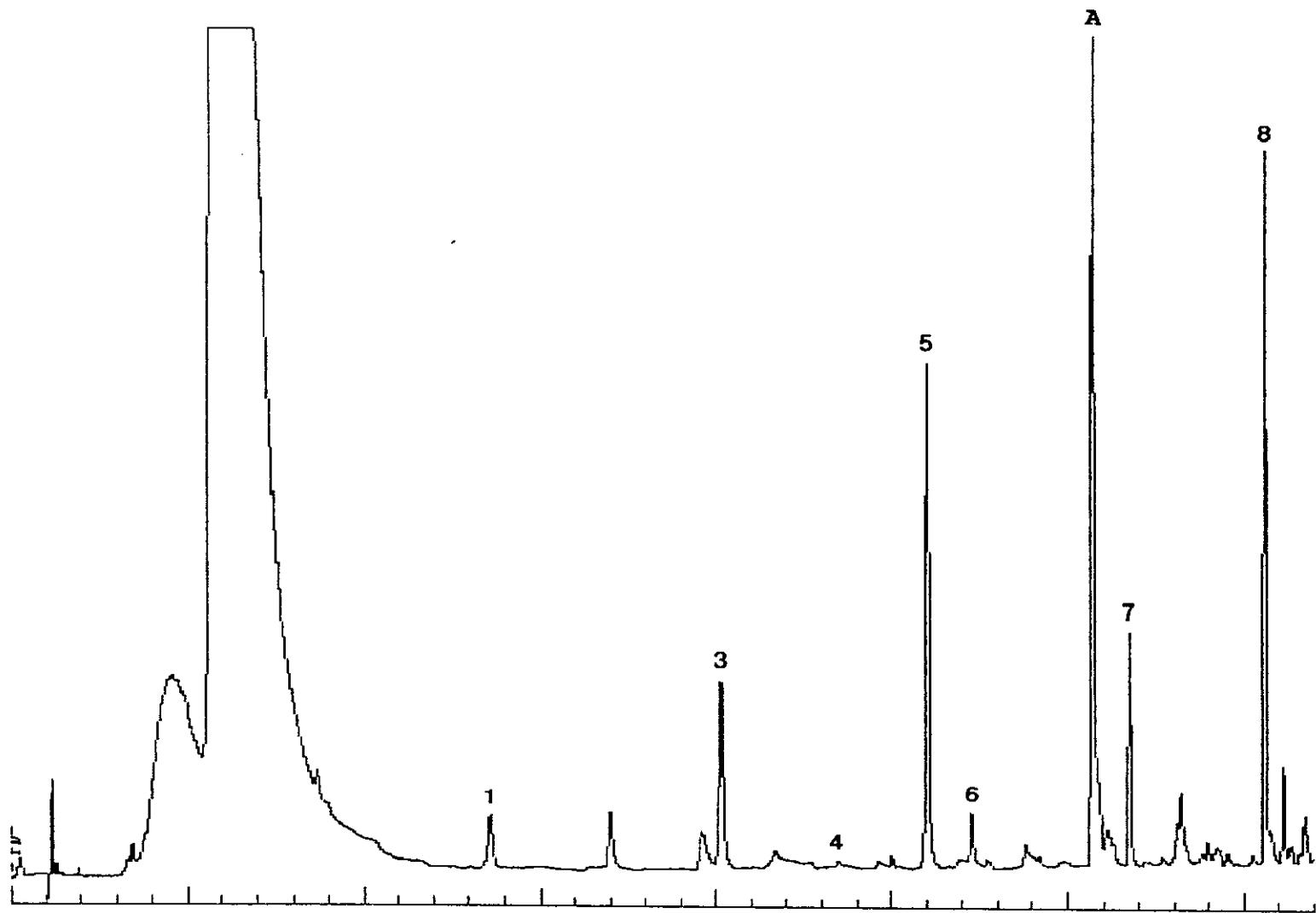


Figura 40. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 10 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

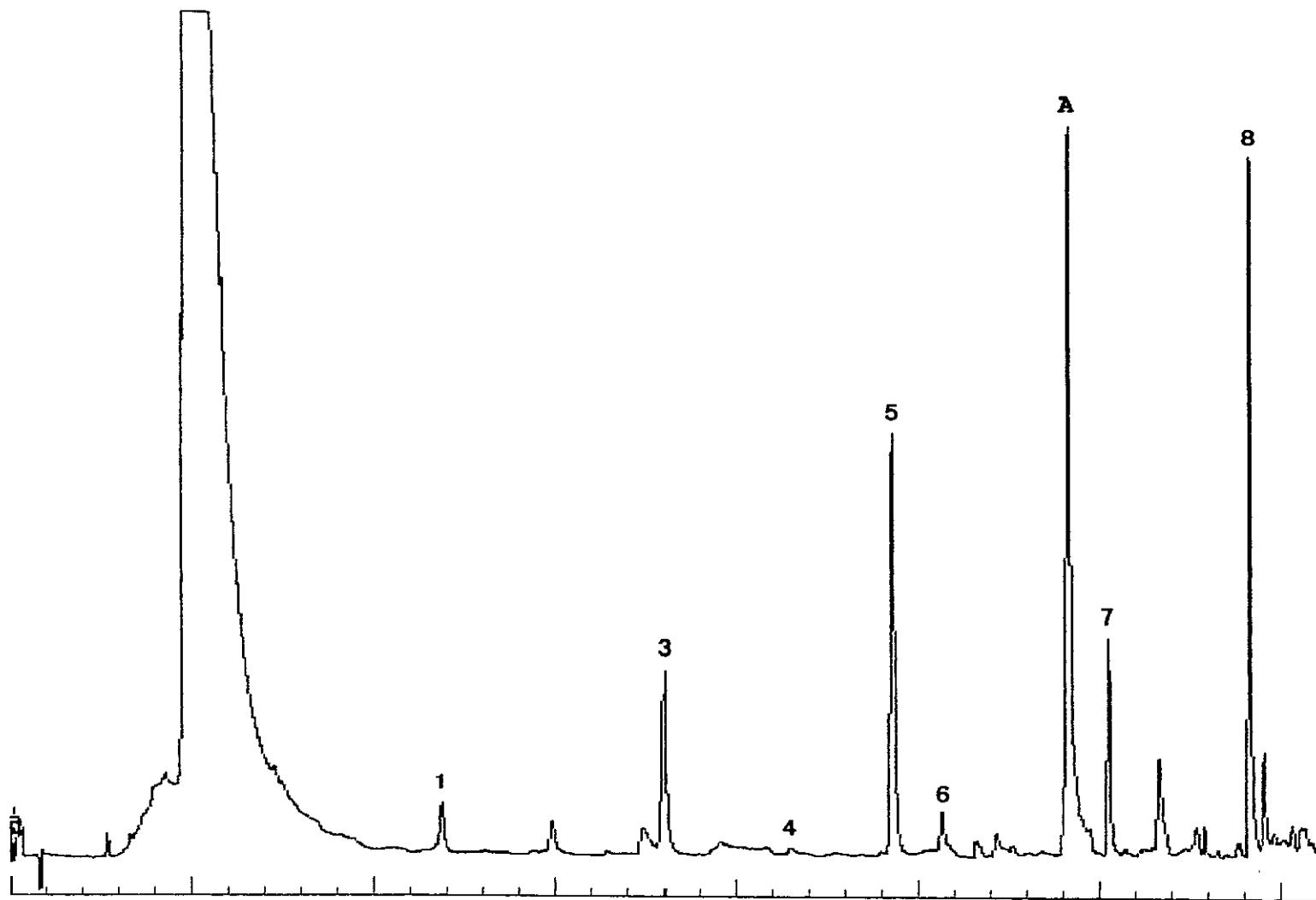


Figura 41. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 11 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

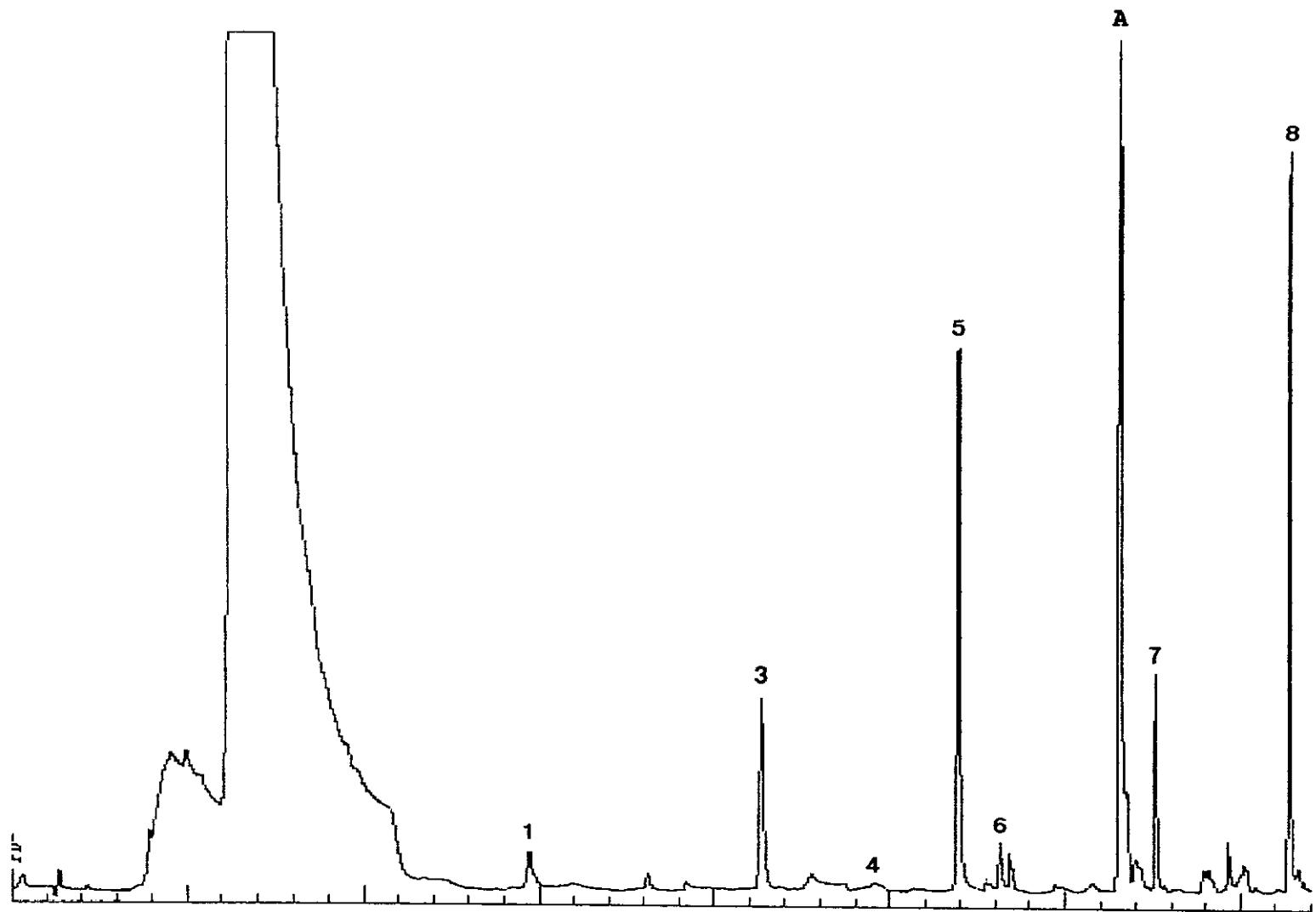


Figura 42. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 12 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

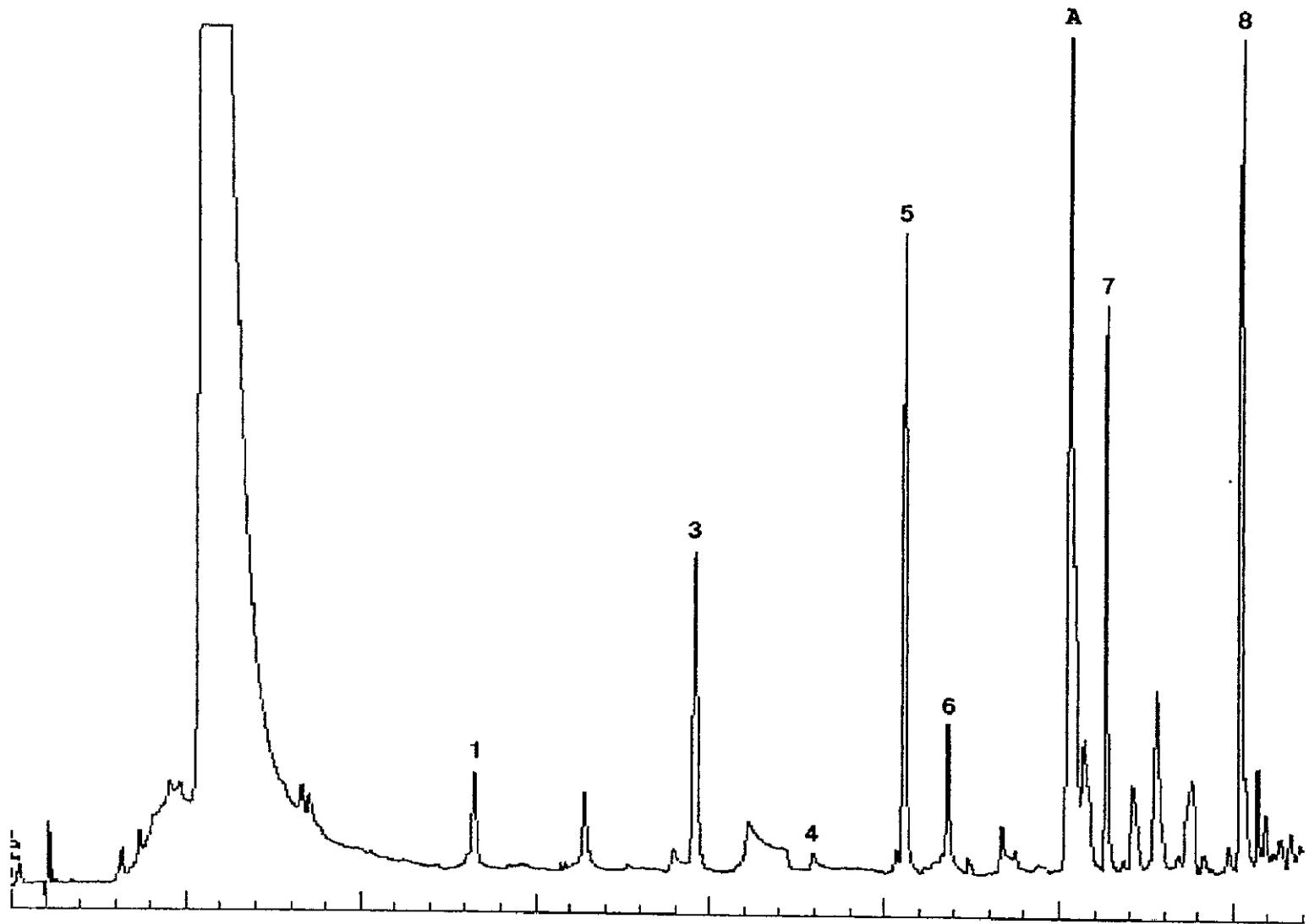


Figura 43. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 13 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

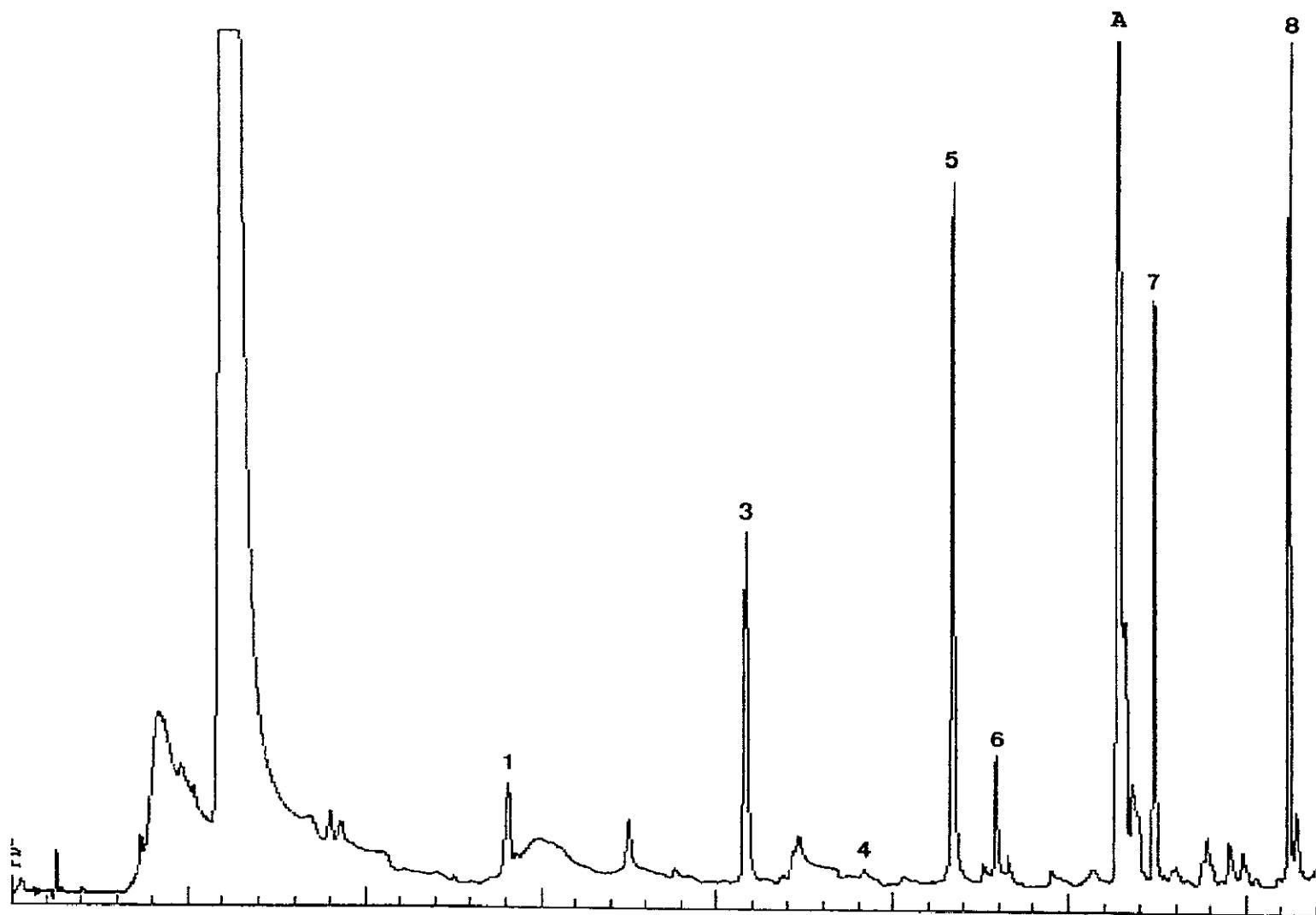


Figura 44. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 14 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

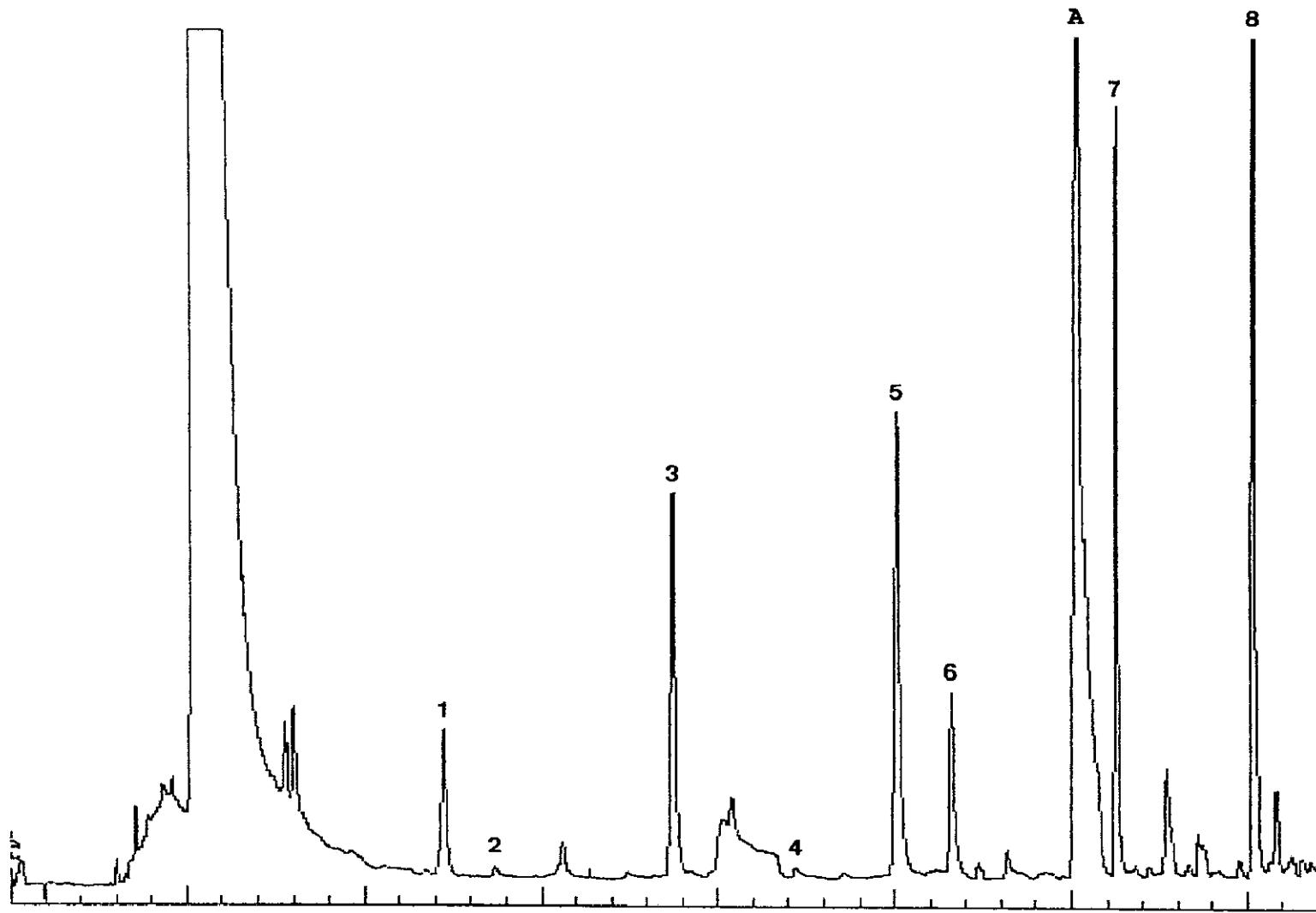


Figura 45. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 15 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

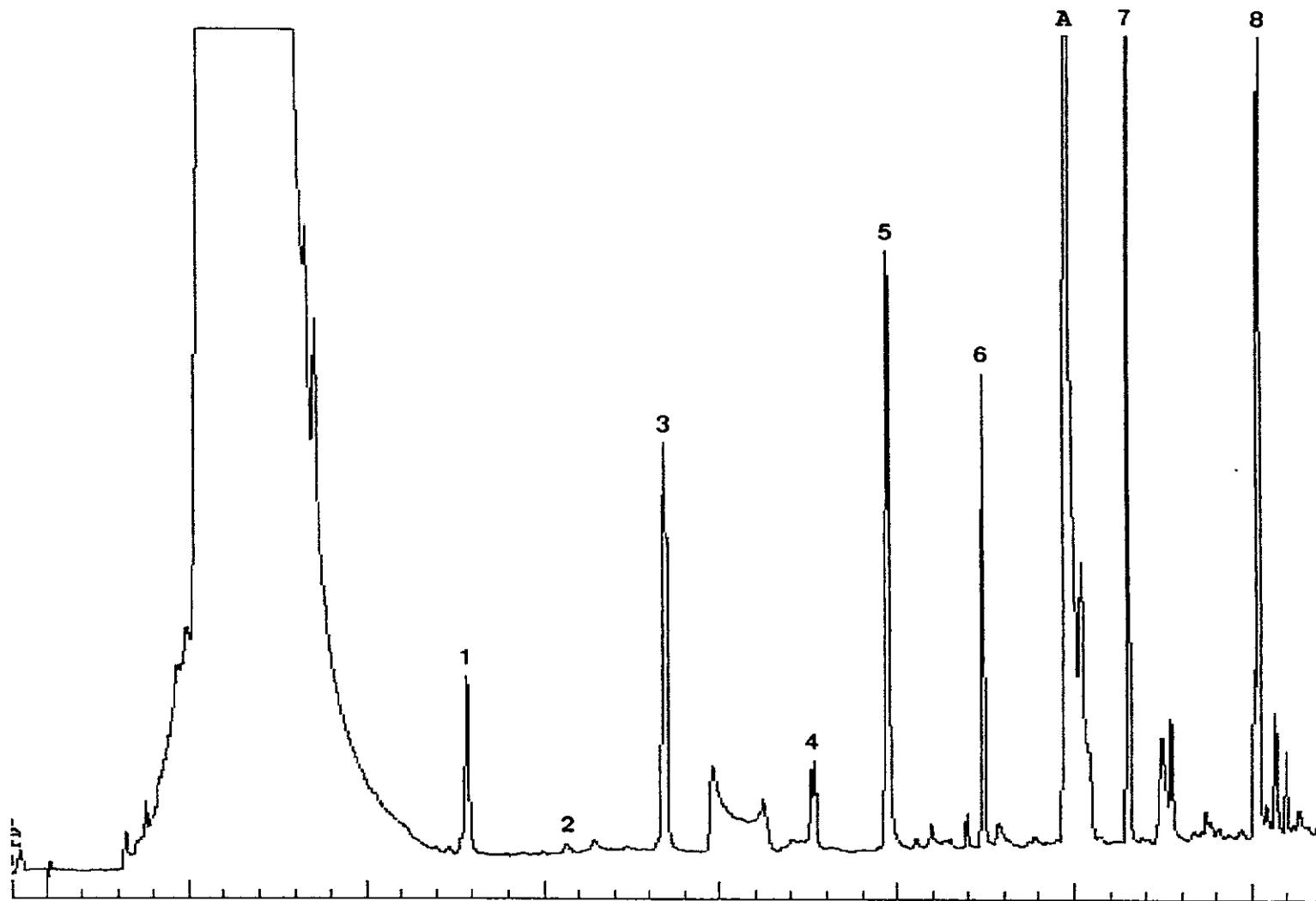


Figura 46. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 16 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

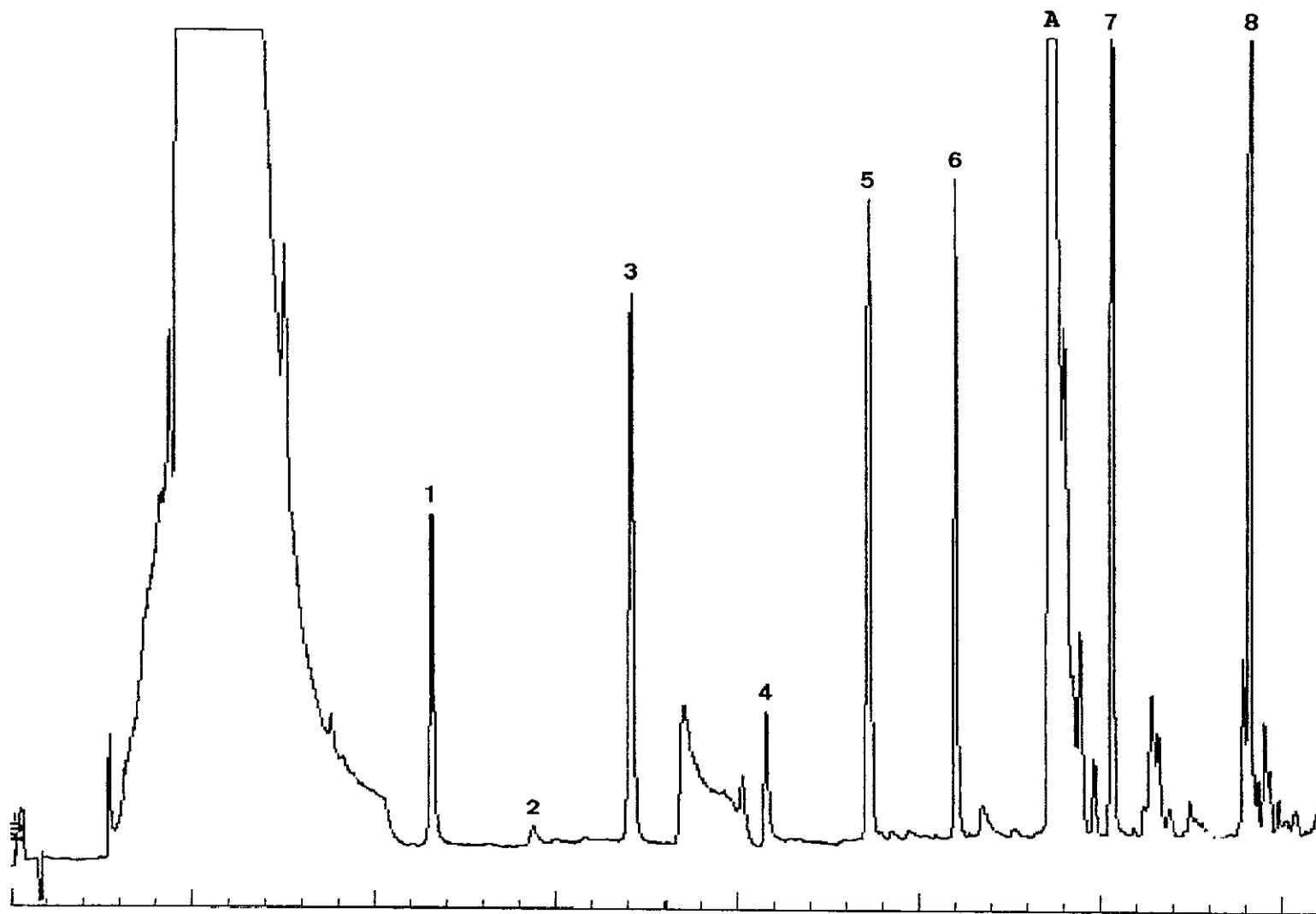


Figura 47. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 17 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

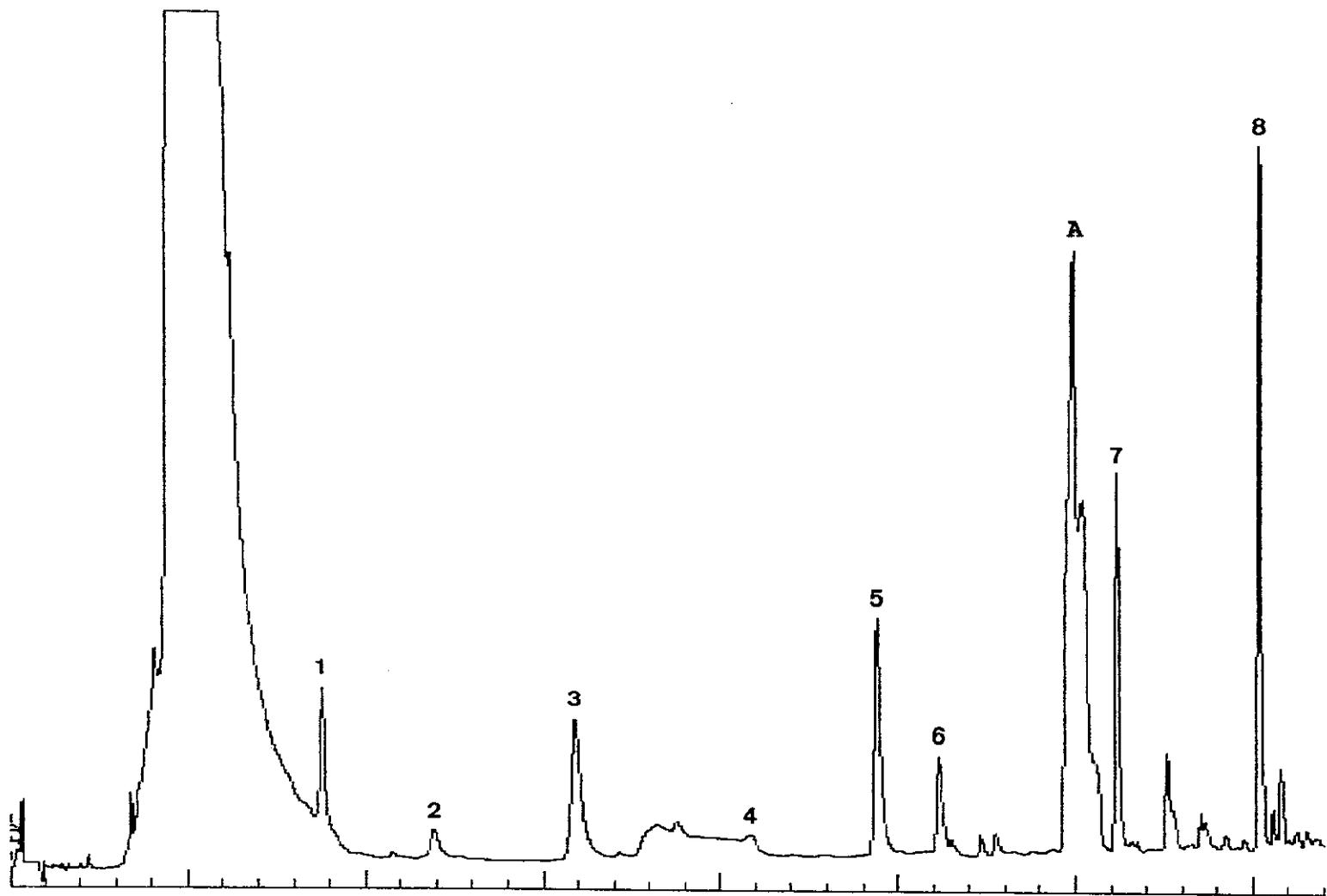


Figura 48. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 18 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

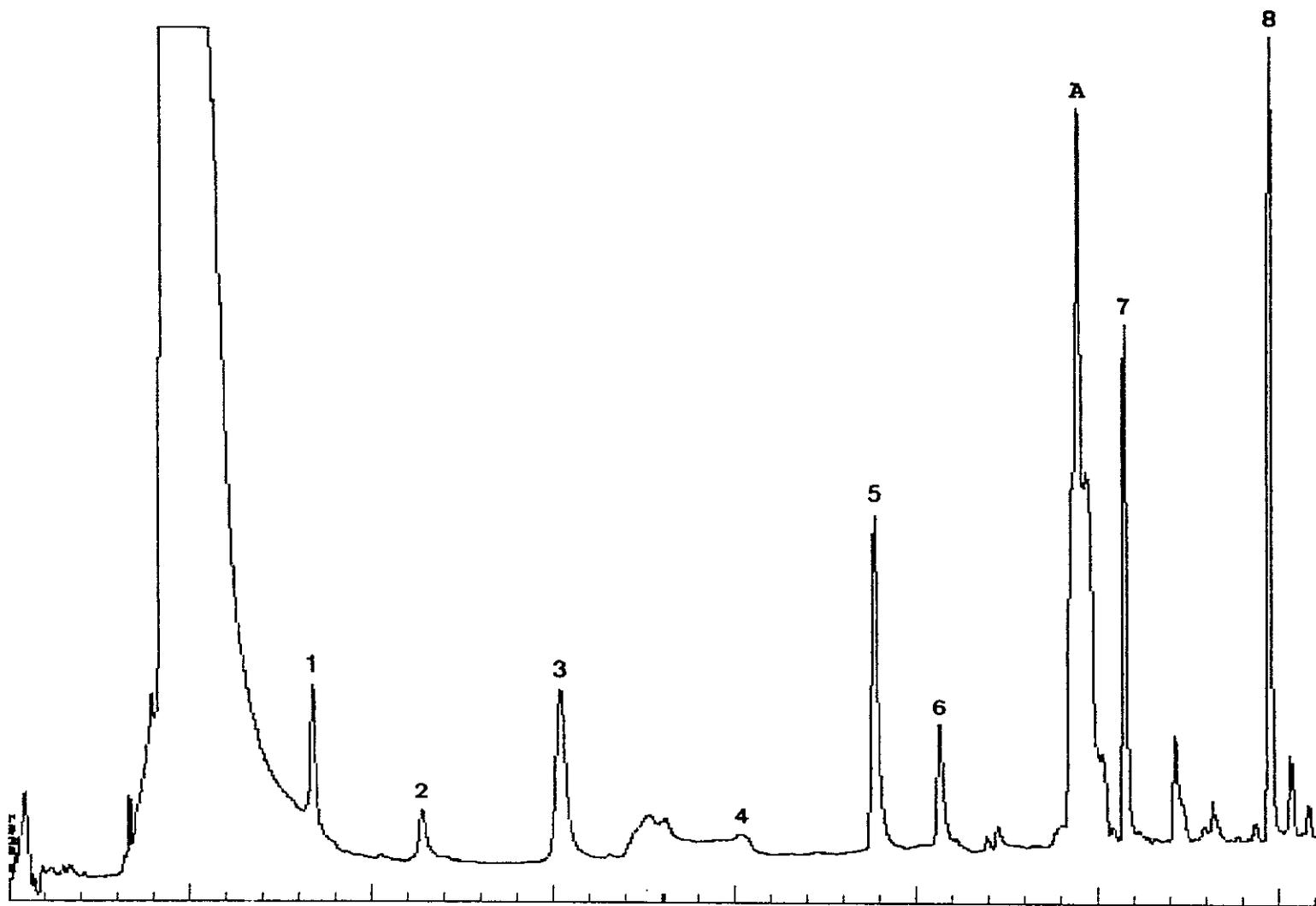


Figura 49. Cromatograma del análisis realizado en las condiciones del vértice 19 (Tabla 16) de la optimización mediante el Simplex Modificado. Identidad de los picos como en la Figura 31.

cuando se realiza la experimentación en la combinación óptima de variables se observa que el pico correspondiente al 1-butanol tiene un área tan pequeña que resulta difícilmente cuantificable.

Es interesante resaltar que, de acuerdo con las reglas del Simplex Modificado, los vértices 15, 16 y 17 fueron obtenidos mediante movimientos resultantes de aplicar coeficientes de expansión de 2, 3 y 4 respectivamente. Después de haber realizado 19 experiencias, se estimó que era aceptable considerar finalizado el diseño aplicado, ya que además de haber conseguido una mejora satisfactoria, las respuestas obtenidas a partir del vértice 17 evidencian la tendencia del proceso a evolucionar hacia condiciones poco adecuadas para aumentar la sensibilidad del método.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos, para tratar de estimar la influencia individual de cada factor en la respuesta evaluada. Las variables con valores del coeficiente de regresión ( $r$ ) más elevado, y por tanto más influyentes, son el porcentaje de GasChrom 220 ( $r = 0.93$ ), la longitud del adsorbente ( $r = 0.88$ ), y la temperatura del PTV durante la inyección ( $r = -0.84$ ). De hecho, se puede expresar la

respuesta en función de estas tres variables, lo que constituye la ecuación [15]:

$$\text{Respuesta} = 115.49 \% \text{ GasChrom} + 2100.25 L - 49.68 T_i \quad [15]$$

que tiene un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9872$ , lo que indica que esta expresión explica en gran medida la variación de la respuesta obtenida, y por consiguiente, que estos tres factores son la principal causa de dicha variación.

Por otra parte, los coeficientes de regresión así como la ecuación, expresan también que existe una correlación positiva entre el valor de la respuesta y las dos primeras variables, mientras que la temperatura inicial del PTV presenta una correlación negativa. Es evidente que cuando aumenta el porcentaje de GasChrom 220 en el adsorbente, se obtiene una mayor respuesta puesto que este material tiene un mayor poder de retención para los compuestos más volátiles. El aumento de la longitud del adsorbente incrementa la capacidad de carga de muestra líquida en el "glass liner", impidiendo el escape del disolvente en fase líquida y disminuyendo, por tanto, el arrastre de solutos hacia el exterior por coelución. Además, se provoca un incremento generalizado de los volúmenes de ruptura de los compuestos, con la consiguiente disminución de pérdidas de los más volátiles. En relación a la influencia de la temperatura

inicial del PTV, también es evidente su correlación negativa con los valores de respuesta obtenidos puesto que los compuestos volátiles serán más fácilmente retenidos si se mantiene el adsorbente a baja temperatura.

Una vez conocidas las condiciones óptimas para lograr la extracción y concentración internas en el PTV, se llevó a cabo el estudio de la precisión, recuperación y límite de detección del método. Se tuvo en cuenta que cuando se analizan muestras reales puede ocurrir, según el caso, que un mismo "glass liner" (incluyendo el adsorbente adecuado) sea utilizado para varias inyecciones, o bien que sea necesario su cambio después de cada inyección debido a la adsorción irreversible de sustancias no volátiles presentes en la muestra. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en el estudio relativo a la precisión del método. Según se puede observar, los coeficientes de variación oscilan entre el 2.0% para el hexanoato de etilo y el 11.6% para el 1-butanol, siendo la media un 5.8% cuando el proceso se lleva a cabo con un mismo "glass liner"; en el caso de que sea preciso proceder a su cambio antes de cada inyección, la precisión del método es menor, ya que el coeficiente de variación oscila entre el 3.4% para el pentanoato de etilo y el 25.6% para el 1-butanol, siendo la media del 10.9%. Es interesante destacar el hecho de que los alcoholes presentan mayor variabilidad que los ésteres.

**Tabla 17.** Precisión del método de extracción y concentración internas en el PTV en las condiciones óptimas.

Compuesto	C.V. (a)	C.V. (b)
Pentanoato de etilo	3.5	3.4
1-Butanol	11.6	25.6
Hexanoato de etilo	2.0	6.1
1-Pentanol	9.9	13.1
Heptanoato de etilo	3.2	8.3
1-Hexanol	5.5	12.0
1-Heptanol	7.6	10.8
1-Octanol	3.3	8.1

(a) Coeficiente de variación de las áreas absolutas obtenidas a partir de cinco replicados realizados con el mismo adsorbente y un único "glass liner".

(b) Coeficiente de variación de las áreas absolutas obtenidas a partir de cinco replicados realizados cambiando el adsorbente y el "glass-liner" para cada análisis.

La Tabla 18 incluye los factores de recuperación obtenidos para los compuestos estudiados. Estos valores fueron calculados a partir de las medias de las áreas normalizadas (n=3) utilizando como referencia los valores medios de las áreas normalizadas (n=6) resultantes de la inyección en frío, sin división de flujo, de una disolución de concentración tal que, mediante la inyección de 2  $\mu$ L de la misma, la cantidad absoluta de cada compuesto introducida en la columna fuese la que correspondería a la inyección de la disolución modelo en etanol/agua, suponiendo un 100% de recuperación. Como era de esperar, las recuperaciones mas altas corresponden a los solutos menos volátiles, aunque la recuperación de uno de los de mayor volatilidad de los presentes en la muestra, el pentanoato de etilo, es superior al 45%. Sin embargo, las pérdidas de los alcoholes de cadena corta son muy apreciables. Ello se debe probablemente a que las condiciones fueron optimizadas específicamente para la eliminación de etanol y son, por tanto, favorables para la coelución de los alcoholes próximos.

La Tabla 19 muestra la concentración más pequeña que se puede detectar cuando se realiza, en las condiciones correspondientes al óptimo, la extracción y concentración internas en el PTV. Los límites de detección contenidos en la referida Tabla representan la concentración de soluto cuya altura de pico es dos veces la del ruido del detector

**Tabla 18.** Recuperación del método de extracción y concentración internas en el PTV en las condiciones óptimas.

Compuesto	Recuperación (%)
Pentanoato de etilo	45.3
1-Butanol	2.6
Hexanoato de etilo	77.6
1-Pentanol	15.8
Heptanoato de etilo	87.4
1-Hexanol	56.5
1-Heptanol	95.2
1-Octanol	95.1

**Tabla 19.** Límite de detección del método de extracción y concentración internas en el PTV en las condiciones óptimas.

Compuesto	Límite de detección (ng/L)
Pentanoato de etilo	378
1-Butanol	6557
Hexanoato de etilo	232
1-Pentanol	1227
Heptanoato de etilo	197
1-Hexanol	181
1-Heptanol	111
1-Octanol	99

(definido como el "ancho" de la línea de base observada en el cromatograma y resultante de las fluctuaciones producidas en la señal del sistema de detección). Es evidente que el límite de detección varía marcadamente de unos compuestos a otros. Sin embargo, la sensibilidad obtenida en nuestro caso es, en general, satisfactoria ya que el método es apto para determinar directamente, sin extracción ni concentración externas previas, solutos en concentraciones de hasta 100 ng/L.

### 3.4. ANALISIS DE COMPONENTES MINORITARIOS DEL AROMA DE BEBIDAS ALCOHOLICAS DE DISTINTA GRADUACION POR INYECCION DIRECTA.

Con objeto de evaluar la aplicabilidad del método de introducción directa de elevados volúmenes de muestra a través del PTV, optimizado en los apartados anteriores, se llevó a cabo un estudio comparativo de dicho método, así como del que permite la concentración interna de un extracto en el inyector, con los utilizados tradicionalmente para el análisis de los componentes del aroma de bebidas alcohólicas de diferente graduación: la Extracción Líquido-Líquido utilizando Freon 11, con concentración externa, y la Destilación y Extracción Simultáneas con y sin concentración posterior. La comparación entre las técnicas mencionadas se basó en el análisis de compuestos volátiles en vino y pisco. También se abordó la identificación por Espectrometría de Masas de los picos de los cromatogramas obtenidos a partir de cada uno de los métodos de extracción y concentración considerados, a fin de estudiar la posible aparición de artefactos.

### 3.4.1. Recuperación.

Con el objetivo de extraer la máxima información posible de los cromatogramas y ante la imposibilidad de identificar todos los solutos eluidos, se tomó como índice de recuperación la relación entre el área de cada pico y la del octanoato de metilo, introducido como patrón interno tanto en la extracción líquido-líquido como en la destilación y extracción simultáneas, después de realizar la extracción, y como patrón externo (mediante una inyección realizada en frío y sin división de flujo) en el análisis por inyección directa de la muestra. El mencionado índice tiene validez a efectos de comparación entre las distintas técnicas estudiadas. Las Tablas 20 y 21 contienen los resultados correspondientes a las muestras de pisco y de vino respectivamente, y también el porcentaje del valor de dicho índice obtenido en cada método de análisis en relación con el resultante aplicando el método objeto de esta Memoria (introducción directa de la muestra con extracción y concentración en el PTV).

El método que proporciona un cromatograma con mayor número de compuestos en el análisis del pisco es la extracción líquido-líquido con concentración interna en el PTV. En el caso de que se emplee la introducción directa o la extracción líquido-líquido con concentración por evaporación, la información obtenida es muy similar. Sin embargo, en la

Tabla 20. Índices de recuperación (Area del pico/Area del patrón) medios (n = 6) obtenidos en el análisis de pisco mediante técnicas de extracción y concentración.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa de la muestra. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
		INDICE RECUP. MEDIO	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.
-	0.67	0	0.51	-	0.32	-	0	-	0	-
-	0.68	0	0.17	-	0	-	0	-	0	-
-	0.71	0	0.53	-	0.60	-	0.78	-	0.91	-
-	0.76	0	0.12	-	0	-	0	-	0	-
1-Hexanol	0.78	2.40	0.33	13.75	0.51	21.45	0	0	0	0
-	0.83	0	0.21	-	0.50	-	0	-	0	-
-	0.87	0	0.33	-	0.53	-	0.17	-	0	-
-	0.89	0	0.12	-	0.16	-	0.31	-	0	-
Lactato de etilo + cis-3-Hexen-1-ol	0.94	95.10	49.96	52.53	55.23	58.07	13.86	14.57	14.03	14.76
-	0.96	0	0.12	-	0.25	-	0	-	0	-
-	0.98	0	0.29	-	0.33	-	0	-	0	-
-	1.04	0	0.06	-	0	-	0	-	0	-
-	1.08	0	0.09	-	0	-	0	-	0	-

Continúa

Tabla 20. Continuación.

		ID	LLCI			LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIO	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.							
-	1.09	0	0.09	-	0	-	0	-	0	-	
-	1.11	10.91	1.37	12.53	1.42	13.00	1.44	13.20	1.24	11.34	
Acido acético + benzaldehído	1.15	148.61	30.11	20.26	41.88	28.18	3.45	2.32	2.00	1.35	
-	1.19	2.16	0	0	0	0	0.76	35.25	0	0	
-	1.31	0	0.10	-	0.06	-	0	-	0	-	
Acido propanoico	1.33	25.58	7.30	28.52	7.06	27.58	4.37	17.06	3.84	14.99	
-	1.36	0	0.35	-	0.23	-	0	-	0	-	
-	1.38	0	1.16	-	2.74	-	0	-	0	-	
-	1.40	6.04	0.60	9.95	0.67	11.11	0	0	0	0	
Linalol	1.44	14.65	6.66	45.45	6.70	45.74	7.74	52.86	6.98	47.63	
-	1.47	0	0.48	-	0.49	-	0	-	0	-	
-	1.48	0	0.68	-	0.55	-	0	-	0	-	
Decanoato de etilo	1.50	3.27	0.70	21.41	0.80	24.59	0.63	19.12	0	0	
γ-butirolactona	1.52	1.78	0.17	9.35	0.14	7.98	0	0	0	0	
Acido butanoico	1.55	1.40	0.08	5.42	0	0	0	0	0	0	
Succinato de diet.	1.57	39.71	9.92	24.99	9.66	24.32	1.49	3.74	0.79	1.98	
α-Terpineol	1.59	3.16	1.52	48.06	1.42	44.91	1.32	41.77	1.42	44.91	

Continúa

Tabla 20. Continuación.

		ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIO	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.						
-	1.61	0	0.16	-	0.16	-	0	-	0	-
-	1.65	0.43	0.22	51.14	0	0	0	0	0	0
-	1.66	0.69	0.33	48.19	0.33	47.36	0	0	0	0
-	1.71	0	0.12	-	0.14	-	0	-	0	-
-	1.72	2.12	0.23	11.08	0.22	10.45	0.18	8.37	0	0
-	1.74	0.33	0.25	75.15	0	0	0	0	0	0
-	1.76	6.20	0.06	0.97	0	0	0	0	0	0
-	1.77	0	0.16	-	0.17	-	0	-	0	-
-	1.79	0.70	0.80	113.76	0.92	130.90	0.24	33.94	0	0
-	1.81	0	0	-	0.50	-	0	-	0	-
-	1.84	3.24	0.66	20.48	2.47	76.14	0.68	21.11	0	0
-	1.86	0	0.44	-	0	-	0.50	-	0	-
Acido hexanoico	1.87	9.54	2.33	24.43	6.28	65.78	0.48	4.99	0	0
Bencilalcohol	1.91	2.36	0.51	21.78	0.46	19.35	0	0	0	0
-	1.94	0	0.14	-	0.12	-	0	-	0	-
2-Feniletanol	1.97	53.00	22.34	42.15	23.73	44.78	0.35	0.65	1.37	2.59
-	1.99	0.17	0.05	28.63	0	0	0	0	0	0

Continúa

Tabla 20. Continuación.

		ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIO	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.						
-	2.01	0.55	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.03	0.61	0.36	59.3	0.52	85.07	0	0	0	0
-	2.05	0	0	-	0.07	-	0	-	0	-
-	2.07	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.09	3.91	0.11	2.77	0.14	3.51	0	0	0	0
-	2.13	0	0.11	-	0.51	-	0	-	0	-
-	2.14	0	0.03	-	0	-	0	-	0	-
-	2.16	1.43	0.05	3.64	0	0	0	0	0	0
-	2.17	3.17	0.53	16.59	0.43	13.72	0.76	24.07	1.94	61.12
-	2.19	0	0.03	-	0	-	0	-	0	-
Acido octanoico	2.24	13.74	5.95	43.33	6.12	44.56	1.32	9.59	0	0
-	2.25	0	0	-	0	-	0.73	-	0	-
-	2.26	46.46	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.28	0.59	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.30	0.99	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.35	0.19	0	0	0	0	0	0	0	0

Continúa

Tabla 20. Continuación

		ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIO	INDICE RECUP. MEDIO	% DEL INDICE RECUP.						
Hexadecanoato de etilo	2.40	6.09	0.07	1.10	0	0	0	0	0	0
Acido decanoico	2.50	32.86	6.39	19.44	6.62	20.15	6.56	19.97	7.70	23.43
-	2.53	1.68	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.63	35.30	0.62	1.75	0	0	0	0	0	0
-	2.68	3.50	0	0	1.97	56.35	0	0	1.93	55.19
-	2.74	1.81	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.84	0	0.18	-	0	-	0	-	0	-
-	2.86	0	0.26	-	0	-	0	-	0	-
-	2.90	0	0.27	-	0	-	0	-	0	-
-	2.93	0	0.12	-	0	-	0	-	0	-
-	2.95	0	0.32	-	0	-	0	-	0	-
-	3.03	70.87	2.20	3.10	2.31	3.25	3.47	4.89	0	0
-	3.07	0	3.81	-	0	-	2.56	-	0	-
-	3.24	0	0.67	-	0.78	-	0	-	5.85	-

**Tabla 21.** Índices de recuperación (Área del pico/Área del patrón) medios (n = 6) obtenidos en el análisis de vino mediante técnicas de extracción y concentración.  
 (TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa de la muestra. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
		INDICE RECUP. MEDIA	INDICE RECUP. MEDIA	% DEL INDICE RECUP.						
-	0.65	0	0	-	0.34	-	0	-	0	-
-	0.66	0.55	0.37	67.27	0.06	10.68	0.12	21.85	0.16	28.56
-	0.78	0	0.07	-	0	-	0	-	0	-
-	0.84	0	0.03	-	0	-	0.04	-	0.06	-
-	0.87	0	0.10	-	0	-	0.14	-	0.16	-
-	0.89	0	0	-	0.11	-	0	-	0	-
Lactato de etilo + cis-3-Hexen-1-ol	0.93	29.21	21.07	72.14	24.16	82.70	8.04	27.54	7.12	24.38
-	0.96	0	0	-	0.06	-	0	-	0	-
-	0.98	0	0.04	-	0.03	-	0	-	0.06	-
-	1.09	2.44	0.44	17.85	0.58	23.83	0.43	17.66	0.33	13.56
Acido acético	1.17	19.60	0.39	1.98	0.92	4.68	0	0	0	0
-	1.24	0	0.08	-	0.10	-	0	-	0	-
Acido propanoico	1.27	1.64	0.75	45.89	0.62	37.50	0.33	20.36	0.23	13.90

Continúa

Tabla 21. Continuación

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
		INDICE RECUP. MEDIA	INDICE RECUP. MEDIA	% DEL INDICE RECUP.						
-	1.29	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0
-	1.32	0.40	0.10	24.91	0.07	17.80	0.06	15.48	0.08	20.35
Linalol	1.34	64.50	1.07	1.67	1.34	2.08	0	0	0	0
-	1.38	0	0.31	-	0.38	-	0	-	0	-
-	1.40	1.07	0.18	16.72	0.43	39.96	0	0	0	0
-	1.43	24.56	0.30	1.24	0.29	1.17	0	0	0	0
-	1.46	0.31	0.05	16.97	0.09	28.55	0	0	0	0
-	1.48	0	0.02	-	0	-	0	-	0	-
$\gamma$ -butirolactona	1.49	2.91	1.07	36.75	1.18	40.56	0	0	0	0
-	1.51	0	0.05	-	0	-	0	-	0	-
Acido butanoico	1.52	0.24	0.23	93.17	0.29	118.01	0	0	0	0
-	1.55	0	0.07	-	0	-	0	-	0	-
$\alpha$ -Terpineol	1.59	13.54	14.27	105.42	14.65	108.24	1.53	11.32	1.32	9.78
-	1.61	0.23	0.03	12.86	0.02	7.76	0	0	0	0
-	1.66	0.63	0.85	135.08	0.86	135.56	0	0	0	0
-	1.71	0	0.88	-	0	-	0	-	0	-

Continúa

Tabla 21. Continuación.

		ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIA	INDICE RECUP. MEDIA	% DEL INDICE RECUP.						
-	1.72	0	0.04	-	0	-	0	-	0	-
-	1.73	0.14	0	0	0	0	0	0	0	0
-	1.76	0.38	0	0	0.10	25.54	0	0	0	0
-	1.77	1.52	0.22	14.39	0.18	12.04	0	0	0	0
-	1.79	0.08	0.06	67.41	0.05	59.42	0	0	0	0
-	1.83	0	0.67	-	0.80	-	0	-	0	-
-	1.86	0.55	0.06	10.67	0	0	0	0	0	0
Acido hexanoico	1.90	1.80	2.19	121.72	2.66	147.88	0.08	4.26	0	0
-	1.92	5.02	0	0	0	0	0	0	0	0
Bencilalcohol	1.94	1.04	1.61	154.33	1.77	170.03	0	0	0	0
-	1.96	0	0.22	-	0	-	0	-	0	-
-	1.99	0	0.15	-	0	-	0	-	0	-
2-Feniletanol	2.01	27.91	66.23	237.33	69.93	250.57	0.87	3.12	1.01	3.62
-	2.03	0.28	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.05	0.21	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.11	0.12	0.05	40.88	0.08	65.26	0	0	0	0
-	2.13	0.21	0	0	0	0	0	0	0	0

Continúa

Tabla 21. Continuación.

		ID	LLCI		LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIA	INDICE RECUP. MEDIA	% DEL INDICE RECUP.						
-	2.14	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.16	0.90	0.15	17.08	0.27	29.96	0	0	0	0
-	2.17	0.63	0.23	36.15	0.04	6.74	0	0	0	0
-	2.19	0.46	0.39	85.35	0.44	95.7	0.05	10.91	0	0
Acido octanoico	2.22	0.55	0.25	45.75	0.29	53.05	0	0	0	0
-	2.25	4.51	2.68	59.51	2.98	66.13	0.42	9.31	0.62	13.78
-	2.27	0	0.04	-	0.11	-	0	-	0	-
-	2.31	0.12	0	0	0.08	60.99	0	0	0	0
-	2.35	0.18	0.06	34.10	0.13	74.96	0	0	0	0
-	2.37	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.39	0	0	-	0.06	-	0	-	0	-
Hexadecanoato de etilo	2.40	0.28	0.75	270.48	0.61	220.83	0	0	0	0
-	2.41	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.42	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0
-	2.43	0	0	-	0.35	-	0	-	0	-
-	2.44	0.39	0.22	55.03	0.13	33.88	0	0	0	0

Continúa

Tabla 21. Continuación.

		ID	LLCI			LLCE		SDEC		SDESC	
IDENTIFICACION	TRR	INDICE RECUP. MEDIA	INDICE RECUP. MEDIA	% DEL INDICE RECUP.							
Acido decanoico	2.46	43.24	0.13	0.30	0.55	1.27	0	0	0	0	
-	2.52	1.08	1.40	130.28	1.57	146.27	0	0	0	0	
-	2.57	0.62	0.51	82.52	0.65	105.76	0	0	0	0	
-	2.59	0	0	-	0.01	-	0	-	0	-	
-	2.63	0.97	0.04	4.40	0.09	9.81	0	0	0	0	
-	2.68	0	0.09	-	0	-	0	-	0	-	
-	2.79	531.10	52.35	9.86	65.32	12.30	0	0	0	0	
-	2.87	0	0.42	-	0.42	-	0	-	0	-	
-	2.92	0	0	-	0.09	-	0	-	0	-	
-	3.11	0	2.14	-	0.07	-	0.40	-	1.19	-	
-	3.20	0	0	-	0.08	-	0	-	0	-	
-	3.40	0	0	-	0.56	-	0	-	0	-	
-	3.45	0	0	-	0.40	-	0	-	0	-	
-	3.65	0	0	-	0.11	-	0	-	0	-	

destilación y extracción simultáneas se recupera un número de volátiles sensiblemente inferior.

En lo que se refiere al aroma del vino, el número de solutos cuantificables (Tabla 21) es similar en la inyección directa, en la extracción líquido-líquido con concentración interna en el PTV, y en la extracción líquido-líquido con concentración externa. Como en el pisco, la extracción y destilación y extracción simultáneas proporciona un número de picos muy inferior.

Es interesante destacar el hecho de que para los compuestos presentes en todos los cromatogramas correspondientes a las distintas técnicas, los mayores índices de recuperación corresponden en la mayoría de los casos a la inyección directa. Además, la diferencia existente en términos cuantitativos es, con algunas excepciones, muy favorable al procedimiento propuesto en esta Memoria.

Las diferencias de sensibilidad que proporcionan los distintos métodos pueden apreciarse en las Figuras 50 a 59, que corresponden a cromatogramas registrados con idéntica atenuación de la señal del detector y obtenidos en las condiciones experimentales, descritas en Materiales y Métodos, establecidas previamente como más adecuadas para el procedimiento aplicado en cada caso. Los cromatogramas

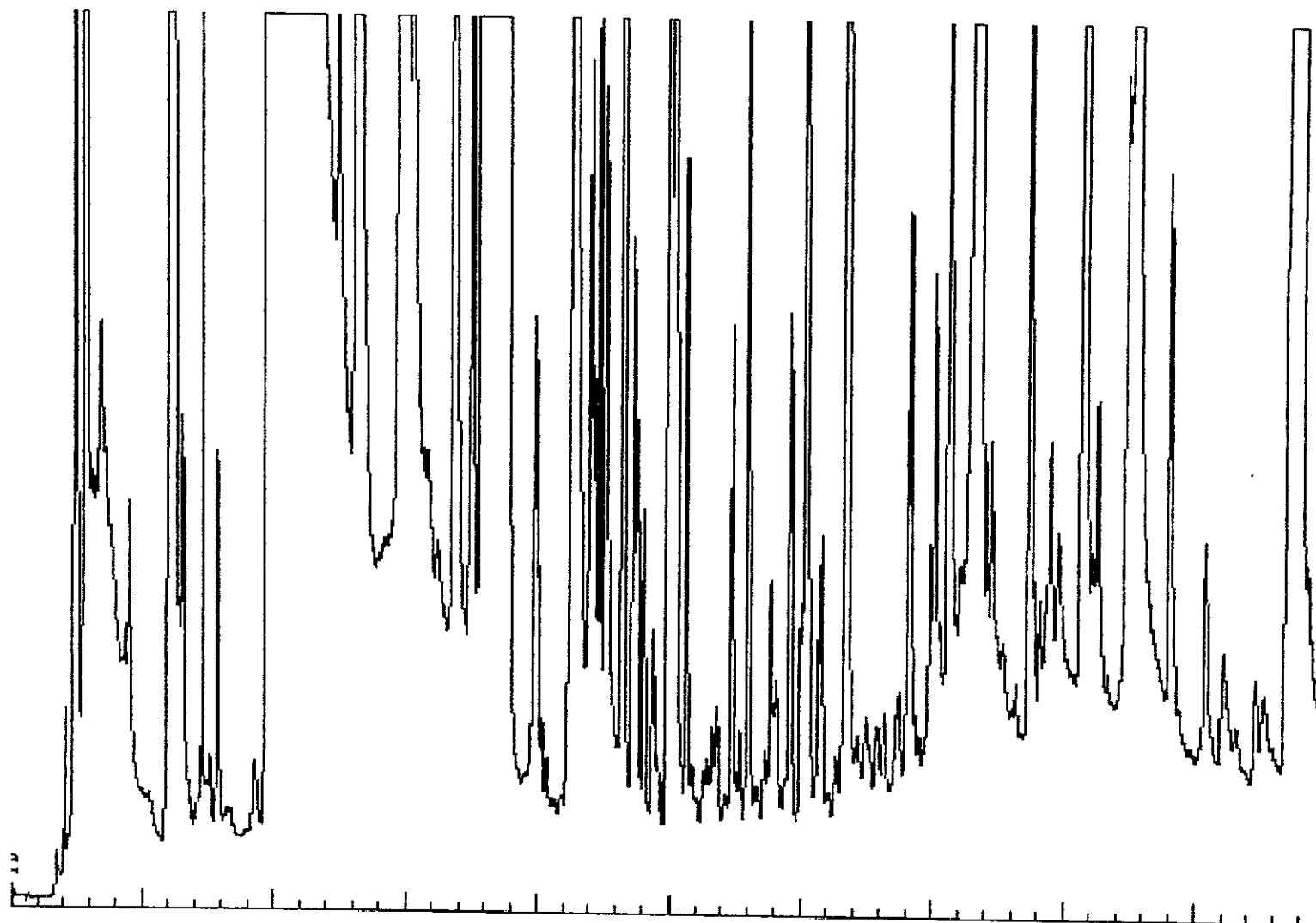


Figura 50. Cromatograma del análisis de pisco realizado por introducción directa. Escala: 3 mV.

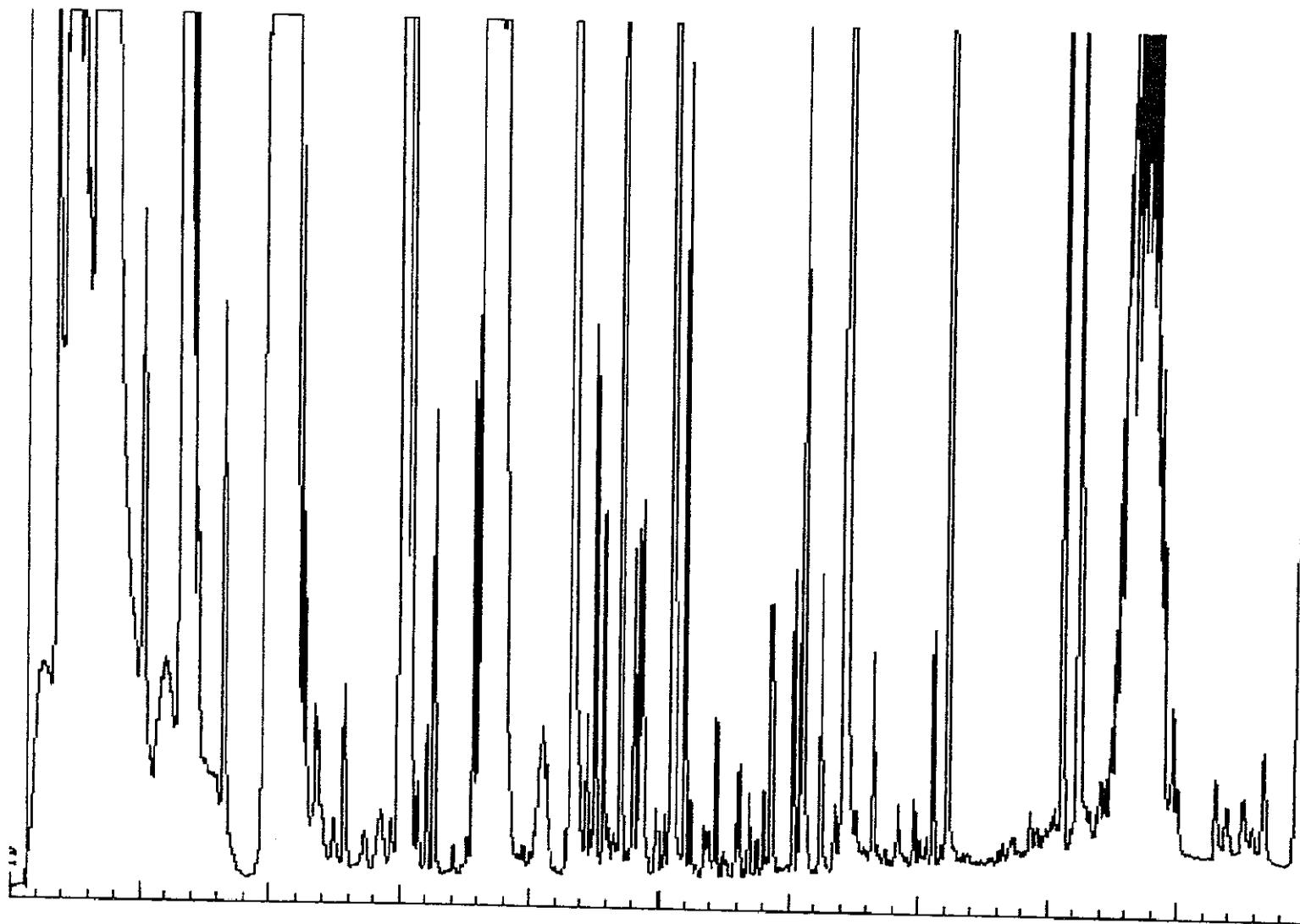


Figura 51. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción líquido-líquido y concentración interna del extracto. Escala: 3 mV.

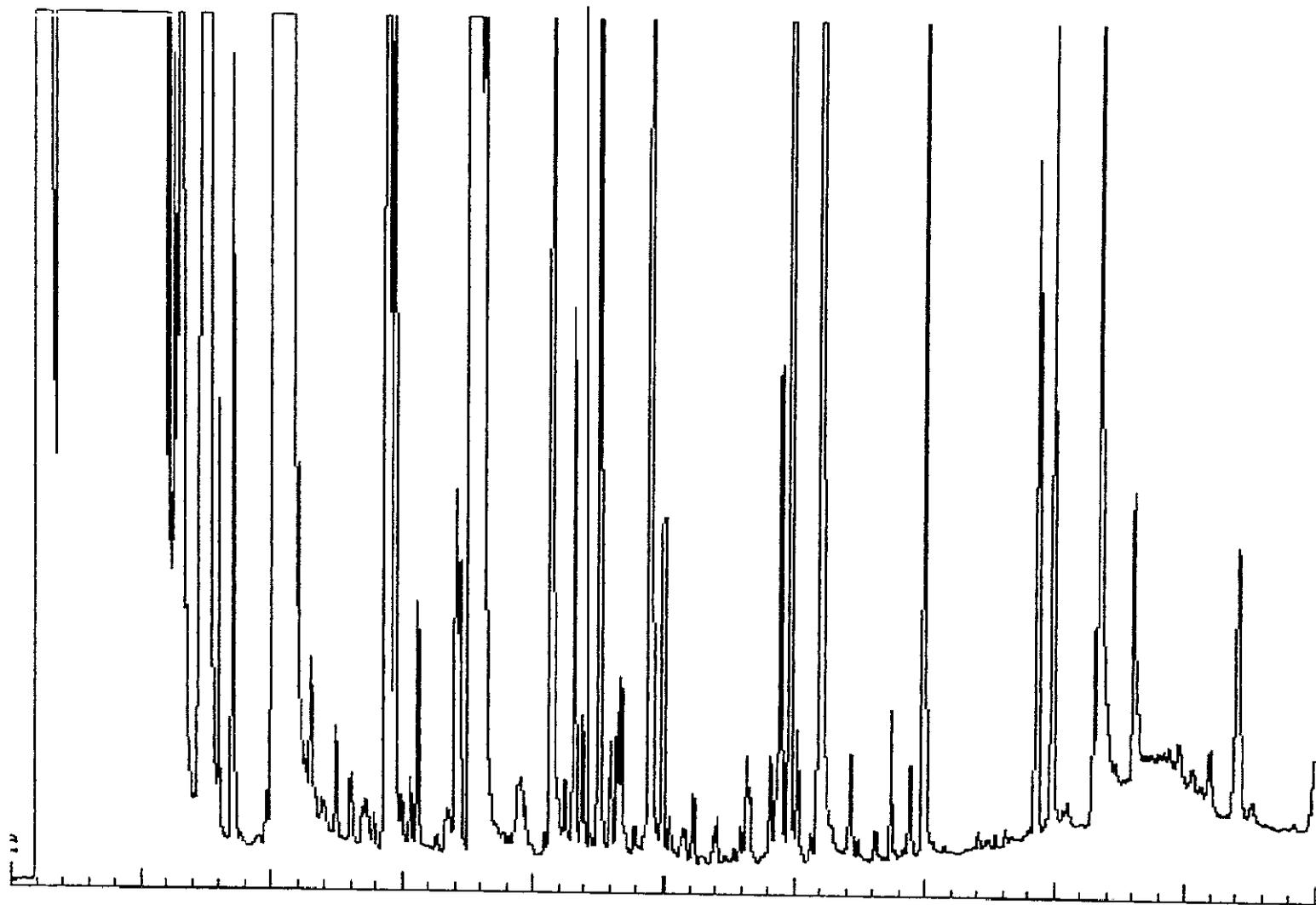


Figura 52. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción líquido-líquido y concentración externa del extracto. Escala: 3 mV.

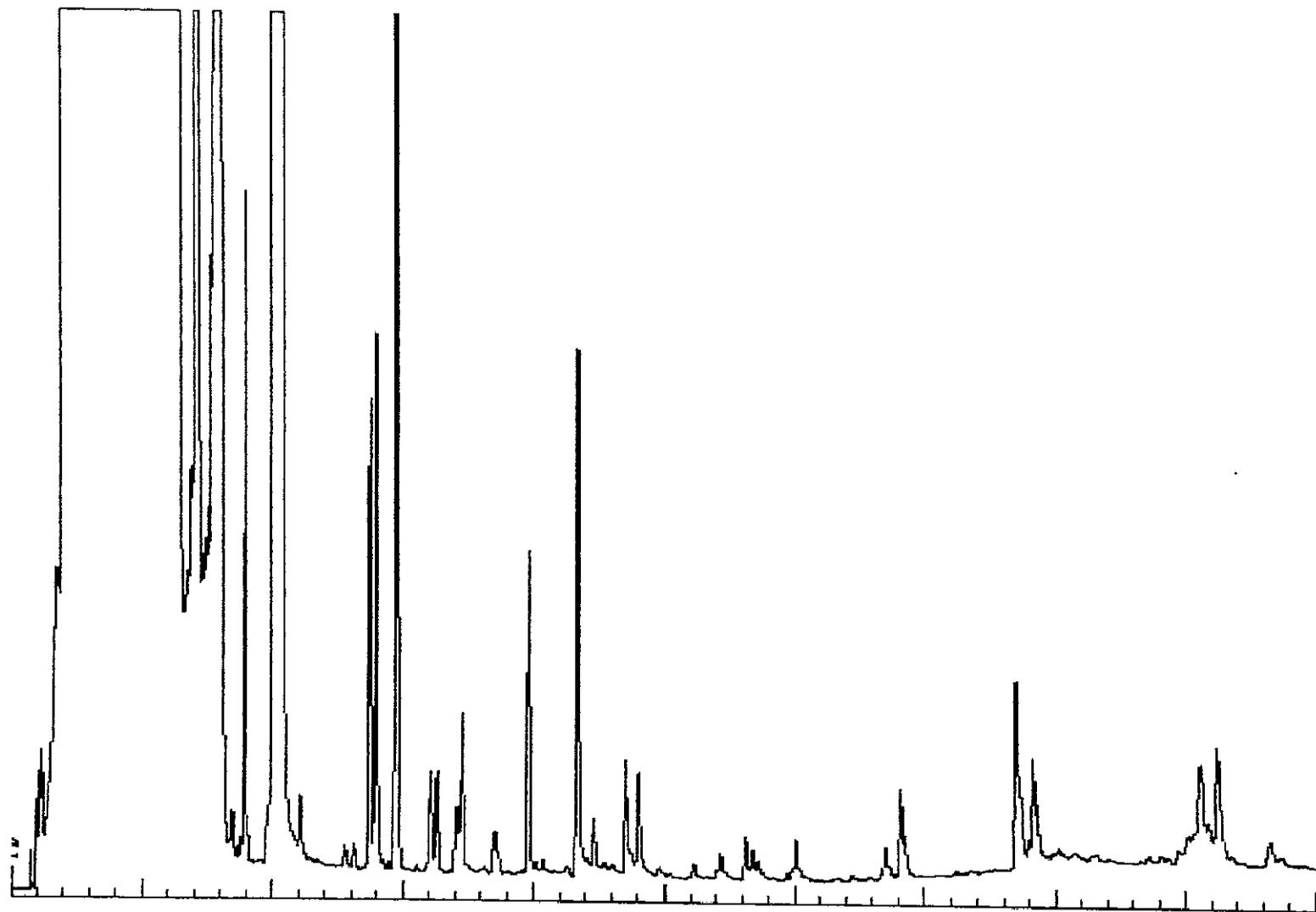


Figura 53. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción y destilación simultáneas y concentración posterior del extracto. Escala: 3 mV.

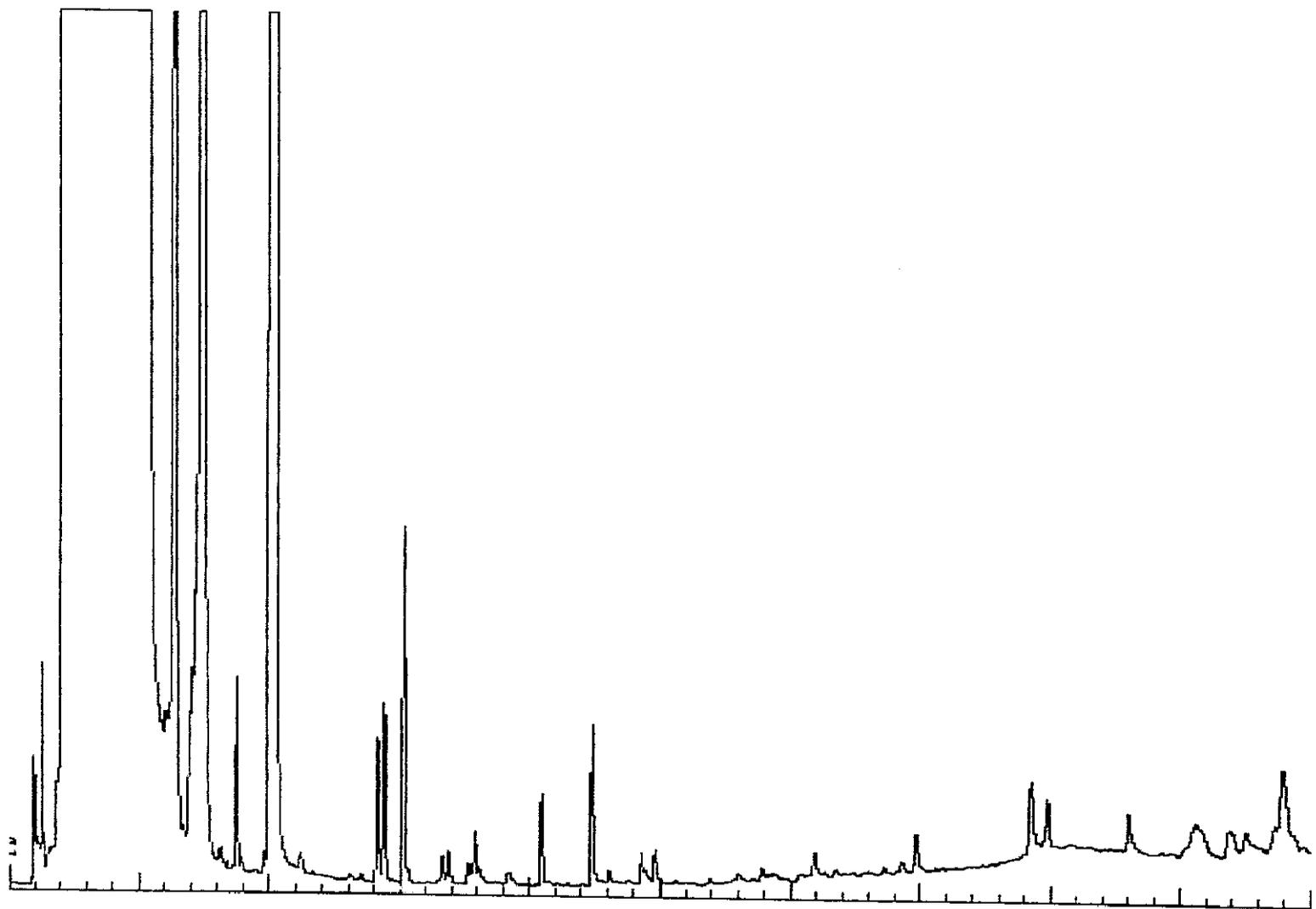


Figura 54. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción y destilación simultáneas sin concentración posterior del extracto. Escala: 3 mV.

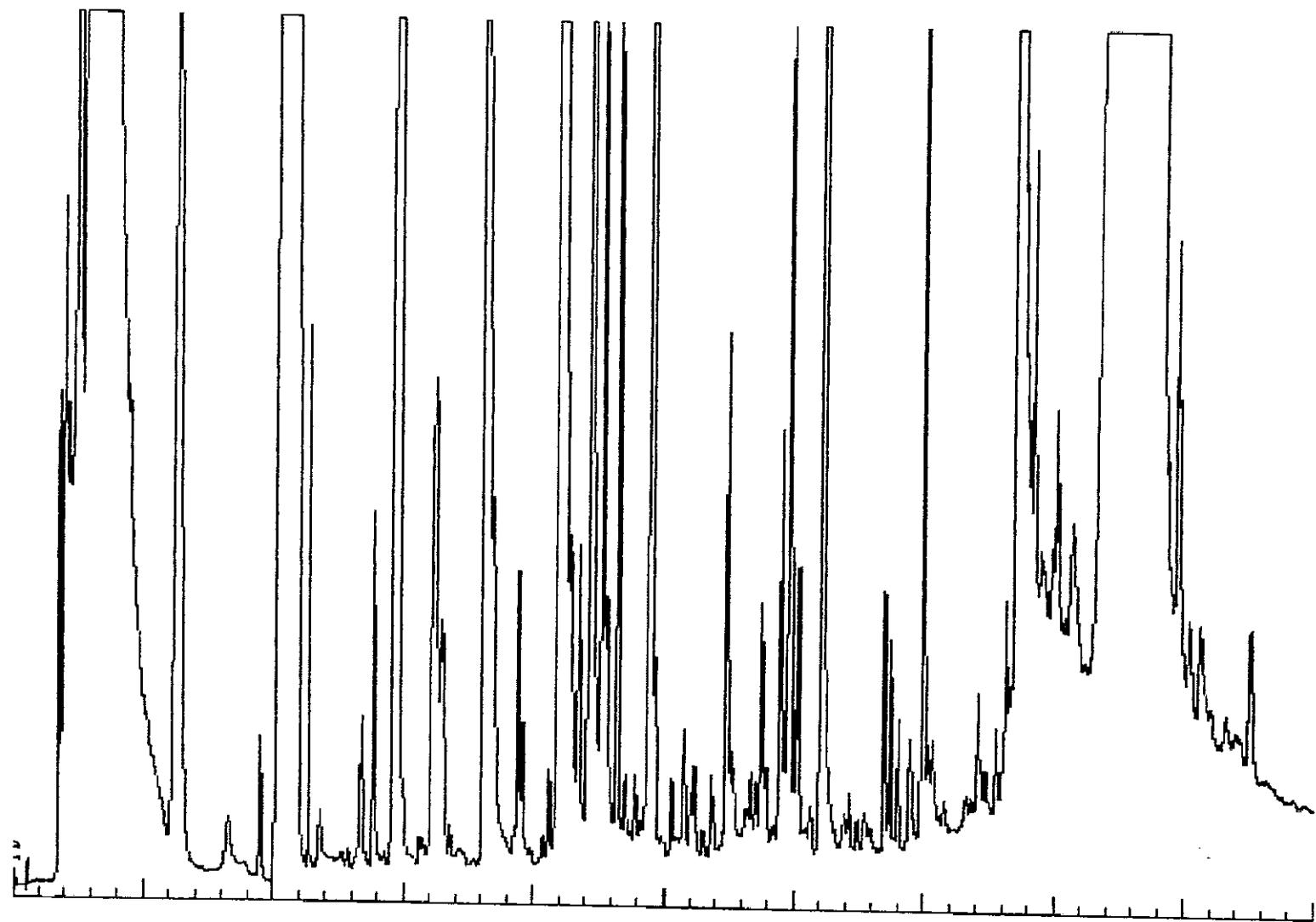


Figura 55. Cromatograma del análisis de vino realizado por introducción directa. Escala: 3 mV.

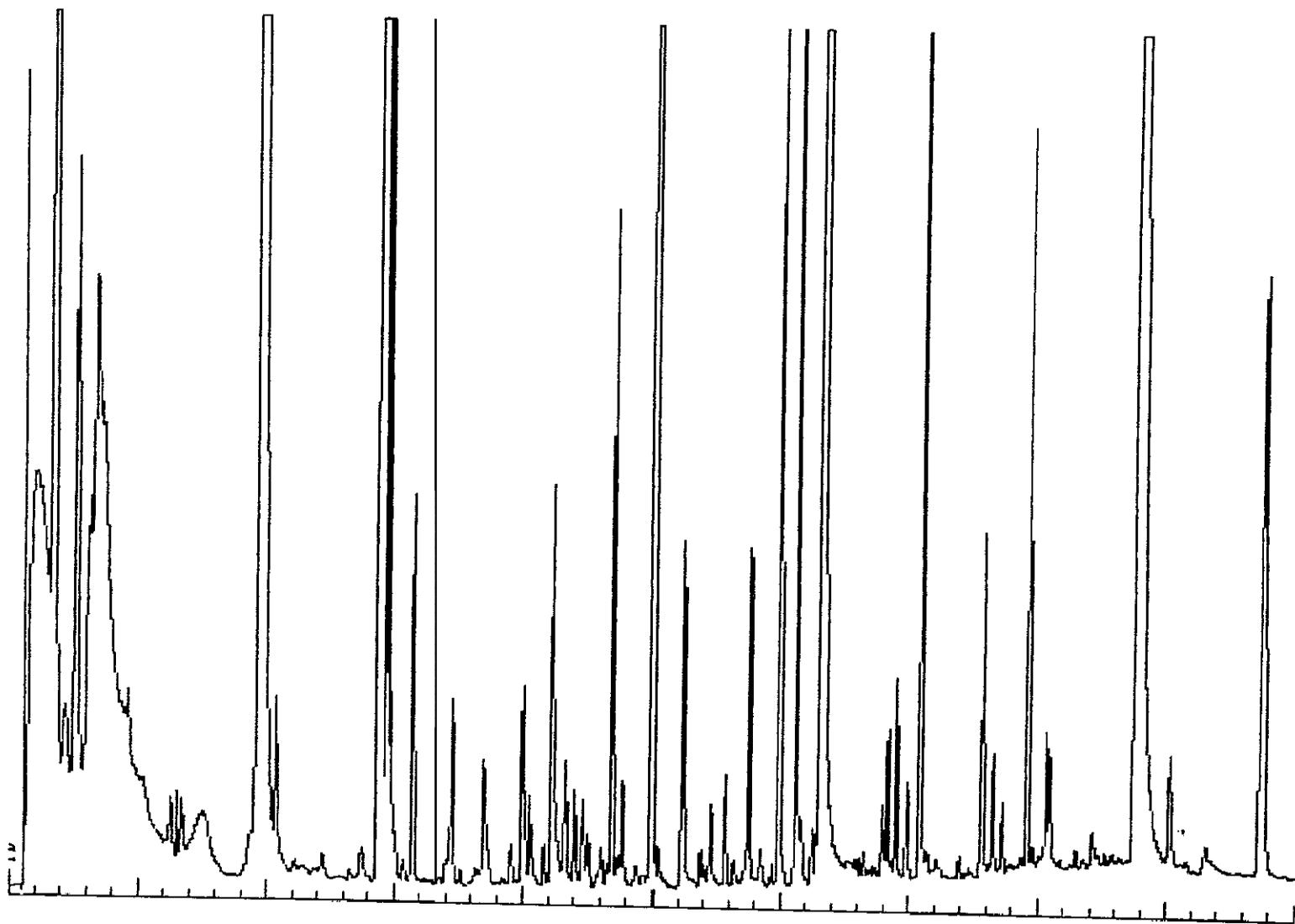


Figura 56. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción líquido-líquido y concentración interna del extracto. Escala: 3 mV.

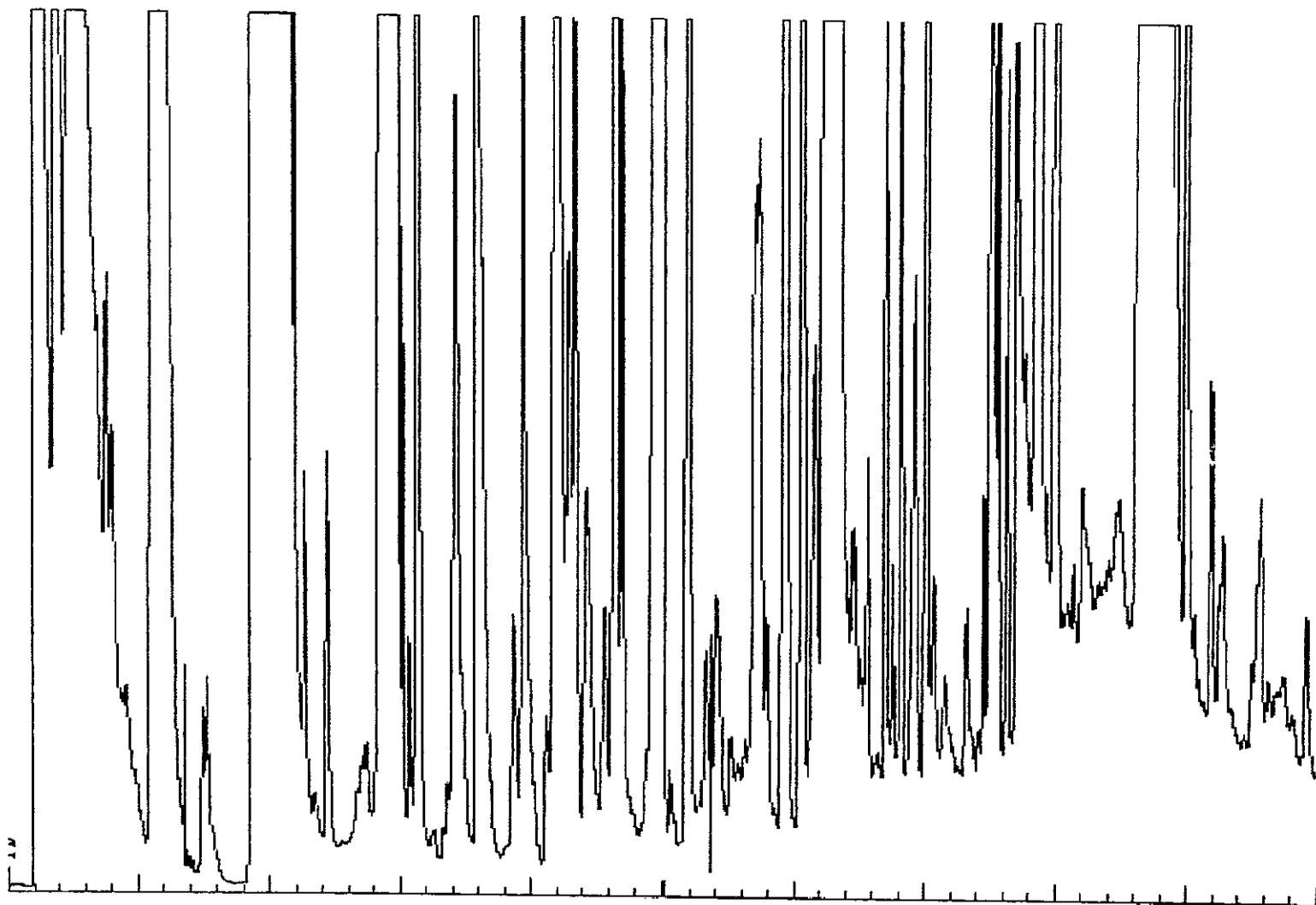


Figura 57. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción líquido-líquido y concentración externa del extracto. Escala: 3 mV.

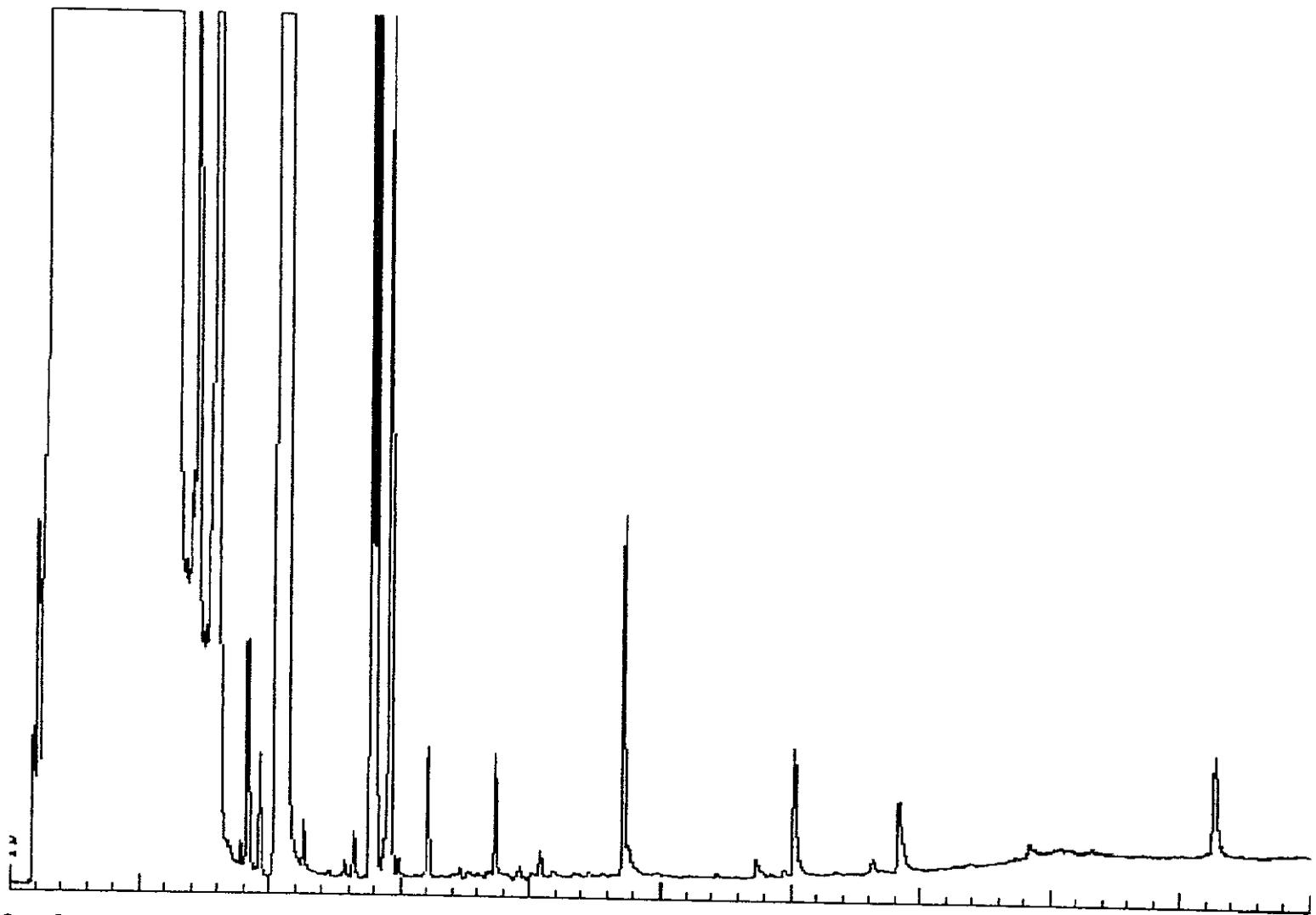


Figura 58. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción y destilación simultáneas y concentración posterior del extracto. Escala: 3 mV.

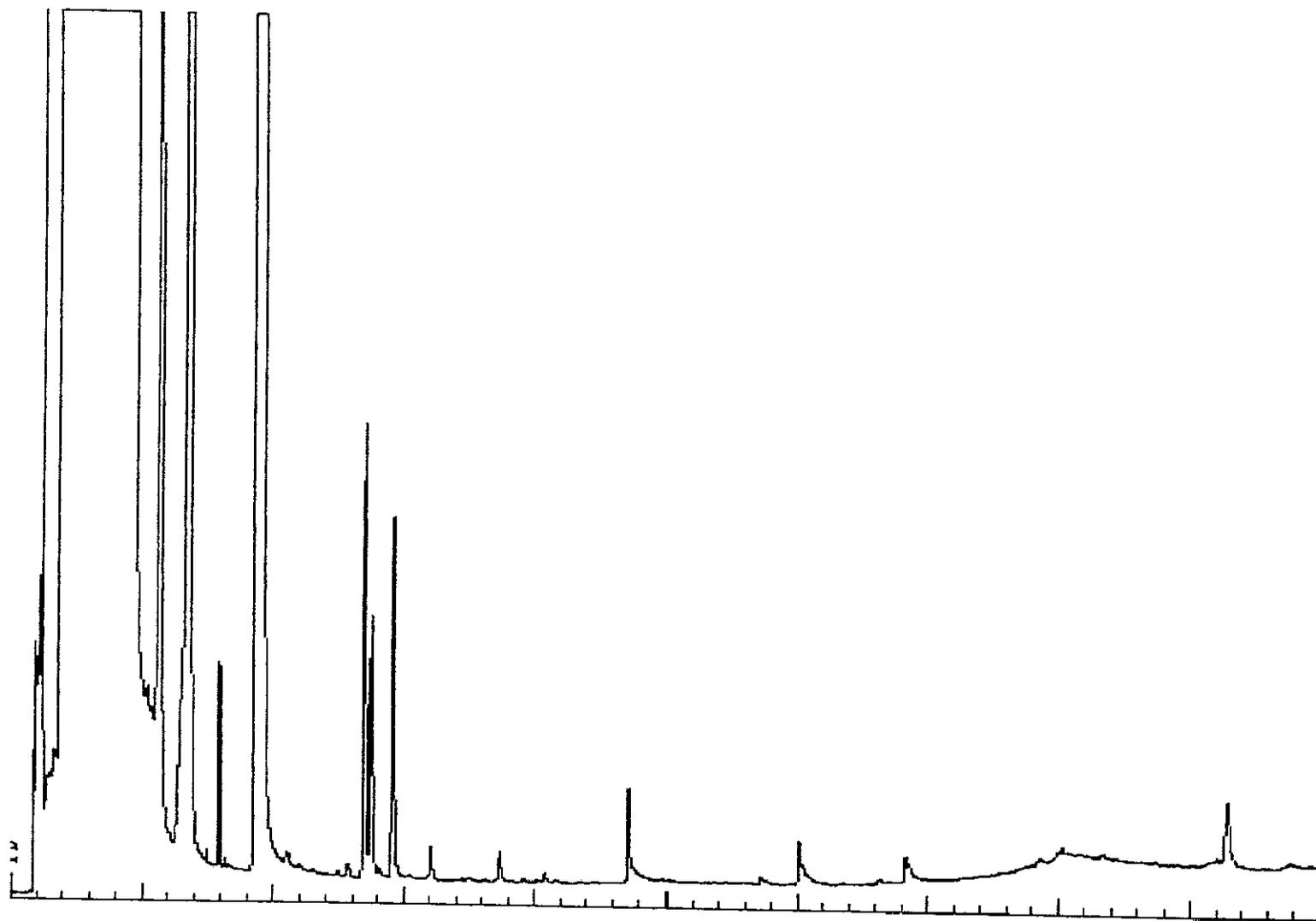


Figura 59. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción y destilación simultáneas sin concentración posterior del extracto. Escala: 3 mV.

correspondientes a la introducción directa y a la extracción líquido-líquido no presentan diferencias apreciables (Figuras 50-52 y 55-57). Sin embargo, los resultantes de la extracción y destilación simultáneas evidencian la presencia en el extracto de un número de picos considerablemente menor (Figuras 53,54 y 58,59).

En el análisis por Espectrometría de Masas se prestó especial atención a la detección de posibles artefactos que, en principio, podrían originarse por descomposición durante la desorción de sustancias térmicamente inestables, presentes en la matriz. Sin embargo, entre los compuestos identificados, componentes todos ellos típicos del aroma de bebidas alcohólicas, no se detectó la formación de dichos artefactos. Por otra parte, los picos debidos a compuestos formados por descomposición térmica, difícilmente presentarían el mismo área en los distintos replicados y, por consiguiente, su presencia produciría una elevada variabilidad en el análisis, lo que, como se comentará posteriormente, no se observa en los datos obtenidos. Por tanto, la formación de artefactos durante la ejecución del método de introducción directa, en lo que se refiere a las muestras de pisco y vino objeto de este estudio, no supone una interferencia apreciable. En los cromatogramas correspondientes a los restantes métodos de extracción tampoco se detectó por Espectrometría de Masas la presencia de compuestos atípicos.

Una idea visual directa de la diferencia del poder de recuperación del método de introducción directa con relación a los restantes procedimientos de extracción estudiados, se puede obtener a partir de las Figuras 60 a 67, en las que se muestran los cromatogramas resultantes (para pisco y vino), de atenuar el registro en la proporción necesaria para que sean comparables entre sí (y con los de las Figuras 50 y 55) en cuanto a sensibilidad. Con este objetivo se corrige con relación al área del patrón interno las variaciones debidas a la dilución de la muestra en la destilación y extracción simultáneas o a las diferencias de volumen final del extracto que inevitablemente ocurren en la extracción líquido-líquido. Se aprecia claramente cómo las áreas de los picos obtenidos por introducción directa son mayores que las resultantes en el resto de los métodos, lo que evidencia la superior sensibilidad de la técnica.

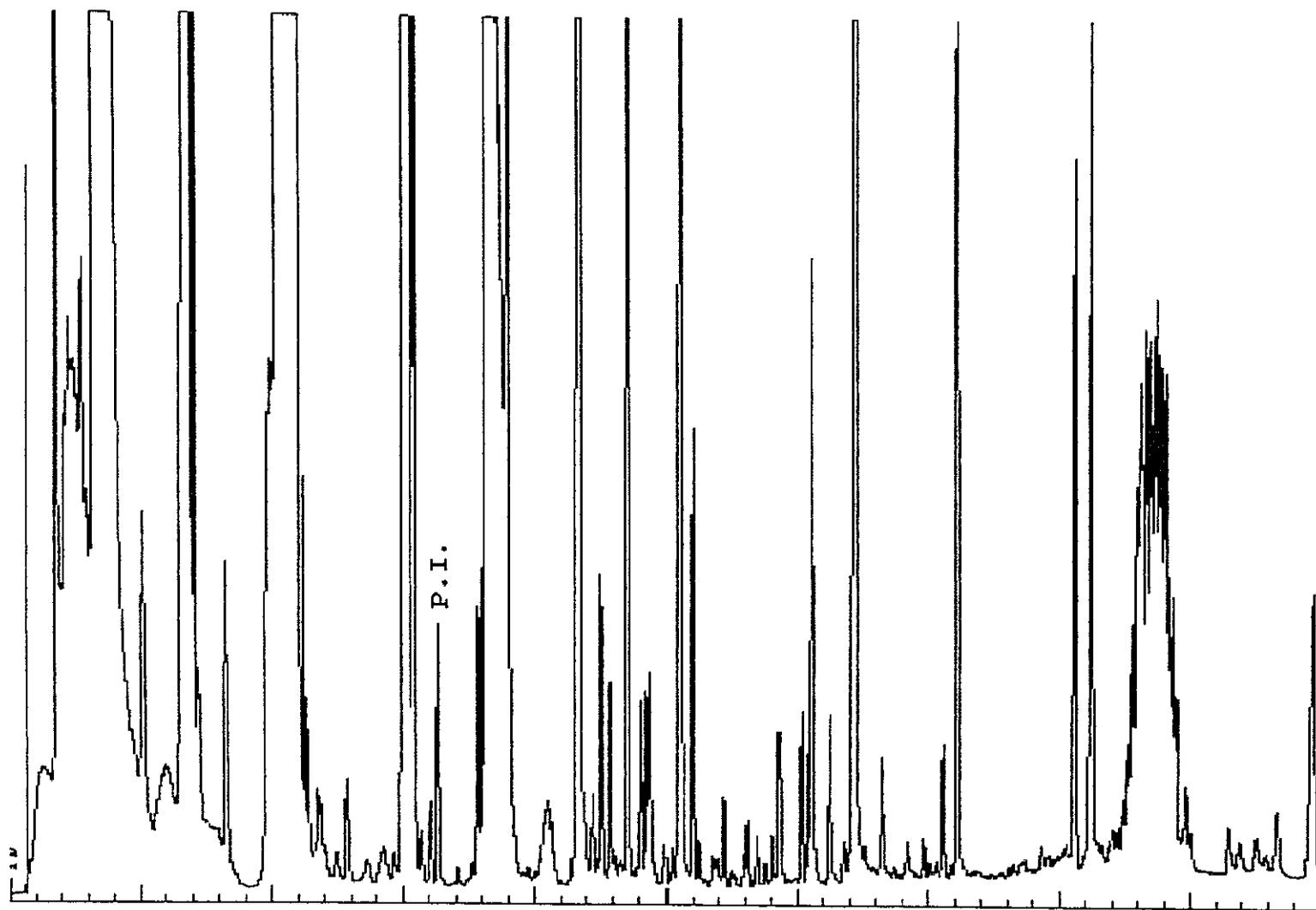


Figura 60. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción líquido-líquido y concentración interna del extracto. Escala: 5,5 mV.

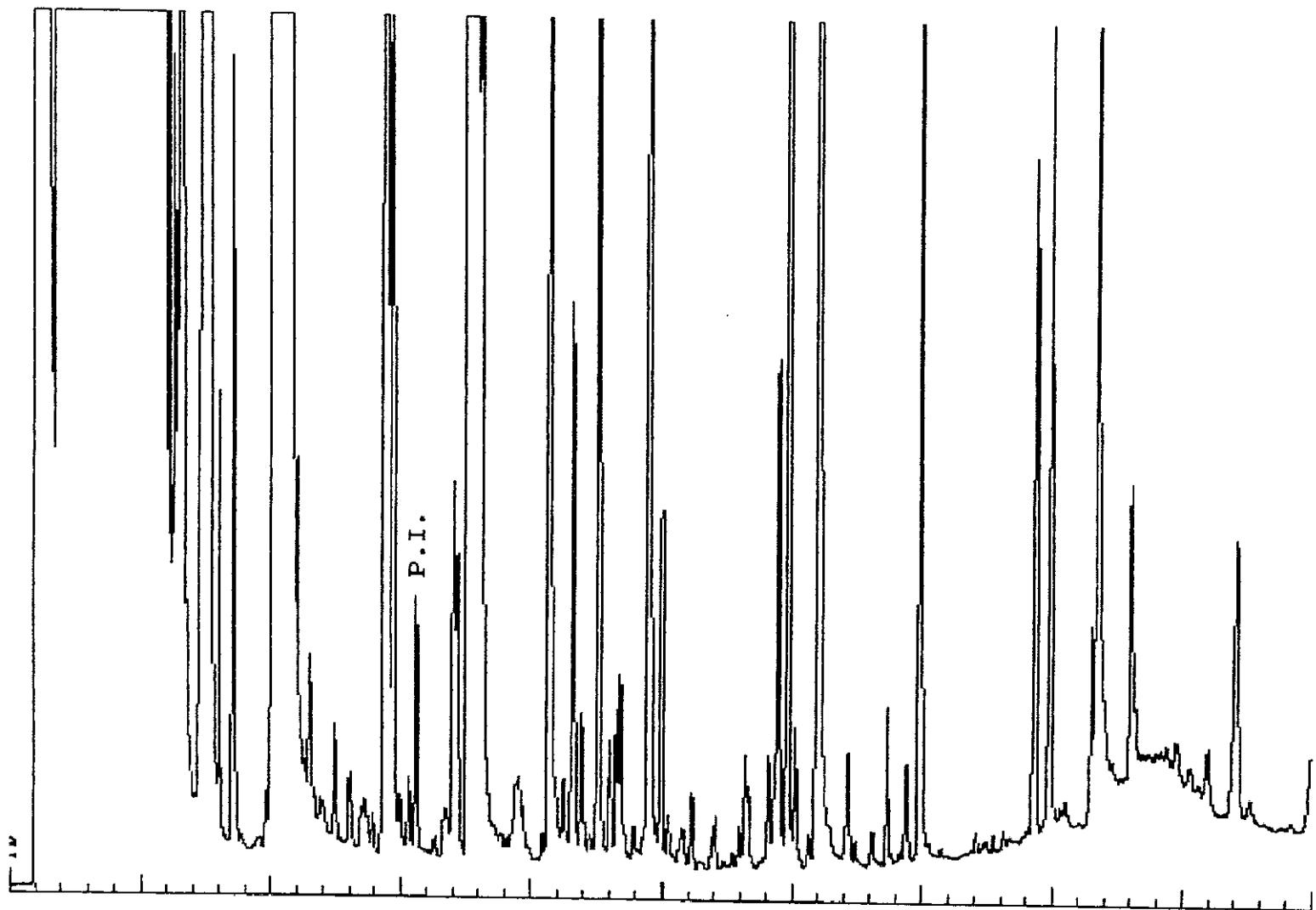


Figura 61. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción líquido-líquido y concentración externa del extracto. Escala: 3 mV.

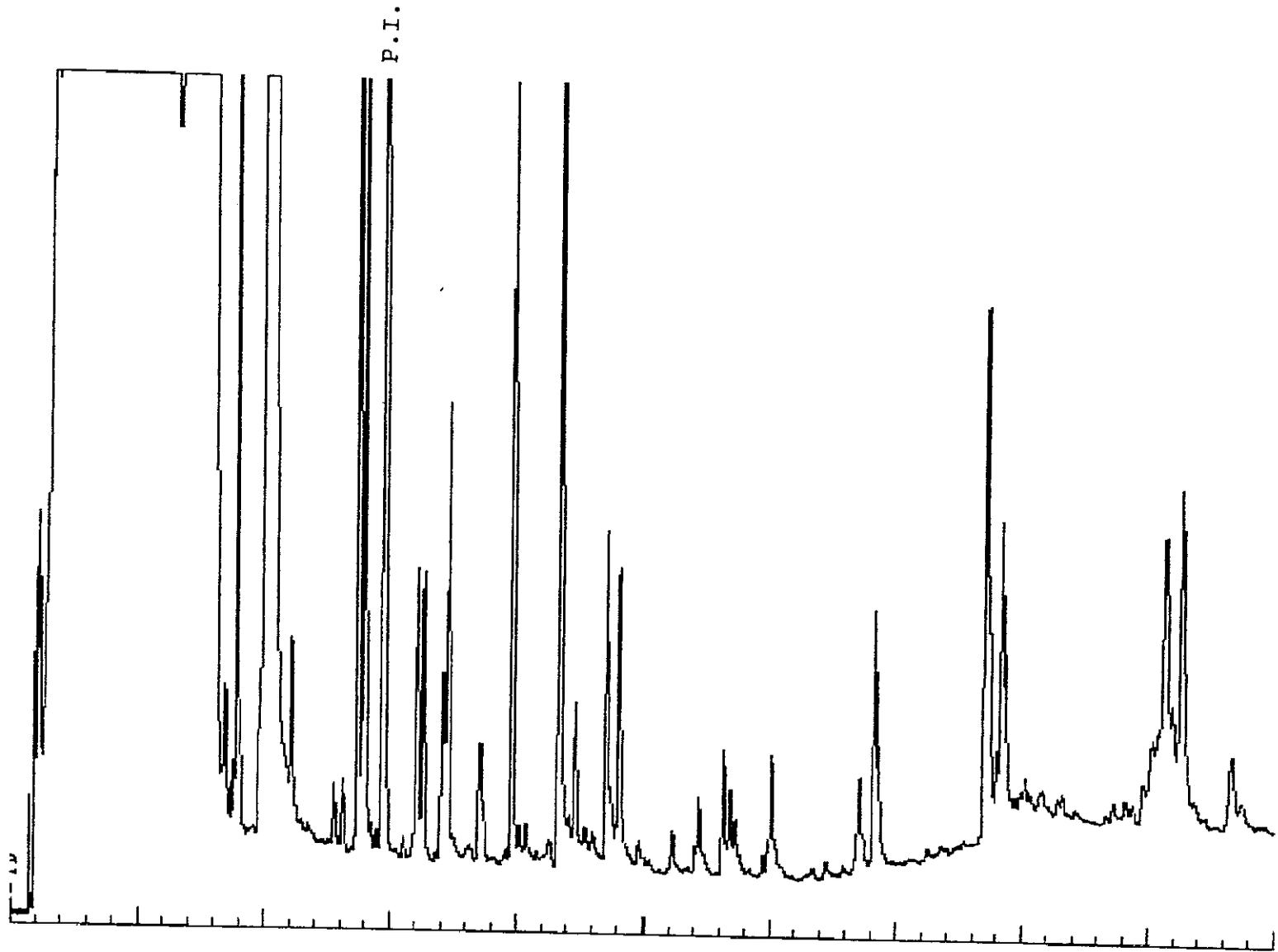


Figura 62. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción y destilación simultáneas y concentración posterior del extracto. Escala: 1 mV.

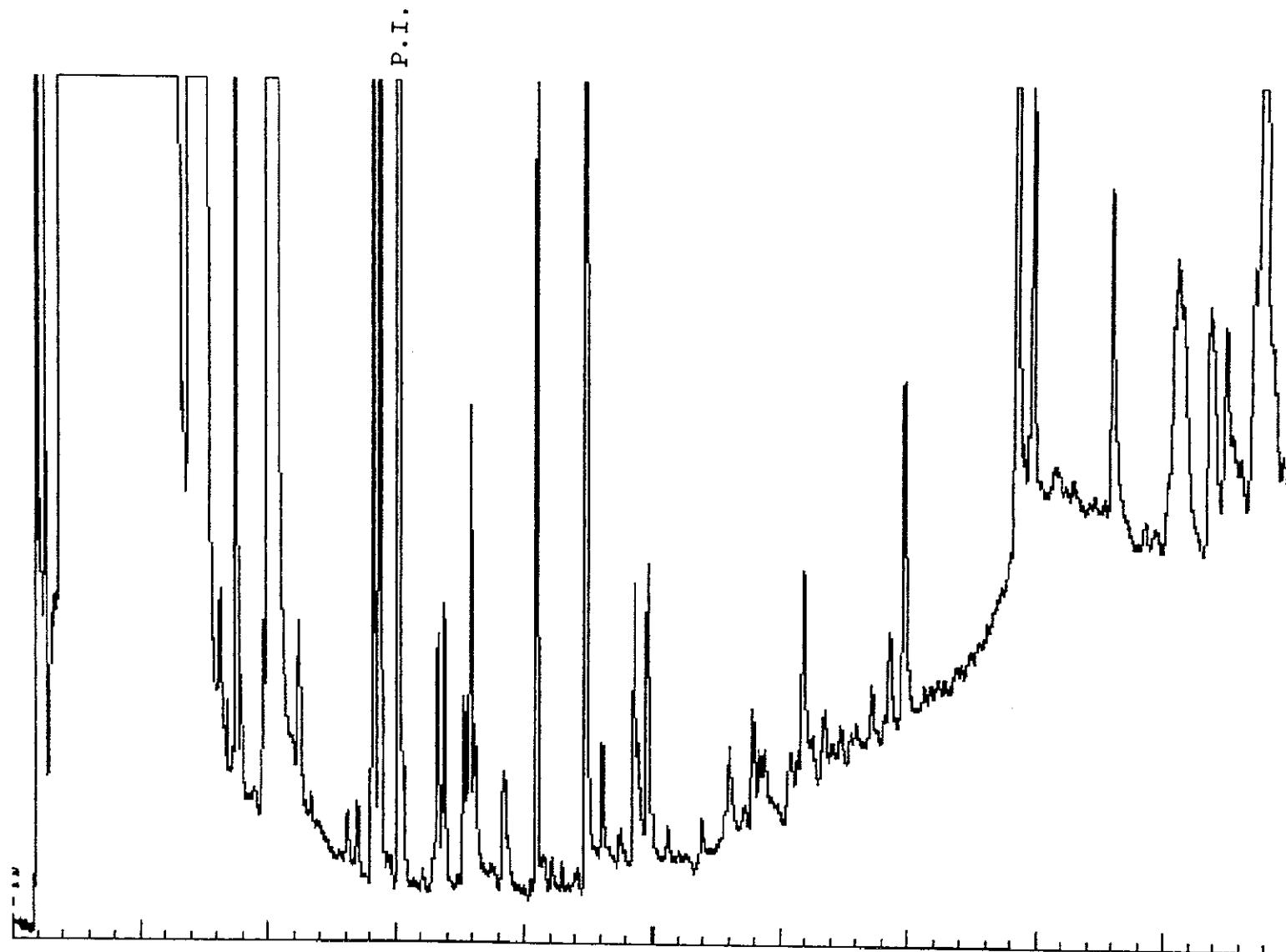


Figura 63. Cromatograma del análisis de pisco realizado por extracción y destilación simultáneas sin concentración posterior del extracto. Escala: 0,34 mV.

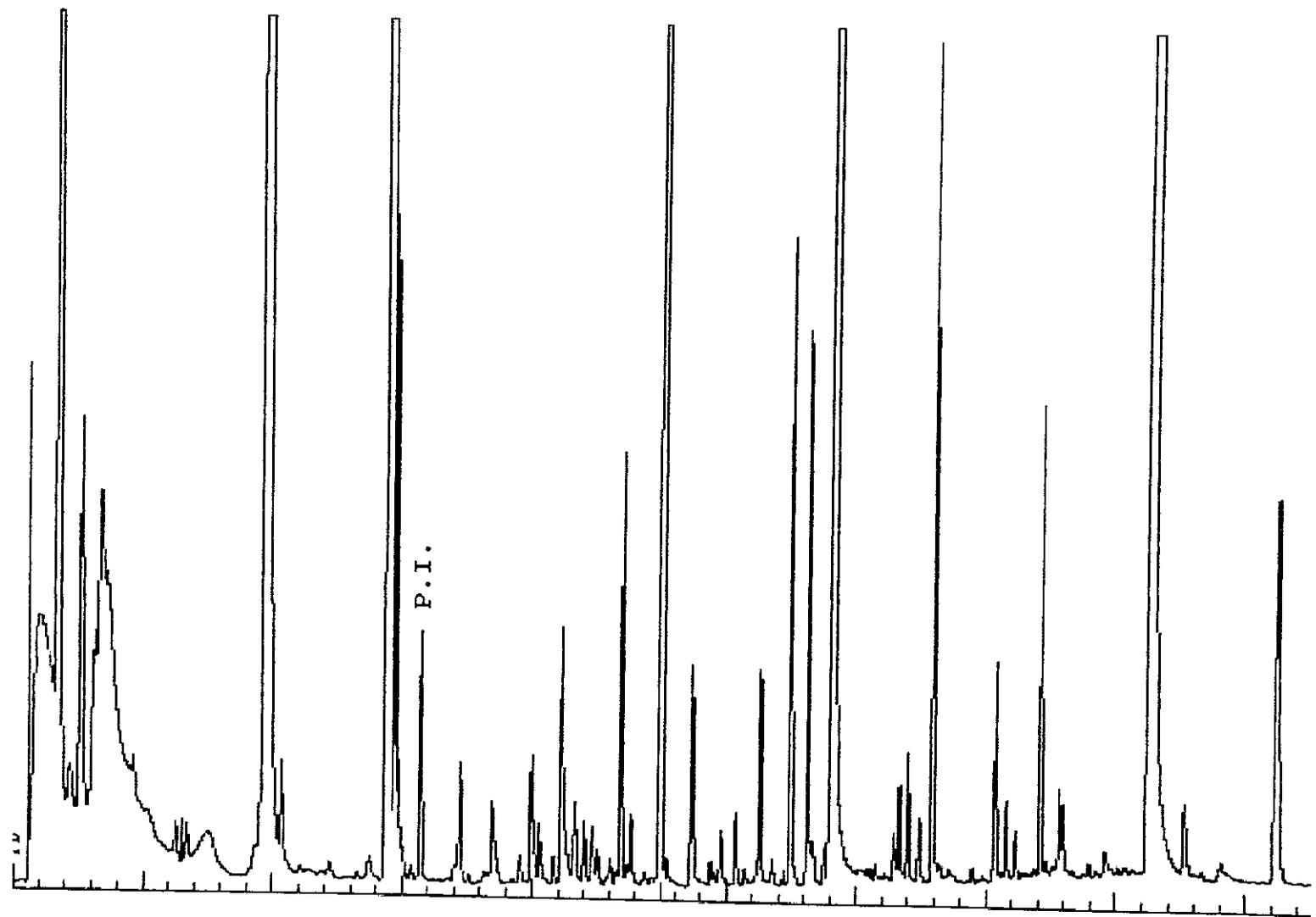


Figura 64. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción líquido-líquido y concentración interna del extracto. Escala: 4,8 mV.

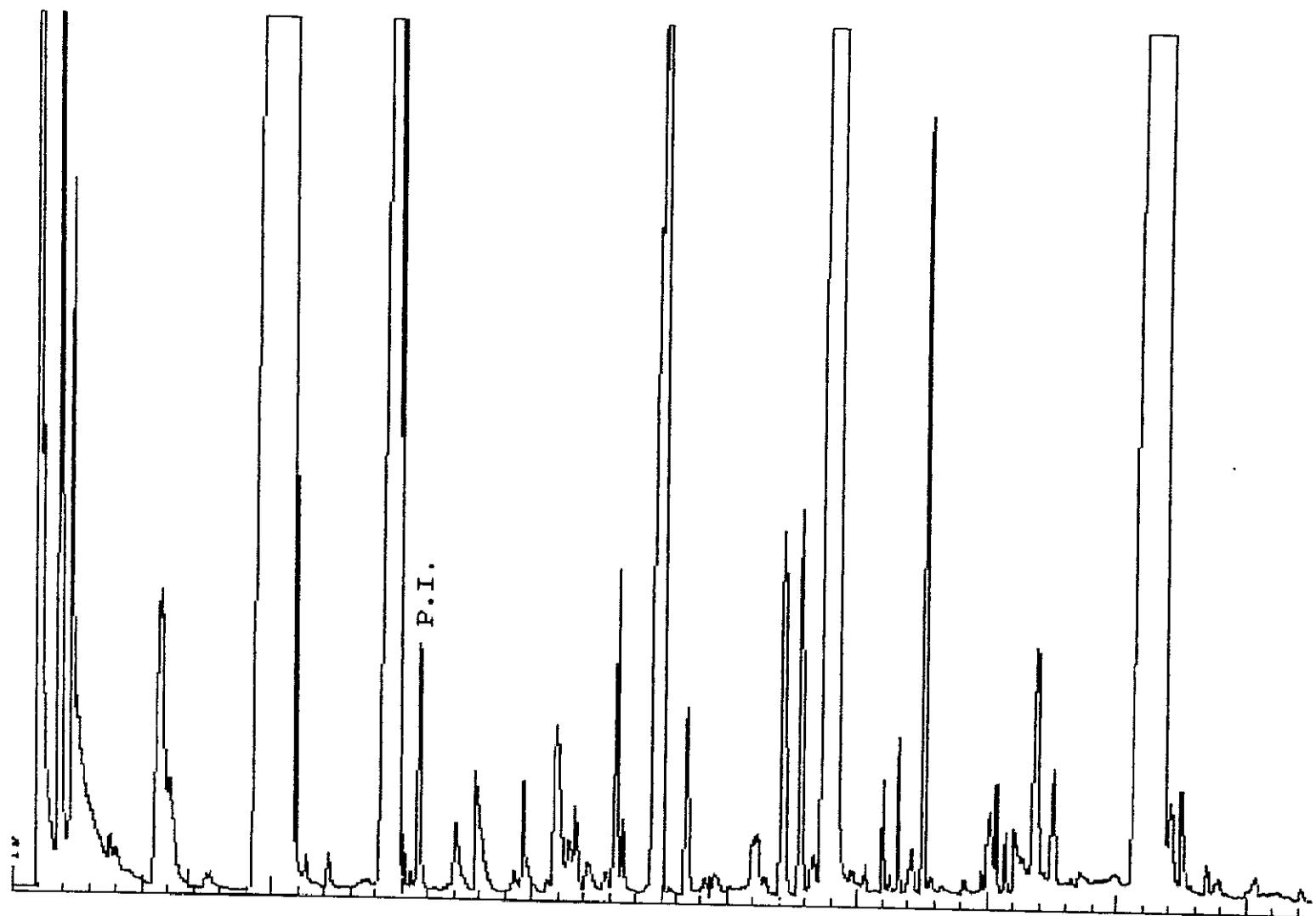


Figura 65. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción líquido-líquido y concentración externa del extracto. Escala: 35 mV.

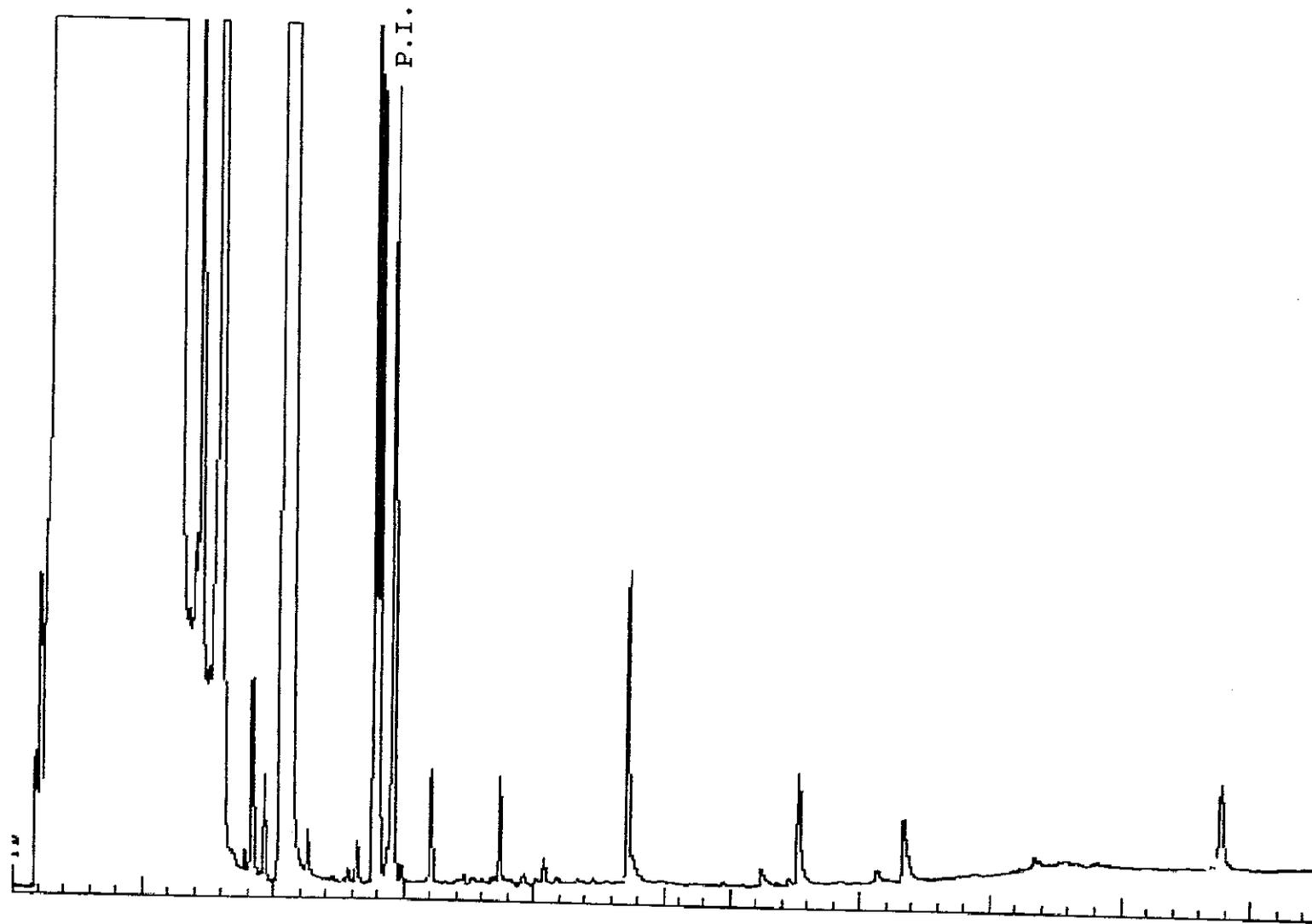


Figura 66. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción y destilación simultáneas y concentración posterior del extracto. Escala: 3,5 mV.

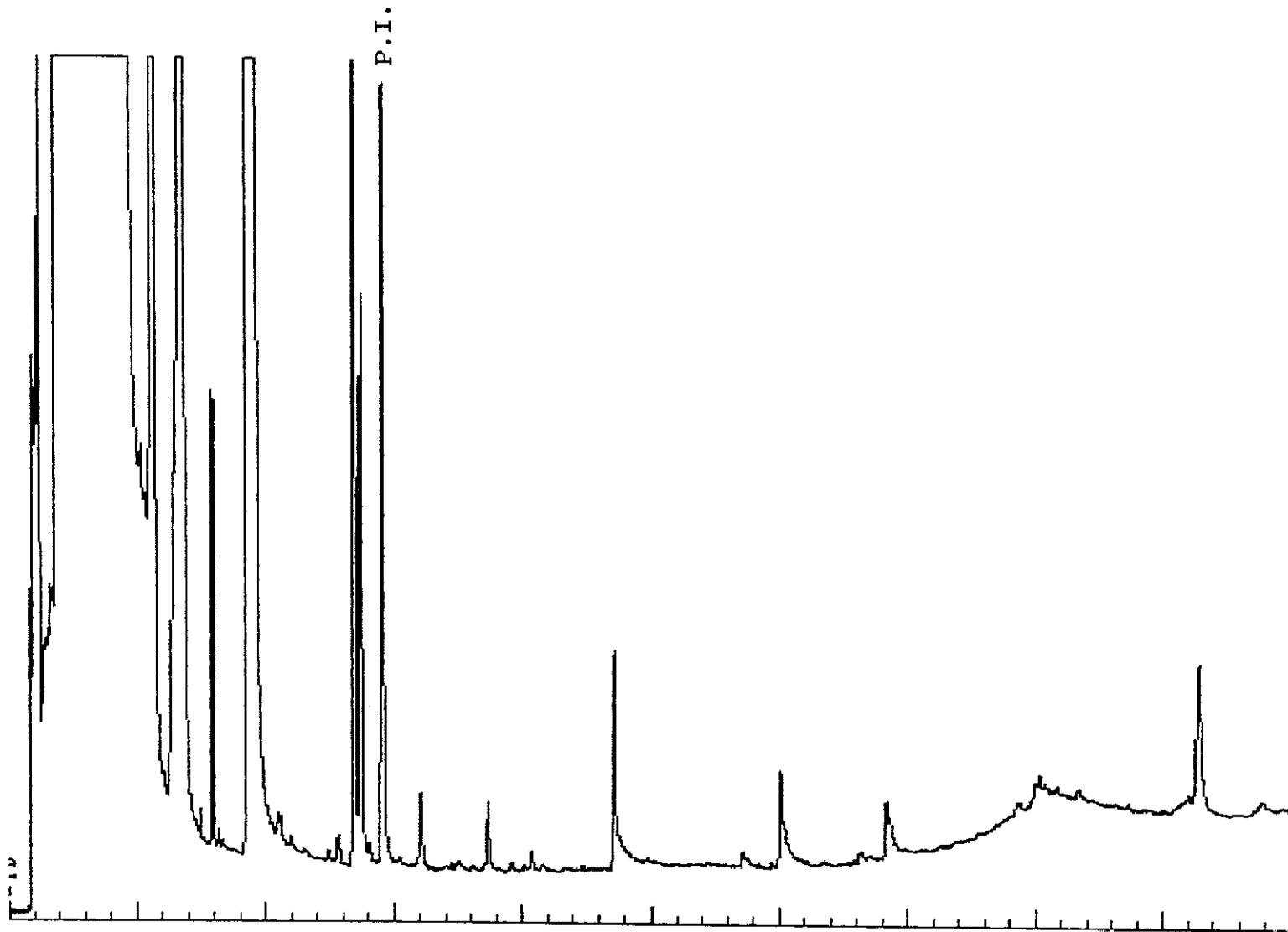


Figura 67. Cromatograma del análisis de vino realizado por extracción y destilación simultáneas sin concentración posterior del extracto. Escala: 1,3 mV.

### 3.4.2. Precisión.

En las Tablas 22 a 27 se muestran los coeficientes de variación, expresados en %, de las áreas absolutas, áreas normalizadas y relativas al patrón interno, de los picos obtenidos en las seis repeticiones de cada uno de los métodos de análisis. Las Tablas 22, 23 y 24 corresponden al pisco, y las Tablas 25, 26 y 27 al vino.

En el caso del pisco, los menores coeficientes de variación de las áreas absolutas (Tabla 22) se obtienen cuando se introduce la muestra directamente o se recurre a la extracción líquido-líquido con concentración interna. Los restantes métodos proporcionan coeficientes de variación muy superiores, especialmente elevados en la destilación y extracción simultáneas.

En lo que se refiere a áreas normalizadas (Tabla 23), las medias de los coeficientes de variación en introducción directa y en extracción líquido-líquido con concentración interna son del mismo orden que los correspondientes a las áreas absolutas. Sin embargo, en los otros métodos, los coeficientes de variación de las áreas normalizadas son menores que los de las áreas absolutas.

**Tabla 22.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas absolutas de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de pisco.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.67	-	9.0	22.8	-	-
-	0.68	-	16.1	-	-	-
-	0.71	-	9.9	14.0	32.3	16.9
-	0.76	-	17.5	-	-	-
1-Hexanol	0.78	18.2	2.6	8.2	-	-
-	0.83	-	22.4	49.3	-	-
-	0.87	-	14.9	11.4	71.7	-
-	0.89	-	18.4	21.2	34.2	-
Lactato de etilo + cis-3-hexen-1-ol	0.94	9.4	6.0	11.8	33.2	24.7
-	0.96	-	22.7	13.6	-	-
-	0.98	-	9.9	9.4	-	-
Octanoato de metilo (P.I.)	1.00	-	3.9	15.0	31.2	20.4
-	1.04	-	7.2	-	-	-
-	1.08	-	26.9	-	-	-
-	1.09	-	2.7	12.2	31.4	20.3
-	1.11	14.3	4.2	14.6	30.1	16.1
Acido Acético + benzaldehído	1.15	13.1	14.7	9.7	26.4	26.9
-	1.19	14.3	-	-	18.0	-
-	1.31	-	5.7	17.4	-	-
Acido propanoico	1.33	15.4	11.4	13.1	25.1	13.7
-	1.36	-	2.5	19.6	-	-
-	1.38	-	2.6	10.0	-	-
-	1.40	7.2	10.9	16.0	-	-
Linalol	1.44	3.3	3.6	15.7	26.4	23.2
-	1.47	-	18.0	8.6	-	-

Continúa

Tabla 22. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	1.48	-	7.5	11.2	-	-
Decanoato de etilo	1.50	15.6	8.2	15.8	26.2	-
γ-Butirolactona	1.52	11	15.4	32.6	-	-
Acido Butanoico	1.55	13	16.3	-	-	-
Succinato Diet.	1.57	7.1	2.4	16.1	16.9	19.8
α-terpineol	1.59	6.3	2.8	15.9	40.9	14.5
-	1.61	-	3.3	24.6	-	-
-	1.65	14.7	10.7	-	-	-
-	1.66	8.1	5.2	11.7	-	-
-	1.71	-	9.2	20.7	-	-
-	1.72	11.2	5.3	13.4	22.9	-
-	1.74	2.5	29.1	-	-	-
-	1.76	17.1	22.8	-	-	-
-	1.77	-	10.6	14.8	-	-
-	1.79	18.8	8.2	17.2	31.2	-
-	1.81	-	-	15.3	-	-
-	1.84	4.1	4.0	17.4	26.2	-
-	1.86	-	3.5	-	37.7	-
Acido hexanoico	1.87	6.9	3.0	11.0	36.2	-
Bencilalcohol	1.91	7.1	2.2	15.9	-	-
-	1.94	-	2.1	11.7	-	-
2-Feniletanol	1.97	3.1	2.6	14.9	42.4	24.4
-	1.99	12.2	12.0	-	-	-
-	2.01	3.5	-	-	-	-
-	2.03	15.7	12.0	14.0	-	-
-	2.05	-	-	39.7	-	-
-	2.07	12.8	-	-	-	-
-	2.09	7.4	8.5	16.9	-	-
-	2.13	-	30.1	16.0	-	-
-	2.14	-	1.9	-	-	-

Continúa

Tabla 22. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	2.16	4.7	11.7	-	-	-
-	2.17	11.9	4.2	24.7	19.0	26.1
-	2.19	-	16.5	-	-	-
Acido octanoico	2.24	3.6	3.9	16.2	31.0	-
-	2.25	-	-	-	43.2	-
-	2.26	12.2	-	-	-	-
-	2.28	29.4	-	-	-	-
-	2.30	7.8	-	-	-	-
-	2.35	15.5	-	-	-	-
Hexadecanoato de etilo	2.40	5.4	13.7	-	-	-
Acido decanoico	2.50	8.4	5.1	16.5	26.3	30.0
-	2.53	15.3	-	-	-	-
-	2.63	11.4	17.5	-	-	-
-	2.68	7.0	-	38.3	-	53.4
-	2.74	9.6	-	-	-	-
-	2.84	-	87.4	-	-	-
-	2.86	-	10.6	-	-	-
-	2.90	-	12.9	-	-	-
-	2.93	-	24.1	-	-	-
-	2.95	-	23.6	-	-	-
-	3.03	5.3	3.9	18.1	29.1	-
-	3.07	-	23.4	-	21.9	-
-	3.24	-	5.2	19.1	-	37.4

**Tabla 23.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas normalizadas de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de pisco.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.67	-	8.6	17.5	-	-
-	0.68	-	16.9	-	-	-
-	0.71	-	9.7	5.2	11.8	10.5
-	0.76	-	15.7	-	-	-
1-Hexanol	0.78	15.5	4.1	14.7	-	-
-	0.83	-	22.6	43.3	-	-
-	0.87	-	16.9	9.7	41.8	-
-	0.89	-	24.3	18.4	18.1	-
Lactato de etilo + cis-3-hexen-1-ol	0.94	6.6	2.1	3.2	6.6	10.6
-	0.96	-	20.0	2.9	-	-
-	0.98	-	5.4	3.6	-	-
Octanoato de metilo (P.I.)	1.00	-	4.6	5.7	6.9	7.6
-	1.04	-	6.0	-	-	-
-	1.08	-	29.0	-	-	-
-	1.09	-	5.9	5.2	5.9	12.5
-	1.11	13.8	7.3	6.0	4.7	28.3
Acido acético + benzaldehído	1.15	8.7	9.5	11.1	8.7	17.1
-	1.19	17.7	-	-	6.5	-
-	1.31	-	9.5	11.3	-	-
Acido propanoico	1.33	19.1	6.3	5.2	5.8	10.8
-	1.36	-	4.3	12.0	-	-
-	1.38	-	3.0	4.1	-	-
-	1.40	4.5	7.5	6.2	-	-
Linalol	1.44	4.9	4.7	5.6	4.3	13.4

Continúa

Tabla 23. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESE
-	1.47	-	15.8	8.5	-	-
-	1.48	-	10.5	7.5	-	-
Decanoato de etilo	1.50	11	9.0	6.2	7.9	-
γ-Butirolactona	1.52	14.8	14.6	25.5	-	-
Acido butanoico	1.55	15.7	17.8	-	-	-
Succinato Diet.	1.57	1.99	4.8	6.0	18.1	21.7
α-Terpineol	1.59	9.35	6.1	5.8	18.9	11.8
-	1.61	-	7.1	15.0	-	-
-	1.65	12	10.7	-	-	-
-	1.66	11.7	4.5	3.9	-	-
-	1.71	-	9.7	10.9	-	-
-	1.72	10.3	5.0	5.3	22.5	-
-	1.74	4.53	31.3	-	-	-
-	1.76	14.5	20.0	-	-	-
-	1.77	-	10.6	5.7	-	-
-	1.79	19	6.0	10.2	19.9	-
-	1.81	-	-	6.2	-	-
-	1.84	3.81	5.4	7.62	9.9	-
-	1.86	-	6.3	-	9.8	-
Acido hexanoico	1.87	7.52	4.2	15.7	10.0	-
Bencilalcohol	1.91	8.09	5.0	5.8	-	-
-	1.94	-	6.0	9.6	-	-
2-Feniletanol	1.97	5.72	4.1	5.1	15.2	22.0
-	1.99	13.9	7.6	-	-	-
-	2.01	6.99	-	-	-	-
-	2.03	14.8	8.9	7.0	-	-
-	2.05	-	-	35.4	-	-
-	2.07	17.4	-	-	-	-

Continúa

Tabla 23. Continuación.

<u>IDENTIFICACION</u>	<u>TRR</u>	<u>ID</u>	<u>LLCI</u>	<u>LLCE</u>	<u>SDEC</u>	<u>SDESC</u>
-	2.09	2.9	11.2	15.0	-	-
-	2.13	-	28.4	12.9	-	-
-	2.14	-	4.5	-	-	-
-	2.16	4.4	10.3	-	-	-
-	2.17	9.0	4.8	15.6	9.7	24.4
-	2.19	-	15.9	-	-	-
Acido octanoico	2.24	8.5	4.5	5.9	12.8	-
-	2.25	-	-	-	19.3	-
-	2.26	7.6	-	-	-	-
-	2.28	27.2	-	-	-	-
-	2.30	7.2	-	-	-	-
-	2.35	15.9	-	-	-	-
Palmitato de etilo	2.40	6.0	9.3	-	-	-
Acido decanoico	2.50	4.8	4.7	5.7	9.5	20.3
-	2.53	11.3	-	-	-	-
-	2.63	10.0	14.6	-	-	-
-	2.68	8.6	-	32.0	-	40.3
-	2.74	7.8	-	-	-	-
-	2.84	-	85.1	-	-	-
-	2.86	-	13.3	-	-	-
-	2.90	-	11.9	-	-	-
-	2.93	-	23.2	-	-	-
-	2.95	-	19.9	-	-	-
-	3.03	9.6	5.7	7.2	12.5	-
-	3.07	-	23.0	-	26.2	-
-	3.24	-	6.6	9.1	-	36.0

**Tabla 24.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas referidas al patrón interno de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de pisco.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.67	-	7.1	14.7	-	-
-	0.68	-	14.9	-	-	-
-	0.71	-	8.9	2.7	18.5	9.1
-	0.76	-	18.1	-	-	-
1-Hexanol	0.78	18.2	5.8	20.9	-	-
-	0.83	-	21.2	45.2	-	-
-	0.87	-	16.5	10.3	39.0	-
-	0.89	-	21.2	14.8	22.1	-
Lactato de etilo + cis-3-hexen-1-ol	0.94	9.45	6.5	4.2	8.5	16.7
-	0.96	-	21.0	4.7	-	-
-	0.98	-	8.9	9.1	-	-
-	1.04	-	5.0	-	-	-
-	1.08	-	29.0	-	-	-
-	1.09	-	3.2	5.2	6.3	12.6
-	1.11	14.3	4.2	2.2	10.9	29.2
Acido acético + benzaldehído	1.15	13.1	14.4	16.0	11.8	25.0
-	1.19	14.3	-	-	6.0	-
-	1.31	-	6.4	7.0	-	-
Acido propanoico	1.33	15.4	10.0	10.0	8.0	9.7
-	1.36	-	4.2	7.3	-	-
-	1.38	-	4.0	9.9	-	-
-	1.40	7.21	11.3	7.3	-	-
Linalol	1.44	3.32	0.8	2.3	7.8	11.5
-	1.47	-	18.9	14.7	-	-
-	1.48	-	9.2	6.3	-	-

Continúa

Tabla 24. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
Decanoato de etilo	1.50	15.6	9.4	3.7	7.0	-
γ-Butirolactona	1.52	11.0	14.9	22.5	-	-
Acido butanóico	1.55	13.0	18.4	-	-	-
Succinato Diet.	1.57	7.1	2.2	3.2	26.9	30.2
α-Terpineol	1.59	6.3	3.8	1.8	15.4	10.4
-	1.61	-	4.5	14.6	-	-
-	1.65	14.7	10.5	-	-	-
-	1.66	8.1	2.8	9.1	-	-
-	1.71	-	8.8	11.6	-	-
-	1.72	11.2	2.9	2.6	21.9	-
-	1.74	2.5	30.1	-	-	-
-	1.76	17.1	20.8	-	-	-
-	1.77	-	8.6	2.9	-	-
-	1.79	18.8	6.4	11.2	22.5	-
-	1.81	-	-	5.7	-	-
-	1.84	4.1	1.8	5.9	7.7	-
-	1.86	-	2.9	-	8.7	-
Acido hexanoico	1.87	6.9	2.2	19.2	11.2	-
Bencilalcohol	1.91	7.1	4.2	3.3	-	-
-	1.94	-	3.6	5.5	-	-
2-Feniletanol	1.97	3.1	2.2	3.1	14.4	18.6
-	1.99	12.2	10.3	-	-	-
-	2.01	3.5	-	-	-	-
-	2.03	15.7	9.4	9.0	-	-
-	2.05	-	-	38.4	-	-
-	2.07	12.8	-	-	-	-
-	2.09	7.4	8.9	18.8	-	-

Continúa

Tabla 24. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	2.13	-	30.5	18.2	-	-
-	2.14	-	5.3	-	-	-
-	2.16	4.7	9.3	-	-	-
-	2.17	11.9	0.4	11.2	13.7	25.6
-	2.19	-	16.9	-	-	-
Acido octanoico	2.24	3.6	1.9	3.5	19.0	-
-	2.25	-	-	-	22.0	-
-	2.26	12.2	-	-	-	-
-	2.28	29.4	-	-	-	-
-	2.30	7.8	-	-	-	-
-	2.35	15.5	-	-	-	-
Hexadecanoato de etilo	2.40	5.4	11.2	-	-	-
Acido decanoico	2.50	8.4	2.5	4.0	13.3	22.4
-	2.53	15.3	-	-	-	-
-	2.63	11.4	14.2	-	-	-
-	2.68	7.0	-	34.0	-	41.1
-	2.74	9.6	-	-	-	-
-	2.84	-	83.7	-	-	-
-	2.86	-	11.1	-	-	-
-	2.90	-	13.3	-	-	-
-	2.93	-	24.8	-	-	-
-	2.95	-	21.9	-	-	-
-	3.03	5.3	1.4	5.6	11.6	-
-	3.07	-	19.7	-	28.3	-
-	3.24	-	2.8	5.3	-	36.3

**Tabla 25.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas absolutas de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de vino.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.65	-	-	32.2	-	-
-	0.66	14.7	8.0	23.5	13.1	7.1
-	0.78	-	13.3	-	-	-
-	0.84	-	16.1	-	18.2	10.3
-	0.87	-	18.1	-	15.3	8.3
-	0.89	-	-	33.5	-	-
Lactato de etilo + cis-3-hexen-1-ol	0.93	4.5	15.8	38.5	16.1	14.4
-	0.96	-	-	43.0	-	-
-	0.98	-	25.4	47.4	-	21.1
Octanoato de metilo (P.I.)	1.00	-	9.1	39.7	14.4	10.8
-	1.09	10.1	11.1	37.0	16.5	17.0
Acido acético	1.17	16.3	15.9	40.2	-	-
-	1.24	-	25.1	40.7	-	-
Acido propanoico	1.27	8.1	20.8	34.5	12.7	17.0
-	1.29	25.5	-	-	-	-
-	1.32	9.6	11.4	20.6	14.5	10.8
Linalol	1.34	10.1	17.2	37.6	-	-
-	1.38	-	11.3	16.9	-	-
-	1.40	5.7	24.1	44.5	-	-
-	1.43	12.1	18.7	32.4	-	-
-	1.46	12.6	24.6	41.0	-	-
-	1.48	-	15.4	-	-	-
γ-Butirolactona	1.49	14.7	19.8	39.2	-	-
-	1.51	-	15.3	-	-	-
Acido butanoico	1.52	16.2	20.6	41.9	-	-
-	1.55	-	10.2	-	-	-

Continúa

Tabla 25. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
$\alpha$ -Terpineol	1.59	10.7	10.8	38.0	15.5	14.7
-	1.61	30.3	22.5	35.1	-	-
-	1.66	9.9	15.7	41.6	-	-
-	1.71	-	13.3	-	-	-
-	1.72	-	7.9	-	-	-
-	1.73	11.8	-	-	-	-
-	1.76	10.6	-	42.6	-	-
-	1.77	22.1	9.7	59.2	-	-
-	1.79	15.1	14.8	39.2	-	-
-	1.83	-	15.7	33.7	-	-
-	1.86	6.2	12.9	-	-	-
Acido hexanoico	1.90	15.5	13.3	31.7	28.7	-
-	1.92	12.1	-	-	-	-
Bencilalcohol	1.94	7.4	14.4	30.5	-	-
-	1.96	-	13.3	-	-	-
-	1.99	-	8.9	-	-	-
2-Feniletanol	2.01	5.7	11.7	38.0	20.2	14.8
-	2.03	10.8	-	-	-	-
-	2.05	7.4	-	-	-	-
-	2.11	14.3	12.5	32.7	-	-
-	2.13	26.0	-	-	-	-
-	2.14	12.4	-	-	-	-
-	2.16	31.3	20.2	43.3	-	-
-	2.17	14.8	8.5	22.6	-	-
-	2.19	8.0	11.2	39.1	21.5	-
Acido octanoico	2.22	25.1	13.8	30.4	-	-
-	2.25	5.76	11.2	38.6	15.7	9.9
-	2.27	-	19.5	37.5	-	-
-	2.31	12.5	-	37.1	-	-
-	2.35	15.3	12.4	37.8	-	-
-	2.37	6.4	-	-	-	-
-	2.39	-	-	32.5	-	-

Continúa

Tabla 25. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
Hexadecanoato de etilo	2.40	12.6	11.3	20.1	-	-
-	2.41	18.7	-	-	-	-
-	2.42	17.7	-	-	-	-
-	2.43	-	-	61.7	-	-
-	2.44	24.0	12.4	39.1	-	-
Acido decanoico	2.46	19.8	12.9	49.2	-	-
-	2.52	15.6	12.4	41.0	-	-
-	2.57	21.5	11.2	40.9	-	-
-	2.59	-	-	36.4	-	-
-	2.63	28.2	16.4	19.5	-	-
-	2.68	-	18.4	-	-	-
-	2.79	17.7	12.2	37.3	-	-
-	2.87	-	14.4	33.6	-	-
-	2.92	-	-	45.8	-	-
-	3.11	-	14.8	40.4	14.9	19.9
-	3.20	-	-	51.3	-	-
-	3.40	-	-	42.6	-	-
-	3.45	-	-	41.5	-	-
-	3.65	-	-	52.0	-	-

**Tabla 26.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas normalizadas de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de vino.

(TRR:Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.65	-	-	10.4	-	-
-	0.66	8.8	6.42	24.6	6.1	10.5
-	0.78	-	3.3	-	-	-
-	0.84	-	10.5	-	17.2	7.2
-	0.87	-	13.2	-	10.8	5.97
-	0.89	-	-	12.4	-	-
Lactato de etilo + cis-3-hexen-1-ol	0.93	14.6	8.5	8.7	9.2	10.8
-	0.96	-	-	9.5	-	-
-	0.98	-	19.2	28.6	-	18.7
Octanoato de metilo (P.I.)	1.00	-	5.0	4.0	11.9	11.3
-	1.09	22.4	4.2	8.5	13.9	17.8
Acido acético	1.17	13.6	12.0	8.6	-	-
-	1.24	-	17.9	17.6	-	-
Acido propanoico	1.27	12.9	18.1	4.4	5.7	11.9
-	1.29	19.9	-	-	-	-
-	1.32	18.1	3.9	20.5	13.7	10.2
Linalol	1.34	8.7	11.9	6.5	-	-
-	1.38	-	3.7	28.5	-	-
-	1.40	16.5	12.9	10.6	-	-
-	1.43	9.2	16.9	8.4	-	-
-	1.46	11.9	17.6	5.9	-	-
-	1.48	-	8.3	-	-	-
γ-Butirolactona	1.49	3.0	14.7	11.8	-	-
-	1.51	-	10.3	-	-	-
Acido butanoico	1.52	13.2	9.1	8.5	-	-
-	1.55	-	9.3	-	-	-

Continúa

Tabla 26. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
$\alpha$ -Terpineol	1.59	17.4	3.7	5.1	11.2	8.3
-	1.61	17.5	20.1	34.0	-	-
-	1.66	7.0	6.71	6.9	-	-
-	1.71	-	6.5	-	-	-
-	1.72	-	7.1	-	-	-
-	1.73	16.4	-	-	-	-
-	1.76	12.3	-	12.0	-	-
-	1.77	10.1	16.1	37.3	-	-
-	1.79	9.3	5.2	12.2	-	-
-	1.83	-	5.0	6.6	-	-
-	1.86	11.6	4.7	-	-	-
Acido hexanoico	1.90	20.7	5.0	13.7	32.8	-
-	1.92	20.8	-	-	-	-
Bencilalcohol	1.94	14.3	3.9	2.7	-	-
-	1.96	-	3.9	-	-	-
-	1.99	-	7.7	-	-	-
2-Feniletanol	2.01	10.2	3.4	5.5	17.6	16.9
-	2.03	14.0	-	-	-	-
-	2.05	16.4	-	-	-	-
-	2.11	19.8	5.0	13.4	-	-
-	2.13	12.2	-	-	-	-
-	2.14	10.6	-	-	-	-
-	2.16	19.8	10.1	10.3	-	-
-	2.17	12.1	13.3	12.0	-	-
-	2.19	15.3	4.8	6.3	20.9	-
Acido octanoico	2.22	11.8	3.1	12.7	-	-
-	2.25	12.6	4.6	6.26	13.3	6.1
-	2.27	-	16.7	10.8	-	-
-	2.31	11.3	-	20.3	-	-
-	2.35	9.1	9.8	9.0	-	-
-	2.37	14.7	-	-	-	-
-	2.39	-	-	7.8	-	-

Continúa

Tabla 26. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
Hexadecanoato de etilo	2.40	7.0	5.1	24.2	-	-
-	2.41	16.5	-	-	-	-
-	2.42	8.0	-	-	-	-
-	2.43	-	-	26.6	-	-
-	2.44	12.9	3.8	12.5	-	-
Acido decanoico	2.46	6.8	4.9	20.5	-	-
-	2.52	3.9	2.4	7.0	-	-
-	2.57	10.9	3.8	10.0	-	-
-	2.59	-	-	18.6	-	-
-	2.63	31.2	17.3	28.3	-	-
-	2.68	-	12.1	-	-	-
-	2.79	3.8	4.1	3.6	-	-
-	2.87	-	24.9	7.2	-	-
-	2.92	-	-	14.0	-	-
-	3.11	-	16.8	5.8	22.5	21.2
-	3.20	-	-	26.0	-	-
-	3.40	-	-	9.0	-	-
-	3.45	-	-	18.1	-	-
-	3.65	-	-	16.0	-	-

**Tabla 27.** Coeficientes de variación (%) (n = 6) de las áreas referidas al patrón interno de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas de vino.

(TRR: Tiempo de retención relativo al patrón interno. ID: Inyección directa. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	0.65	-	-	10.7	-	-
-	0.66	14.7	4.0	26.4	6.54	18.0
-	0.78	-	7.9	-	-	-
-	0.84	-	9.4	-	10.7	16.8
-	0.87	-	14.2	-	7.85	5.5
-	0.89	-	-	15.6	-	-
Lactato de etilo + cís-3-hexen-1-ol	0.93	4.1	11.4	11.1	13.6	14.6
-	0.96	-	-	9.8	-	-
-	0.98	-	23.1	31.1	-	15.4
-	1.09	10.1	2.1	12.4	4.54	7.2
Acido acético	1.17	16.3	15.0	10.4	-	-
-	1.24	-	21.7	19.3	-	-
Acido propanoico	1.27	8.1	19.2	5.5	7.45	11.7
-	1.29	25.5	-	-	-	-
-	1.32	9.6	2.8	23.4	17.2	12.6
Linalol	1.34	10.1	14.7	9.0	-	-
-	1.38	-	2.4	33.3	-	-
-	1.40	5.71	16.7	10.7	-	-
-	1.43	12.1	19.2	11.6	-	-
-	1.46	12.6	22.0	8.5	-	-
-	1.48	-	10.5	-	-	-
γ-Butirolactona	1.49	14.7	18.8	13.9	-	-
-	1.51	-	9.0	-	-	-
Acido butanoico	1.52	16.2	13.2	8.8	-	-
-	1.55	-	9.8	-	-	-
α-Terpineol	1.59	10.7	2.0	3.2	21.7	20.2

Continúa

Tabla 27. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
-	1.61	30.3	20.0	38.0	-	-
-	1.66	9.9	11.0	7.1	-	-
-	1.71	-	8.9	-	-	-
-	1.72	-	5.6	-	-	-
-	1.73	11.8	-	-	-	-
-	1.76	10.6	-	12.3	-	-
-	1.77	22.1	15.1	36.4	-	-
-	1.79	15.1	8.0	12.0	-	-
-	1.83	-	9.2	6.8	-	-
-	1.86	6.2	6.0	-	-	-
Acido hexanoico	1.90	15.5	4.2	17.8	30.4	-
-	1.92	12.1	-	-	-	-
Bencilalcohol	1.94	7.4	7.1	1.9	-	-
-	1.96	-	6.2	-	-	-
-	1.99	-	4.6	-	-	-
2-Feniletanol	2.01	5.7	2.9	3.5	24.0	24.6
-	2.03	10.8	-	-	-	-
-	2.05	7.4	-	-	-	-
-	2.11	14.3	4.3	17.9	-	-
-	2.13	26.0	-	-	-	-
-	2.14	12.4	-	-	-	-
-	2.16	31.3	14.2	10.7	-	-
-	2.17	14.8	13.1	13.0	-	-
-	2.19	8.05	2.2	3.9	30.4	-
Acido octanoico	2.22	25.1	5.7	17.2	-	-
-	2.25	5.7	2.2	4.1	23.7	13.1
-	2.27	-	13.8	10.4	-	-
-	2.31	12.5	-	19.4	-	-
-	2.35	15.3	6.1	8.3	-	-
-	2.37	6.4	-	-	-	-
-	2.39	-	-	8.8	-	-

Continúa

Tabla 27. Continuación.

IDENTIFICACION	TRR	ID	LLCI	LLCE	SDEC	SDESC
Hexadecanoato de etilo	2.40	12.6	2.4	25.5	-	-
-	2.41	18.7	-	-	-	-
-	2.42	17.7	-	-	-	-
-	2.43	-	-	23.9	-	-
-	2.44	24.0	3.4	14.5	-	-
Acido decanoico	2.46	19.8	7.7	18.9	-	-
-	2.52	15.6	4.1	5.3	-	-
-	2.57	21.5	3.2	8.2	-	-
-	2.59	-	-	19.0	-	-
-	2.63	28.2	16.5	30.2	-	-
-	2.68	-	14.0	-	-	-
-	2.79	17.7	7.8	7.0	-	-
-	2.87	-	22.2	10.8	-	-
-	2.92	-	-	12.7	-	-
-	3.11	-	16.8	7.3	27.0	31.6
-	3.20	-	-	27.2	-	-
-	3.40	-	-	9.7	-	-
-	3.45	-	-	16.8	-	-
-	3.65	-	-	14.5	-	-

Cuando se estima la repetibilidad en base al área de cada pico dividida por la del patrón interno (Tabla 24), los resultados son similares a los de las áreas normalizadas. En el caso de la inyección directa, los coeficientes de variación obtenidos son idénticos a los resultantes cuando se consideran las áreas absolutas, ya que el patrón no pudo ser añadido a la muestra y se cromatografió por separado.

En los replicados del vino, la introducción directa y la extracción líquido-líquido con concentración interna proporcionan valores similares, mientras que la extracción líquido-líquido con concentración externa presenta los valores de coeficientes de variación más elevados.

Según se puede apreciar comparando la Tabla 26 con la 25, los coeficientes de variación de las áreas normalizadas son en general menores que los de las áreas absolutas en la introducción directa. Sin embargo, en la extracción líquido-líquido con concentración tanto interna como externa, la disminución de la variabilidad del análisis es evidente, siendo la primera modalidad de concentración citada la que proporciona los coeficientes de variación más bajos. En lo que se refiere a las SDE también se observa una cierta disminución en la precisión alcanzable cuando se utilizan áreas normalizadas.

Si se consideran áreas referidas al patrón interno (Tabla 27), los coeficientes de variación obtenidos son, en la mayoría de los casos, mayores que los correspondientes a las áreas normalizadas.

Como resumen de las características observadas en el desarrollo del análisis del aroma de vino y pisco mediante las cinco técnicas comparadas en este capítulo, en la Figura 68 se representan valores estimativos del tiempo de análisis, volumen de muestra, sensibilidad y precisión que, en términos generales, corresponden a las citadas técnicas. Se puede observar que el método de introducción directa de la muestra que se propone en esta Memoria, es un procedimiento de sensibilidad y precisión muy satisfactorias en relación con las proporcionadas por otras técnicas habitualmente empleadas. Además, su uso supone un evidente ahorro de tiempo, incluso cuando se compara con una técnica relativamente rápida como es la destilación y extracción simultáneas en su versión micro. Otra ventaja destacable del método propuesto es el hecho de que el volumen de muestra necesario para el análisis es claramente inferior al requerido cuando se aplica cualquiera de los restantes métodos evaluados, y muy especialmente la extracción líquido-líquido.

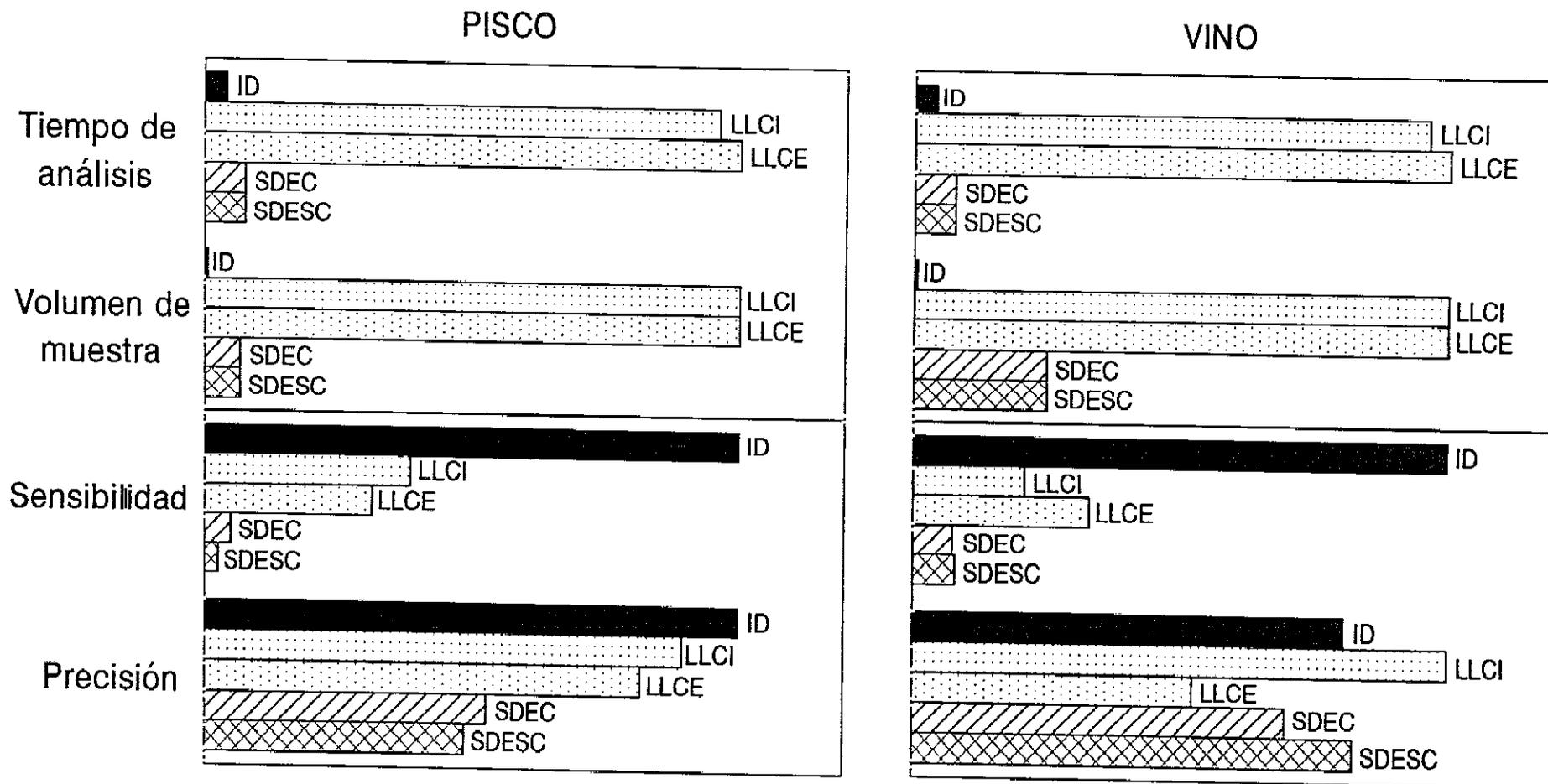


Figura 68. Estimación del tiempo de análisis, volumen de muestra, sensibilidad y precisión del análisis por inyección directa de pisco y vino en relación a otras técnicas de aislamiento y concentración de compuestos volátiles. (ID: Inyección directa de la muestra. LLCI: Extracción Líquido-Líquido y concentración interna. LLCE: Extracción Líquido-Líquido y concentración externa. SDEC: Destilación y Extracción Simultáneas concentrando el extracto. SDESC: Destilación y Extracción Simultáneas sin concentrar el extracto).

# CONCLUSIONES

1. La concentración interna del extracto líquido-líquido con Freon 11 se puede llevar a cabo en un Vaporizador con Temperatura Programada (PTV), realizando la inyección en frío con eliminación selectiva del disolvente y utilizando un adsorbente adecuado como relleno del "glass liner".

2. La exactitud y la precisión del análisis mediante el proceso de Extracción Líquido-Líquido con Freon 11, concentración del extracto y Cromatografía de Gases son, en general, mayores cuando la concentración se realiza en un PTV que cuando se realiza por calefacción externa.

3. La inyección directa de la muestra para el análisis de compuestos traza se puede realizar colocando un adsorbente adecuado en el "glass liner", introduciendo lentamente un elevado volumen de muestra mientras circula una corriente de gas inerte a través del inyector de modo que se logre la eliminación selectiva del disolvente.

4. El empleo de diseños experimentales, en particular el propuesto por Box y Hunter y el Simplex Modificado, permite optimizar las variables del método de análisis por inyección directa de compuestos presentes en cantidades traza usando un inyector PTV.

5. El uso del diseño compuesto, central y rotativo propuesto por Box y Hunter demuestra que la influencia de cada variable de la introducción directa en el valor de la respuesta medida (sensibilidad y exactitud del análisis) puede depender del nivel al que se encuentran las restantes variables (interacción). Además, la influencia de las variables estudiadas en la respuesta es característica de cada soluto analizado.

6. El empleo del método Simplex Modificado permite optimizar el análisis de volátiles en baja concentración, mediante inyección directa empleando un PTV, poniendo de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre la sensibilidad del método y dos variables: el porcentaje de GasChrom 220 empleado en el adsorbente y la longitud total de este último en el "glass-liner"; existe además una correlación negativa con la temperatura inicial del PTV.

En las condiciones experimentales optimizadas el método es fiable en cuanto a recuperación y precisión y permite la determinación directa de solutos presentes en la muestra en concentraciones de hasta 100 ng/L.

7. El empleo de un PTV permite el análisis por inyección directa de componentes minoritarios de muestras reales (vino y pisco) con mejor precisión y menores pérdidas de volátiles que por otros métodos clásicos de análisis, como la Extracción Líquido-Líquido y la Destilación y Extracción Simultáneas.

# CONCLUSION GENERAL

El análisis de compuestos volátiles que se encuentran en concentraciones traza en muestras líquidas, se puede llevar a cabo por inyección directa de la muestra en un cromatógrafo de gases con columnas capilares empleando un inyector PTV, sin que se requiera la etapa de aislamiento y concentración previa comúnmente utilizada.

El método propuesto en esta Memoria presenta las siguientes ventajas frente a otros métodos de análisis habitualmente empleados:

- Su ejecución es más rápida y más sencilla.
- Requiere el empleo de menor volumen de muestra.
- No es necesario emplear disolventes, con lo que se evitan contaminaciones, particularmente graves en el caso del Freon 11.
- La sensibilidad y precisión son, en general, superiores.

# BIBLIOGRAFIA

Alexandrou, N., Miao, Z., Colquhoun, M., Pawliszyn, J. y Jennison, C. (1.992). Supercritical Fluid Extraction and Cleanup with Capillary GC-Ion Trap Mass Spectrometry for Determination of Polychlorinated Dibenzop-dioxins and Dibenzofurans in Environmental Samples. *J. Chromatogr. Sci.* 30, 351-357.

Andersen, M.R., Swanson, J.T, Porter, N.L. y Richter, B.E. (1.989). Supercritical Fluid Extraction as a Sample Introduction Method for Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 27, 371-377.

Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. y Drawert, F. (1.986). Identification and Determination of Volatile Constituents in Wines from Different Vine Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 37, 927-943.

Baykut, G. y Voigt, A. (1.992). Spray Extraction of Volatile Organic Compounds from Aqueous Systems into the Gas Phase for Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 64, 677-681.

Bayer, C.W., Black, M.S. y Galloway, L.M. (1.988). Sampling and Analysis Techniques for Trace Volatile Organic Emissions from Consumer Products. *J. Chromatogr. Sci.* 26, 168-173.

Bayne, C.K. y Rubin, I.B. (1.986). Practical Experimental Designs and Optimization Methods for Chemists. Ed. VCH Publishers. Deerfield Beach. Florida. U.S.A., 105-170.

Berridge, J.C. (1.982). Unattended Optimization of Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separations Using the Modified Simplex Algorithm. *J. Chromatogr.* 244, 1-14.

- Bhuchar, V.M. y Agrawal, A.K. (1.981). Multi-purpose Automatic Solvent Extractor. *Analyst* 106, 620-624.
- Bianchi, A.P., Varney, M.S. y Phillips, J. (1.991). Analysis of Industrial Solvent Mixtures in Water Using a Miniature Purge-and-Trap Device with Thermal Desorption and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* 557, 429-439.
- Bicking, M.K.L. (1.992). A Simplified Experimental Design Approach to Optimization of SFE Conditions for Extraction of an Amine Hydrochloride. *J. Chromatogr. Sci.* 30, 358-360.
- Blanch, G.P., Reglero, G., Herraiz, M. y Tabera, J. (1.991). A Comparison of Different Extraction Methods for the Volatile Components of Grape Juice. *J. Chromatogr. Sci.* 29, 11-15.
- Blanch, G.P., Tabera, J., Herraiz, M. y Reglero, G. (1.993). Preconcentration of Volatile Components of Food: Optimization of the Steam Distillation-Solvent Extraction at Normal Pressure. *J. Chromatogr.* 628, 261-268.
- Boland, W., Ney, P., Jaenicke, L. y Gassman, G. (1.984). A "Closed-Loop-Stripping" Technique as a Versatile Tool for Metabolic Studies of Volatiles. En "Analysis of Volatiles". Schreier, P. (Ed.) W. de Gruyter. Berlin. 371-380.
- Bolzoni, L., Careri, M. y Mangia, A. (1.990). Characterization of Volatile Components in Apricot Purées by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* 518, 221-229.
- Box, G.E.P. y Hunter, J.S. (1.957). Multifactor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. *Ann. Math. Stat.* 28, 195-241.

- Box, G.E.P., Hunter, W.G. y Hunter, J.S. (1.988). "Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos". Ed. Reverté. 525-554.
- Burgasser, A.J. y Colaruotolo, J.F. (1.979). Extraction of Semi and Nonvolatile Chlorinated Organic Compounds from Water. Anal. Chem. 51, 1588-1589.
- Burgess, D.D. y Hayumbu, P. (1.984). Simplex Optimization by Advance Prediction for Single-Element Instrumental Neutron Activation Analysis. Anal. Chem. 56, 1440-1443.
- Burtis, C.A., Bostick, W.D., Overton, J.B. y Mrochek, J.E. (1.981). Optimization of a Kinetic Method by Response Surface Methodology and Centrifugal Analysis and Application to the Enzimatic Measurement of Ethanol. Anal. Chem. 53, 1154-1159.
- Cabezudo, M.D. (1.984). Cromatografía: Términos y definiciones. C.T.A. 5, 16-22.
- Cabezudo, M.D. (1.990). Nomenclatura. C.T.A. 11, 90-97.
- Chubb, F.L., Edward, J.T. y Wong, S.C. (1.980). Simplex Optimization of Yields in the Bucherer-Bergs Reaction. J. Org. Chem. 45, 2315-2320.
- Churáček, J., Pechová, H., Horna, A., Kotrla, R. y Ventura, K. (1.991). Chromatographic Trace Analysis of Some Organic Compounds in the Environment Using Derivatization-Sorption Concentration Techniques. I. Gas Chromatographic Analysis of Acrylates in Air. J. Chromatogr. 557, 523-530.

Cobb, C. y Bursey, M. (1.978). Comparison of Extracting Solvents for Typical Volatile Components of Eastern Wines in Model Aqueous-Alcoholic Systems. J. Agric. Food Chem. 26, 197-199.

Cole, R.A. (1.980). The Use of Porous Polymers for the Collection of Plant Volatiles. J. Sci. Food Agric. 31, 1242-1249.

Coleman, W.M. (1.992). Automated Purge-and-Trap-Gas Chromatography Analysis of Headspace Volatiles from Natural Products. J. Chromatogr. Sci. 30, 159-163.

Crist, H.L. y Mitchell, W.J. (1.986). Field Audit Results with Organic Gas Standards with Organic Ambient Air Samplers Equipped with Tenax GC. Environ. Sci. Technol. 20, 1260-1262.

Deming, S.N. y Morgan, S.L. (1.973). Simplex Optimization of Variables in Analytical Chemistry. Anal. Chem. 45, 278A-283A.

Di Stefano, R. (1.985). Studio della composizione chimica e dei composti volatile del Marsala vergine. Vignevine 12, 39-46.

Dowty, B.J., Green, L.E. y Laseter, J.L. (1.976). Automated Gas Chromatographic Procedure to Analyze Volatile Organics in Water and Biological Fluids. Anal. Chem. 48, 946-949.

Drozd, J., Novák, J. y Rijks, J.A. (1.978). Quantitative and Qualitative Headspace Gas Analysis of Parts per Billion Amounts of Hidrocarbons in Water. A Study of Model Systems by Capillary-Column Gas Chromatography with Splitless Sample Injection. J. Chromatogr. 158, 471-482.

**Drozd, J. y Novák, J.** (1.979). Headspace Gas Analysis by Gas Chromatography. *J. Chromatogr.* 165, 141-165.

**Eder, K., Reichlmayr-Lais, A.M. y Kirchgessner, M.** (1.991). Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters: Avoiding Discrimination by Programmed Temperature Vaporizing Injection. *J. Chromatogr.* 588, 265-272.

**Etievant, P.X. y Bayonove, C.L.** (1.983). Aroma Components of Pomaces and Wine from the Variety Muscat de Frontignan. *J. Sci. Food Agric.* 34, 393-403.

**Fagan, G.L., Kepner, R.E. y Webb, A.D.** (1.982). Additional Volatile Components of Palomino Film Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 47-50.

**Fauhl, C. y Wittkowski, R.** (1.992). Determination of Ethyl Carbamate in Wine by GC-SIM-MS after Continuous Extraction with Diethylether. *HRC* 15 203-205.

**Flath, R.A. y Forrey, R.R.** (1.977). Volatile Components of Papaya (*Carica Papaya L.*, Solo Variety). *J. Agric. Food Chem.* 25, 103-109.

**Flath, R.A., Light, D.M., Jang, E.B., Mon, T.R. y John, J.O.** (1.990). Headspace Examination of Volatile Emissions from Ripening Papaya (*Carica Papaya L.*, Solo Variety). *J. Agric. Food Chem.* 38, 1060-1063.

**Gagliardi, P. y Verga, G.R.** (1.982). Automatic Direct Headspace GC Analysis of Flavors with Capillary Columns and Multidetector Systems. in "Chemistry of Foods and Beverages: Recent Developments". Charalambous, G. e Inglett, G. (Ed.). Academic Press. New York 49-72.

Galli, M., Trestianu, S., y Grob Jr., K. (1.979). Special Cooling System for the on Column Injector in Capillary Gas Chromatography Eliminating Discrimination of Sample Compounds. HRC & CC 2, 366-370.

Galli, M., Trestianu, S. (1.981). Benefits of a Special Cooling System to Improve Precision and Accuracy in non-Vaporizing On-Column Injection Procedures. J. Chromatogr. 203, 193-205.

Godefroot, M., Sandra, P. y Verzele, M. (1.981). New Method for Quantitative Essential Oil Analysis. J. Chromatogr. 203, 325-335.

Godefroot, M., Stechele, M. Sandra, P. y Verzele, M. (1.982). A New Method for the Quantitative Analysis of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls. HRC & CC 5, 75-79.

Goldberg, M.C. y Weiner, E.R. (1.980). Extraction and Concentration of Phenolic Compounds from Water and Sediment. Anal. Chim. Acta 115, 373-378.

González, M. (1.986). Volátiles minoritarios de los vinos españoles. Caracterización de los principales vinos procedentes de uvas tintas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 25-61.

Granier, C. y Brasseur, C. (1.992). La capa de ozono víctima de las partículas atmosféricas. Mundo científico 12, 274-277.

Grimmer, G., Jacob, J., Naujack, K.W. y Dettbarn, G. (1.983). Determination of Polycyclic Aromatic Compounds Emitted from Brown-Coal-Fired Residential Stoves by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem. 55, 892-900.

Grob, K. y Grob, G. (1.969a). Splitless Injection on Capillary Columns. Part I, The Basic Technique; Steroids Analysis as an Example. J. Chromatogr. Sci. 7, 584-586.

Grob, K. y Grob, G. (1.969b). Splitless Injection on Capillary Columns. Part II. Conditions and Limits. Practical Realisation. J. Chromatogr. Sci. Nº: 7, 587-591.

Grob, K. y Grob Jr., K. (1.974). Isothermal Analysis on Capillary Columns without Stream Splitting. The Role of the Solvent. J. Chromatogr. 94, 53-64.

Grob, K. y Zürcher, F. (1.976). Stripping of Trace Organic Substances from Water. Equipment and Procedure. J. Chromatogr. 117, 285-294.

Grob, K. y Grob Jr., K. (1.978). On-Column Injection onto Glass Capillary Columns. J. Chromatogr. 151, 311-320.

Grob Jr., K. y Neukom, H.P. (1.979). The Influence of the Syringe Needle on the Precision and Accuracy of Vaporizing GC Injections. HRC & CC 2, 15-21.

Grob Jr., K. y Rennhard, S. (1.980). Evaluation of Syringe Handling Techniques for Injections into Vaporizing GC Injectors. HRC & CC 3, 627-633.

Grob Jr., K. (1.982). "Band Broadening in Space" and the "Retention Gap" in Capillary Gas Chromatography. J. Chromatogr. 237, 15-23.

Grob Jr., K. (1.983a). Solvent Effects in Capillary GC. J. Chromatogr. 279, 225-232.

Grob Jr., K. (1.983b). Broadening of Peaks Eluted Before the Solvent in Capillary GC. Part 1: The Role of Solvent Trapping. *Chromatographia* 17, 357-360.

Grob Jr., K. y Schilling, B. (1.983). Broadening of Peaks Eluted before the Solvent in Capillary GC. Part 2: The Role of Phase Soaking. *Chromatographia* 17, 361-367.

Grob, K., (1.986). "Classical Split and Splitless Injection in Capillary Gas Chromatography". Hüthig, Heidelberg.

Grob, K., (1.990). PTV Vapor Overflow. Principles of a Solvent Evaporation Technique for Introducing Large Volumes in Capillary GC. *HRC & CC* 13, 540-546.

Grob, K. (1.991a). "On Line Coupled LC-GC". Hüthig. Heidelberg.

Grob, K. (1.991b). LC for Sample Preparation in Coupled LC-GC: A Review. *Chimia* 45, 109-113.

Grob, K. (1.992a). Sample Evaporation in Conventional GC Split/Splitless Injectors. Part 1: Some Quantitative Estimates Concerning Heat Consumption during Evaporation. *HRC* 15, 190-194.

Grob, K. y Martin, M.D. (1.992b). Sample Evaporation in Conventional GC Split/Splitless Injectors. Part 2: Use of Perylene for Visual Observation of Three Different Scenarios in Empty Injectors Inserts. *HRC* 15, 335-340.

Grob, K. y Martin, M.D. (1.992c). Sample Evaporation in Conventional GC Split/Splitless Injectors. Part 3: Retaining the Liquid in the Vaporizing Chamber. *HRC* 15, 399-403.

Grob, K., Brem, S. y Fröhlich, D. (1.992d). Splitless Injection of up to Hundreds of Microliters of Liquid Samples in Capillary GC. Part 1, Concept. HRC 15, 659-664.

Grob, K. y Brem, S. (1.992e). Splitless Injection of up to Hundreds of Microliters of Liquid Samples in Capillary GC. Part II, Experimental Results. HRC 15, 715-722.

Grob, K. y Fröhlich, D. (1.992f). Splitless Injection of Large Volumes: Improved Gas Regulation System. HRC 15, 812-814.

Hancock, J.R., McAndless, J.M. y Hicken, R.P. (1.991). A Solid Adsorbent Based System for the Sampling and Analysis of Organic Compounds in Air: An Application to Compounds of Chemical Defense Interest. J. Chromatogr. Sci. 29, 40-48.

Hardy, P.J. (1.969). Extraction and Concentration of Volatiles from Dilute Aqueous and Aqueous Alcoholic Solution Using Trichlorofluormethane. J. Agr. Food Chem. 17, 656-658.

Hardy, P.J. y Ramshaw, E.H. (1.970). Analysis of Minor Volatile Constituents of Wine. J. Sci. Food Agric. 21, 39-41.

Hawthorne, S.B. y Miller, D.J. (1.986). Extraction and Recovery of Organic Pollutants from Enviromental Solids and Tenax-GC Using Supercritical CO<sub>2</sub>. J. Chromatogr. Sci. 24, 258-264.

Hawthorne, S.B. y Miller, D.J. (1.987). Extraction and Recovery of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Environmental Solids Using Supercritical Fluids. Anal. Chem. 59, 1705-1708.

Hawthorne, S.B., Krieger, M.S. y Miller, D.J. (1.988). Analysis of Flavor and Fragrance Compounds Using Supercritical Fluid Extraction Coupled with Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 60, 472-477.

Hawthorne, S.B., Miller, D.J. y Krieger, M.S. (1.989). Coupled SFE-GC: A Rapid and Simple Technique for Extracting, Identifying, and Quantitating Organic Analytes from Solids and Sorbents Resins. *J. Chromatogr. Sci.* 27, 347-359.

Heath, H.B. y Reineccius, G. (1.986). "Flavor Chemistry and Technology". Ed. Macmillan Publishers. Westport. U.S.A. 3-42.

Herraiz, M. (1.980). Sustancias volátiles implicadas en las fermentaciones alcohólica y acética. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Herraiz, M., Reglero, G., Loyola, E. y Herrera, T. (1.987). Sampling of Volatile Components Using a PTV in the Solvent Split Mode. *HRC & CC* 10, 598-602.

Herraiz, M., Reglero, G. y Herrera, T. (1.989). Evaluation of a PTV Injector for Quantitative Analysis of Volatile Compounds at Low Concentrations. *HRC & CC* 12, 442-446.

Herraiz, M., Reglero, G., Herrera, T. y Loyola, E. (1.990). Analysis of Wine Distillates from Muscat Grapes (Pisco) by Multidimensional Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1540-1543.

Herraiz, T. (1.989). Formación de compuestos volátiles por distintas levaduras vínicas. Influencia del SO<sub>2</sub> y de los hollejos utilizados durante la fermentación. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Herraiz, T., Reglero, G., Martín-Alvarez, P.J., Herrera, M. y Cabezudo, M.D. (1.991). Identification of Aroma Components of Spanish "Verdejo" Wine. *J. Sci. Food Agric.* 55, 103-116.
- Hierro, M.T. y Santa-María, G. (1.992). Supercritical Fluid Extraction of Vegetable and Animal Fats with CO<sub>2</sub>. *Food Chem.* 45, 189-192.
- Higgins, C.E. y Guerin, M.R. (1.980). Recovery of Naphthalene During Evaporative Concentration. *Anal. Chem.* 52, 1984-1987.
- Hinshaw, J.V. (1.989). Large-Volume Injection in Capillary GC: Problems and Solutions. *LC-GC International* 2, 24-30.
- Ho, C.T., Lee, M.H. y Chang, S.S. (1.982). Isolation and Identification of Volatile Compounds from Roasted Peanuts. *J. Food Sci.* 47, 127-133.
- Ho, J.S. y Tang, H.P. (1.992). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Environmental Pollutants from a Liquid-Solid Extraction Cartridge. *J. Chromatogr. Sci.* 30, 344-350.
- Holderith, J., Tóth, T. y Váradi, A. (1.976). Minimizing the Time for Gas Chromatographic Analysis. Search of Optimal Operational Parameters by a Simplex Method. *J. Chromatogr.* 119, 215-222.
- Holzer, G., Oró, J. y Bertsch, W. (1.976). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Evaluation of Exhaled Tobacco Smoke. *J. Chromatogr.* 126, 711-785.
- Horvat, R.J., y Senter, S.D. (1.984). Identification of the Volatile Constituents from Scuppernong Berries (*Vitis Rotundifolia*). *J. Food Sci.* 49, 64-66 y 81.

Hsieh, O.A.L., Huang, A.S. y Chang, S.S. (1.982). Isolation and Identification of Objectionable Volatile Compounds in Defatted Soybean Flour. *J. Food Sci.* 47, 16-18.

Hu, H.C. y Weiner, P.H. (1.980). Modifications to Methods for Volatile Organic Analysis at Trace Levels. *J. Chromatogr. Sci.* 18, 333-342.

Hutte, R.S., Williams, E.J., Staehelin, J., Hawthorne, S.B., Barkeley, R.M. y Sievers, R.E. (1.984). Chromatographic Analysis of Organic Compounds in the Atmosphere. *J. Chromatogr.* 302, 173-179.

Ioffe, B.V. (1.984). New Applications of Gas Chromatographic Headspace Analysis. *J. Chromatogr.* 290, 363-375.

Jackson, W.P., Markides, K.E. y Lee, M.L. (1.986). Supercritical Fluid Injection of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Compounds in Capillary Supercritical Fluid Chromatography. *HRC & CC.* 9, 213-217.

Jennings, W.G. y Filsoof, M. (1.977). Comparison of Sample Preparation Techniques for Gas Chromatographic Analysis. *J. Agr. Food Chem.* 25, 440-445.

Jennings, W.G. (1.980). "Gas Chromatography with Glass Capillary Columns". 2nd ed. Academic Press. New York.

Jennings, W.G. y Rapp, A. (1.983). "Sample Preparation for Gas Chromatographic Analysis". Hüthig. Heidelberg.

Jeon, I.J., Reineccius, G.A. y Thomas, E.L. (1.976). Artifacts in Flavor Isolates Produced by Steam Vacuum Distillation and Solvent Extraction of the Distillate. *J. Agric. Food Chem.* 24, 433-434.

- Jursík, T., Stránský, K. y Ubik, K. (1.991). Trapping System for Trace Organic Volatiles. J. Chromatogr. 586, 315-322.
- Kallio, H. (1991). Method of Sensitive Analysis of Wine Headspace Volatiles Based on Selective Capillary Column Trapping. J. Chromatogr. 29, 438-443.
- Karasek, F.W., Clement, R.E. y Sweetman, J.A. (1981). Preconcentration for Trace Analysis of Organic Compounds. Anal. Chem. 53, 1050A-1058A.
- Kessels, H., Hoogerwerf, W. y Lips, J. (1992). The Determination of Volatile Organic Compounds from EPA Method 524.2 Using Purge-and-Trap Capillary Gas Chromatography, ECD and FID. J. Chromatogr. Sci. 30, 247-255.
- King, J.W., Johnson, J.H. y Friedrich, J.P. (1.989). Extraction of Fat Tissue from Meat Products with Supercritical Carbon Dioxide. J. Agric. Food Chem. 37, 951-954.
- Krejci, M., Roudná, M. y Vavrouch, Z. (1.974). Analysis of Non-Ionic Surfactants of the Alkylphenol Type in the Presence of Mineral Oil by Means of Liquid Chromatography. J. Chromatogr. 91, 549-556.
- Krost, K.J., Pellizari, E.D., Walburn, S.G. y Hubbard, S.A. (1.982). Collection and Analysis of Hazardous Organic Emissions. Anal. Chem. 54, 810-817.
- Lee, M.L. y Markides, K.E. (1.990). "Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction". Ed. Chromatography Conferences, Inc. Provo. Utah. 313-362.

Leenheers, L.H., Ravensberg, J.C., Kerstens, H.J. y Jongen, M.J.M. (1.992). Gas Chromatographic Determination of the Pesticide Dodemorph for Assessment of Occupational Exposure. *J. Chromatogr. Sci.* 30, 228-232.

Leggett, D.J. (1.983). Instrumental Simplex Optimization. Experimental Illustrations for an Undergraduate Laboratory Course. *J. Chem. Educ.* 60, 707-710.

Leoni, V., Puccetti, G. y Grella, A. (1.975). Preliminary Results on the Use of Tenax for the Extraction of Pesticides and Polynuclear Aromatic Hydrocarbons from Surface and Drinking Waters for Analytical Purposes. *J. Chromatogr.* 106, 119-124.

Leoni, V., Puccetti, G., Colombo, R.J. y D'Ovidio, A.M. (1.976). The Use of Tenax for the Extraction of Pesticides and Polychlorinated Biphenyls from Water. II. Test with Artificially Polluted and Natural Waters. *J. Chromatogr.* 125, 399-407.

Liebman, S.A., Levy, E.J., Lurcott, S., O'Neil, S., Guthrie, J., Ryan, T. y Yocklovich, S. (1.989). Integrated Intelligent Instruments: Supercritical Fluid Extraction, Desorption, Reaction, and Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 27, 118-126.

Likens, S.T. y Nickerson, G.B. (1.964). Detection of Certain Hop Oil Constituents in Brewing Products. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 5-13.

Lindberg, W., Johansson, E. y Johansson, E. (1.981). Application of Statistical Optimization Methods to the Separation of Morphine, Codeine, Noscapine and Papaverine in

Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography. *J. Chromatogr.* 211, 201-212.

Liška, I., Krupčík, J. y Leclercq, P.A. (1.989). The Use of Solid Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrices. A Review of Solid-Phase Extraction Techniques. *HRC & CC.* 12, 577-590.

Lökvist, P. y Jönsson, J.A. (1.987). Capacity of Sampling and Preconcentration Columns with a Low Number of Theoretical Plates. *Anal. Chem.* 59, 818-821.

Loyola, E., Herraiz, M., Reglero, G. y Martín-Alvarez, P.J. (1.987). Evaluation of a Programmed Temperature Vaporizer for Quantitative Analysis by Split Injection. *J. Chromatogr.* 398, 53-61.

Loyola, E., Martín-Alvarez, P.J., Herraiz, T., Reglero, G. y Herraiz, M. (1.989). A Contribution to the Study of the Volatile Fraction in Distillates of Wines Made from Muscat Grapes (Pisco). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190, 501-505.

Maarse, H. y Kepner, R.E. (1.970). Changes in Composition of Volatile Terpenes in Douglas Fir Needles During Maturation. *J. Agr. Food Chem.* 18, 1095-1101.

Maarse, H. y Belz, R. (1.985). "Isolation, Separation and Identification of Volatile Compounds in Aroma Research". D. Reidel Publishing Company. Dordrecht (Holland).

Maarse, H. y Visscher, C.A. (Eds.) (1.989). "Volatile Compound in Food. Alcoholic Beverages. Qualitative and Quantitative Data". TNO-CIVO Food Analysis Institute. Zeist (The Netherlands).

MacDonald, J. Reeve, P.T.V., Rudlesden, J.D. y White, F.H. (1.984). "Current Approaches to Brewery Fermentations. Progress in Industrial Microbiology. Modern Applications of Traditional Biotechnologies". Bushell (Ed.). Elsevier. Amsterdam. 47-198.

MacLeod, G. y Ames, J.M. (1.986). Comparative Assessment of the Artefact Background on Thermal Desorption of Tenax GC and Tenax TA. J. Chromatogr. 355, 393-398.

Maier, I. y Fieber, M. (1.988). Retention Characteristics of Volatile Compounds on Tenax TA. HRC & CC. 11, 566-576.

Marais, J. y Houtman, C. (1.979). Quantitative Gas Chromatographic Determination of Specific Esters and Higher Alcohols in Wine using Freon Extraction. Am. J. Enol. Vitic. 30, 250-252.

Marais, J. (1.983). Terpenes in the Aroma of Grapes and Wine: A Review. S. Afr. J. Enol. Vitic. 4, 49-60.

Marina, M.L. y Vera, S. (1.992). Cromatografía: Nuevos términos y definiciones. C.T.A. 13, 62

Martínez, I. y Sanz, J. (1.991). Cromatografía: Términos y definiciones. C.T.A. 12, 59

Matthews, R.J., Goode, S.R. y Morgan, S.L. (1.981). Characterization of an Enzymatic Determination of Arsenic (V) Based on Response Surface Methodology. Anal. Chim. Acta. 133, 169-182.

Mchugh, M. y Krukonis, V. (1.986). "Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice". Butterworths. London.

- McMinn, D.G., Eatherton, R.L. y Hill Jr., H. (1.984). Multiple Parameter Optimization of a Hydrogen-Atmosphere Flame Ionization Detector. *Anal. Chem.* 56, 1293-1298.
- Michael, L.C., Erickson, M.D., Parks, S.P. y Pellizzari, E.D. (1.980). Volatile Environmental Pollutants in Biological Matrices with a Headspace Purge Technique. *Anal. Chem.* 52, 1836-1841.
- Miller, R.L., Bills, D.D. y Buttery, R.G. (1.989). Volatile Components from Barlett and Bradford Pear Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1476-1479.
- Montaño, A., Sánchez, A.H. y Rejano, L. (1.990). Rapid Quantitative Analysis of Headspace Components of Green Olive Brine. *J. Chromatogr.* 521, 153-157.
- Montedoro, G. y Bertuccioli M. (1.986). The Flavour of Wines, Vermouth and Fortified Wines. *Developments in Food Science 3B. Food Flavours. Part B: The Flavour of Beverages.* Morton, I.D. & Macleod, A.J. (Eds.). Elsevier. Amsterdam, 171-237.
- Morgan, S.L. y Jacques, C.A. (1.978). Response Surface Evaluation and Optimization in Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 16, 500-505.
- Murray, K.E. (1.977). Concentration of Headspace, Airborne and Aqueous Volatiles on Chromosorb 105 for Examination by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* 135, 49-60.
- Murray, D.A.J. (1.979). Rapid Micro Extraction Procedure for Analyses of Trace Amounts of Organic Compounds in Water by Gas Chromatography and Comparisons with Macro Extraction Methods. *J. Chromatogr.* 177, 135-140.

Namiesnik, J., Torres, L., Kozlowski, E. y Mathieu, J. (1.981). Evaluation of the Suitability of Selected Porous Polymers for Preconcentration of Volatile Organic Compounds. J. Chromatogr. 208, 239-252.

Nelder, J.A. y Mead, R. (1.965). A Simplex Method for Function Minimization. Computer J. 7, 308-313.

Nestrick, T.J. y Lamparski, L.L. (1981). Purification of Cylinder Gases Used in Solvent Evaporation for Trace Analysis. Anal. Chem. 53, 122-124.

Nickerson, G.B. y Likens, S.T. (1.966). Gas Chromatographic Evidence for the Occurrence of Hop Oil Components in Beer. J. Chromatogr. 21, 1-5.

Nisperos-Carriedo, M.O. y Shaw, P.E. (1.990). Comparison of Volatile Flavor in Fresh and Processed Orange Juices. J. Agric. Food Chem. 38, 1048-1052.

Noble, A.N., Flath, R.A. y Forrey, R.R. (1.980). Wine Headspace Analysis. Reproducibility and Application to Varietal Classification. J. Agric. Food Chem. 28, 346-353.

Novotny, M., Lee, M.L. y Bartle, K.D. (1.974). Some Analytical Aspects of the Chromatographic Headspace Concentration Method Using a Porous Polymer. Chromatographia 7, 333-338.

Núñez, A.J. y Bemelmans, J.M.H. (1.984). Recoveries from an Aqueous Model System Using a Semi-Micro Steam Distillation-Solvent Extraction Procedure. J. Chromatogr. 294, 361-365.

Núñez, A.J., Bemelmans, J.M.H. y Maarse, H. (1.984a). Isolation Methods for the Volatile Components of Grapefruit Juice. Distillation and Solvent Extraction Methods. *Chromatographia* 18, 153-158.

Núñez, A.J., González, L.F. y Janák, J. (1.984b). Preconcentration of Headspace Volatiles for Trace Organic Analysis by Gas Chromatography. *J. Chromatogr.* 300, 127-162.

Núñez, A.J. y Maarse, H. (1.986). Headspace Methods for Volatile Components of Grapefruit Juice. *Chromatographia* 21, 44-48.

Nykänen, L. y Suomalainen, H. (1.983). "Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages". D. Reidel Publishing Company. Dordrecht. 1-413.

Nykänen, L. (1.986). Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 84-96.

Parliment, T.H. (1.986). "Sample Preparation Techniques for Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Biologically Derived Aromas. Biogeneration of Aromas". Parliment, T.H. y Croteau (Ed), R. (Ed.). American Chemical Society, 35-52.

Peters, T.L. (1.980). Steam Distillation Apparatus for Concentration of Trace Water Soluble Organics. *Anal. Chem.* 52, 211-213.

Peters, T.L. (1.982). Comparison of Continuous Extractors for the Extraction and Concentration of Trace Organics from Water. *Anal. Chem.* 54, 1913-1914.

Pickett, J.A., Coates, J. y Sharpe, F.R. (1.975). Distortion of Essential Oil Composition During Isolation by Steam Distillation. Chem. Ind. 13, 571-572.

Poole, C.F. y Schuette, S.A. (1.983). Isolation and Concentration Techniques for Capillary Column Gas Chromatographic Analysis. HRC & CC 6, 526-549.

Porter, N.L., Rynaski, A.F., Campbell, E.R., Saunders, M., Richter, B.E., Swanson, J.T., Nielsen, R.B. y Murphy, B.J. (1.992). Studies of Linear Restrictors and Analyte Collection Via Solvent after Supercritical Fluid Extraction. J. Chromatogr. Sci. 30, 367-373.

Poy, F., Visani, S. y Terrosi, F. (1.981). Automatic Injection in High-Resolution Gas Chromatography: A Programmed Temperature Vaporizer as a General Purpose Injection System. J. Chromatogr. 217, 81-90.

Poy, F., Visani, S. y Terrosi, F. (1.982). A Universal Sample Injection System for Capillary Column GC Using a Programmed Temperature Vaporizer (PTV). HRC & CC 5, 355-359.

Poy, F. (1.982). A New Temperature Programmed Injection Technique for Capillary GC: Split Mode with Cold Introduction and Temperature Programmed Vaporization. Chromatographia 16, 345-348.

Poy, F. y Cobelli, L. (1.985). Programmed Temperature Vaporizer (PTV) Injection. En "Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography. Vol. 1." Sandra, P. (Ed.). Hüthig, Heidelberg. 93-95.

**Pretorius, V., Lawson, K.H., Apps, P.J. y Bertsch, W.** (1.983). Solute Focusing by Means of the Solvent Effect: Formation of the Film. *J. Chromatogr.* 279, 233-240.

**Price, G.D. y Carlson, D.A.** (1.981). Controlled Rate Evaporator for Thousand-Fold Concentration. *Anal. Chem.* 53, 554-555.

**Przyjazny, A., Janicki, W., Dhrzanowski, W. y Staszewski, R.** (1.982). Simple Method for Determination of Breakthrough Volumes for Trace Concentration of Volatile Organic Compounds in Liquids. *J. Chromatogr.* 245, 256-260.

**Rapp, A., Hastrich, H. y Engel, L.** (1.976). Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. I. Anreicherung und Kapillarchromatographische Auftrennung. *Vitis* 15, 29-36.

**Rapp, A. y Knipser, W.** (1.980). Eine neue Methode zur Anreicherung von Dampfkomponten. Dargestellt am Beispiel des Weines. *Chromatographia* 13, 698-702.

**Reglero, G.** (1.985). Estudio sobre los distintos tipos de columnas para cromatografía de gases. Aportación al conocimiento de la relación naturaleza química/actividad sensorial de los componentes del aroma del vino. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

**Reglero, G., Herraiz, M., Herraiz, T. y Loyola, E.** (1.988). Comparison of the Performances of Hot and Cold Sample Introduction with a Programmed-Temperature Vaporizer in the Split and Splitless Modes. *J. Chromatogr.* 438, 243-251.

Reglero, G., Herraiz, T. y Herraiz, M. (1.990). Direct Headspace Sampling with On-Column Thermal Focusing in Capillary Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 28, 221-224.

Reglero, G. e Ibáñez, E. (1.992). Nomenclatura. *C.T.A.* 13, 3.

Rubin, I.B., Mitchel, T.J. y Goldstein, G. (1.971). A Program of Statistical Designs for Optimizing Specific Transfer Ribonucleic Acid Assay Conditions. *Anal. Chem.* 43, 717-721.

Rubin, I.B. y Bayne, C.K. (1.979). Statistical Designs for the Optimization of the Nitrogen-Phosphorus Gas Chromatographic Detector Response. *Anal. Chem.* 51, 541-546.

Rudolph, J., Müller, K.P. y Koppmann, R. (1.990). Sampling of Organic Volatiles in the Atmosphere at Moderate and Low Pollution Levels. *Anal. Chim. Acta* 236, 197-211.

Saito, M., Yamauchi, Y., Iomata, K. y Kottkamp, W. (1.989). Enrichment of Tocopherols in Wheat Germ by Directly Coupled Supercritical Fluid Extraction with Semipreparative Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 27, 79-85.

Sakodynskii, K., Panina, L. y Klinskaya, N. (1.974). A Study of Some Properties of Tenax, a Porous Polymer Sorbent. *Chromatographia* 7, 339-344.

Schamp, N. y Dirinck, P. (1.982). The Use of Headspace Concentration on Tenax for Objective Flavor Quality. Evaluation of Fresh Fruits (Strawberry and Apple). En "Chemistry of Foods and Beverages: Recent Developments". Charalambous, G. e Inglett, G. (Ed.). Academic Press. New York 25-47.

**Schnable, J.G., Dussert, B., Suffet, I.H. y Hertz, C.D.** (1.990). Comparison of Quarter-Hourly On-Line Dynamic Headspace Analysis to Purge-and-Trap Analysis of Varying Volatile Organic Compounds in Drinking Water Sources. *J. Chromatogr.* 513, 47-54.

**Schomburg, G., Behlau, H., Dielmann, R., Weeke, P. y Husmann, H.** (1.977). Sampling Techniques in Capillary Gas Chromatography. *J. Chromatogr.* 142, 87-102.

**Schomburg, G.** (1.981). Sampling Systems in Capillary Chromatography. Proceedings of the Fourth International Symposium on Capillary Chromatography. Kaiser, R.E., (Ed.) Hüthig, Heidelberg, 371-404.

**Schomburg, G., Husmann, H. y Rittmann, R.** (1.981). "Direct" (On-Column) Sampling into Glass Capillary Columns. Comparative Investigations on Split, Splitless and On-Column Sampling. *J. Chromatogr.* 204, 85-96.

**Schomburg, G.** (1.985). Temperature Programmed Sample Transfer. Comparison of "Hot" and "Cold" Sample Introduction with and without Temperature Programmed Vaporization. En "Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography. Vol. 1." Sandra, P. (Ed.). Hüthig, Heidelberg. 55-76.

**Schreier, P., Drawert, F. y Junker, J.** (1.976). Identification of Volatile Constituents from Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 24, 331-336.

**Schreier, P., Drawert, F. y Winkler, F.** (1.979). Composition of Neutral Volatile Constituents in Grape Brandies. *J. Agric. Food Chem.* 27, 365-372.

Schultz, T.H., Flath, R.A., Mon, T.R., Egging, S.B. y Teranishi, R. (1.977). Isolation of Volatile Components from a Model System. J. Agric. Food Chem. 25, 446-449.

Sequeira, A.J. y Taylor, L.T. (1.992). Supercritical Fluid Extraction of Wood Pulps. J. Chromatogr. Sci. 30, 405-408.

Serra, R. (1.990). Un agujero en el cielo. Ecología y vida 2, 22-40.

Shiaris, M.P., Sherrill, T.W. y Sayler, G.S. (1.980). Tenax GC Extraction Technique for Residual Polychlorinated and Polyaromatic Hydrocarbon Analysis in Biodegradation Assays. Appl. Environ. Microbiol. 39, 165-171.

Siegel, M.M. (1.981). The Use of the Modified Simplex Method for Automatic Phase Correction in Fourier-Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Anal. Chim. Acta 133, 103-108.

Simpson, R.F. (1.979). Influence of Gas Volume Sampled on Wine Headspace Analysis Using Preconcentration on Chromosorb 105. Chromatographia 12, 733-736.

Snyder, J.M. y Mounts, T.L. (1.990). Analysis of Vegetable Oil Volatiles by Multiple Headspace Extraction. J. Am. Oil Chem. Soc. 67, 800-803.

Spendley, W., Hext, G.R. y Himsforth, F.R. (1.962). Sequential Application of Simplex Design in Optimization and Evolutionary Operation. Technometrics 4, 441-463.

Spingarn, N.E., Northington, D.J. y Pressley, T. (1.982). Analysis of Volatile Hazardous Substances by GC/MS. J. Chromatogr. Sci. 20, 286-288.

Staniewski, J. y Rijks, J.A. (1.991). Potentials and Limitations of the Liner Design for Cold Temperature Programmed Large Volume Injection in Capillary GC an for LC-GC Interfacing. Proceedings of the Thirteenth International Symposium on Capillary Chromatography. Sandra, P., (Ed.). Hüthig, Heidelberg, 1334-1347.

Staniewski, J. y Rijks, J.A. (1.992a). Solvent Elimination Rate in Temperature-Programmed Injection of Large Sample Volumes in Capillary Gas Chromatography. J. Chromatogr. 623, 105-113.

Staniewski, J. y Rijks, J.A. (1.992b). Programmed-Temperature Injector for Large-Volume Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography and for Liquid Chromatography-Gas Chromatography Interfacing. J. Microcol. Sep. 4, 331-338.

Staniewski, J. y Rijks, J.A. (1993). Potential and Limitations of Differently Designed Programmed-Temperature Injector Liners for Large Volume Sample Introduction in Capillary GC. HRC 16, 182-187.

Stieg, S. y Nieman, T.A. (1.980). Application of a Microcomputer Controlled Chemiluminiscence Research Instrument to the Simultaneous Determination of Cobalt (II) and Silver (I) by Gallic Acid Chemiluminiscence. Anal. Chem. 52, 800-804.

Tabera, J. (1.989). Aplicación del método Simplex a la optimación de técnicas cromatográficas. I. Fundamentos y teoría. C.T.A. 10, 139-145.

**Tabera, J.** (1.990). Local Gas Hold-up Measurement in Stirred Fermenters. II. Fermenter Gas Hold-up Characterization by a Second Order Empirical Model. *Biotechnology Techniques* **4**, 305-310.

**Tabera, J., Reglero, G., Herraiz, M. y Blanch, G.P.** (1.991). Optimization of the Dynamic Headspace Sampling for the Analysis of Trace Volatile Components of Grape Juice: Use of a PTV Injector for Intermediate Trapping. *HRC* **14**, 392-396.

**Takeoka, G.R., Flath, R.A., Guentert, M. y Jennings, W.** (1.988). Nectarine Volatiles: Vacuum Steam Distillation Versus Headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 553-560.

**Takeoka, G.R., Flath, R.A., Mon, T.R., Teranishi, R. y Guentert, M.** (1.990). Volatile Constituents of Apricot (*Prunus Armeniaca*). *J. Agric. Food Chem.* **38**, 471-477.

**Ureta, F., Alonso, P. y Mignone, O.** (1.986). Étude sûr la destillation des principaux constituants de vins destinés a l'élaboration de piscos. *Proceedings of the XIX Congres International de la Vigne et du Vin. Santiago de Chile*, 217-268.

**U.S. Environmental Protection Agency.** (1.986). Volatile Organic Compounds in Water by Purge and Trap Capillary Column Gas Chromatography with Fotoionization and Electrolytic Conductivity Detectors in Series. Method 502.2. Environmental Monitoring and Support Laboratory. Cincinnati. Ohio.

**Vitenberg, A.G.** (1.984). Theory of Gas Chromatographic Headspace Analysis with Pneumatic Sampling. *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 122-124.

- Vitenberg, A.G.** (1.991). Methods of Equilibrium Concentration for the Gas Chromatographic Determination of Trace Volatiles. *J. Chromatogr.* 556, 1-24.
- Vo, A.** (1.992). Use of a Centrifugal Evaporator to Reduce Emissions of Solvents Used in EPA Method 3510 prior to GC-MC Analysis. *HRC* 15, 552-555.
- Voilley, A., Simatos, D. y Loncin, M.** (1.977). Gas Phase Concentration of Volatiles in Equilibrium with a Liquid Aqueous Phase. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 10, 45-49.
- Vogt, W., Jacob, K. y Obwexer, H.W.,** (1.979a). Sampling Method in Capillary Column Gas-Liquid Chromatography Allowing Injections of up to 250  $\mu$ l. *J. Chromatogr.* 174, 437-439.
- Vogt, W., Jacob, K., Ohnesorge, A.B. y Obwexer, H.W.,** (1.979b). Capillary Gas Chromatographic Injection System for Large Sample Volumes. *J. Chromatogr.* 186, 197-205.
- Welch, R.C., Johnston, J.C. y Hunter, G.L.K.** (1.982). Volatile Constituents of Muscadine Grape (*Vitis Rotundifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 30, 681-684.
- Wenclawiak, B.** (1.992). "Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography". Springer-Verlag. Berlin.
- Werkhoff, P. y Bretschneider, W.** (1.987a). Dynamic Headspace Gas Chromatography: Concentration of Volatile Components after Thermal Desorption by Intermediate Cryofocusing in a Cold Trap. I. Principle and Applications. *J. Chromatogr.* 405, 87-98.

Werkhoff, P. y Bretschneider, W. (1.987b). Dynamic Headspace Gas Chromatography: Concentration of Volatile Components after Thermal Desorption by Intermediate Cryofocusing in a Cold Trap. II. Effect of Sampling and Desorption Parameters on Recovery. J. Chromatogr. 405, 99-106.

Westendorf, R.G. (1.985). "Automated Analysis of Volatile Flavor Compounds". En "Characterization and Measurement of Flavor Compounds". Bills, D.D. y Mussinan, C.J. (Ed.). American Chemical Society. Washington. 138-153

Wheeler, J.R. y McNally, M.E. (1.989). Supercritical Fluid Extraction and Chromatography of Representative Agricultural Products with Capillary and Microbore Columns. J. Chromatogr. Sci 27, 534-539.

Williams, A.A., May, H.V. y Tucknott, O.G. (1.978). Observations on the Use of Porous Polymers for Collecting Volatiles from Synthetic Mixtures Reminiscent of Fermented Ciders. J. Sci. Food Agric. 29, 1041-1054.

Williams, A.A. (1.982). Recent Developments in the Field of Wine Flavour Research. J. Inst. Brew. 88, 43-53.

Witkiewicz, Z., Grajek, H. y Choma, J. (1.991). Chromatographic Determination of the Physico-Chemical Parameters of Adsorption on Active Carbons. J. Chromatogr. 556, 441-456.

Wright, B.W., Wright, C.W., Gale, R.W. y Smith, R.D. (1.987). Analytical Supercritical Fluid Extraction of Adsorbent Materials. Anal. Chem. 59, 38-44.

Yang, F.J., Brown, A.C. y Cram, S.P. (1.978). Splitless Sampling for Capillary-Columns Gas Chromatography. J. Chromatogr. 158, 91-109.

Yokouchi, Y. y Sano, M. (1.991). Trace Determination of Volatile Organic Compounds in Soil Based on Thermal Vaporization Followed by Tenax-GC Trapping and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Chromatogr. 555, 297-301.

Zeldes, G. y Horton, A.D. (1.978). Trapping and Determination of Labile Compounds in the Gas Phase of Cigarette Smoke. Anal. Chem. 50, p.779-782.

Zlatkis, A., Bertsch, W., Lichtenstein, H.A., Tishbee, A., Shunbo, F., Liebich, H.M., Coscia, A.M. y Fleischer, N. (1.973). Profile of Volatile Metabolites in Urine by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry. Anal. Chem. 45, 763-767.

Zlatkis, A., Poole, C.F., Brazell, R., Lee, K.Y., Hsu, F. y Singhawangcha (1.981). Profiles of Organic Volatiles in Biological Fluids as an Aid to the Diagnosis of Disease. Analyst 106, 352-360.