



**FACULTAD DE INGENIERIA U.N.A.M.  
DIVISION DE EDUCACION CONTINUA**

**CURSOS ABIERTOS  
DETERMINACION DE PLAGUICIDAS CLORADOS EN AGUA.**

**NOTAS GENERALES DEL CURSO**

**EXPOSITOR: M. en C. TERESA LEAL ASCENCIO.**

# **Introduction to Gas Chromatography**

---

**1.1 Definition**

**1.2 Evolution of Gas  
Chromatography**

**1.3 The GC System**

**1.4 Applications of GC**

**1.5 GC Theory**

---

# 1.1 Definition

Chromatography is an analytical technique used for separating chemical mixtures.

**Goal:** Achieve a separation that helps determine the identity of the components or their concentration.

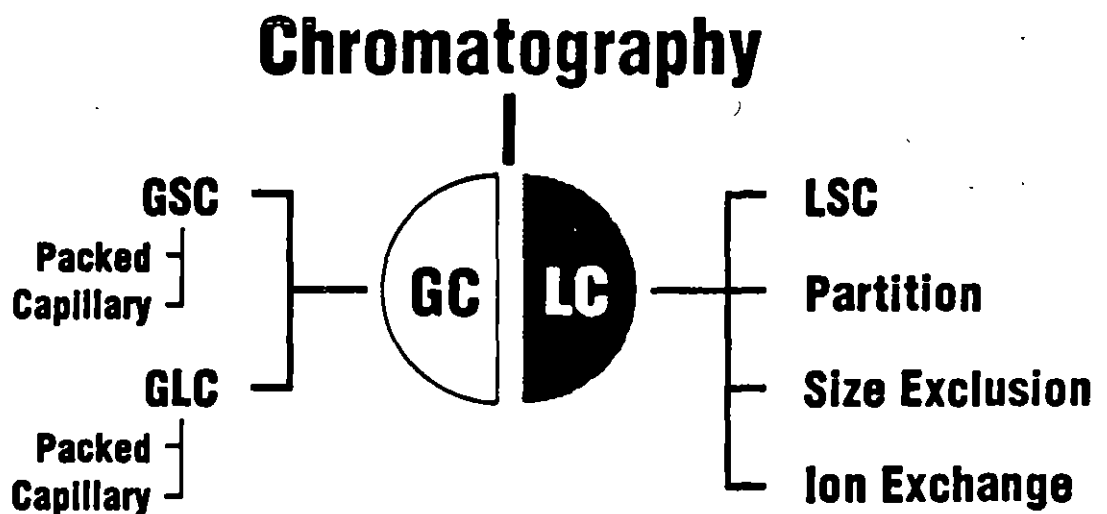


Figure 1-1: Divisions of chromatography

**Principle:** Distribution of sample components between the mobile gas phase and the stationary phase. Some components interact more with the stationary phase causing them to move slower through the column and become separated.

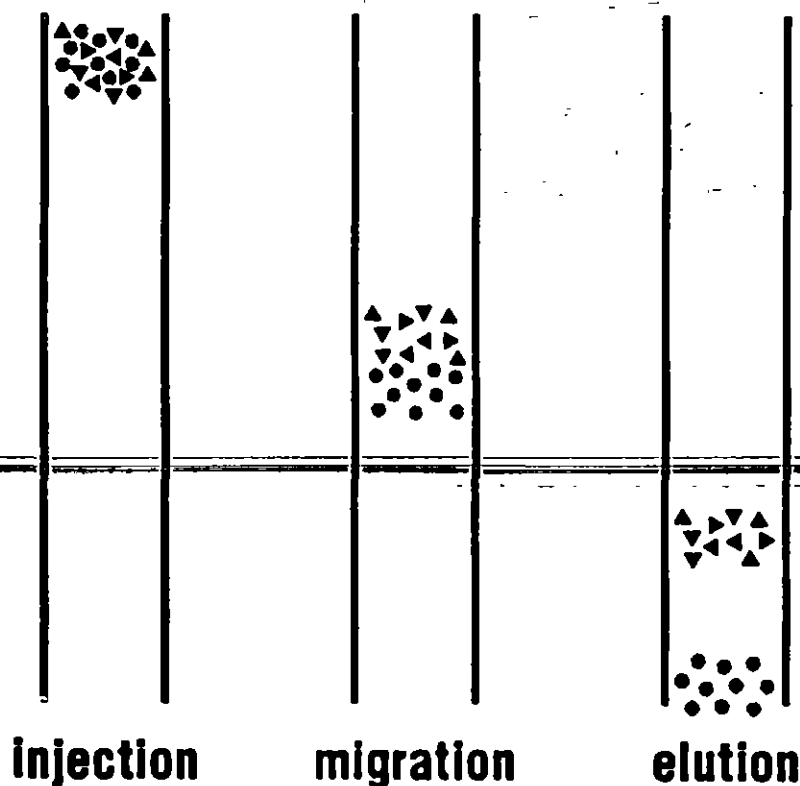


Figure 1-2: Separation of sample components

---

## 1.2 Evolution of Gas Chromatography

***chroma~graphon***  
**color - writing**

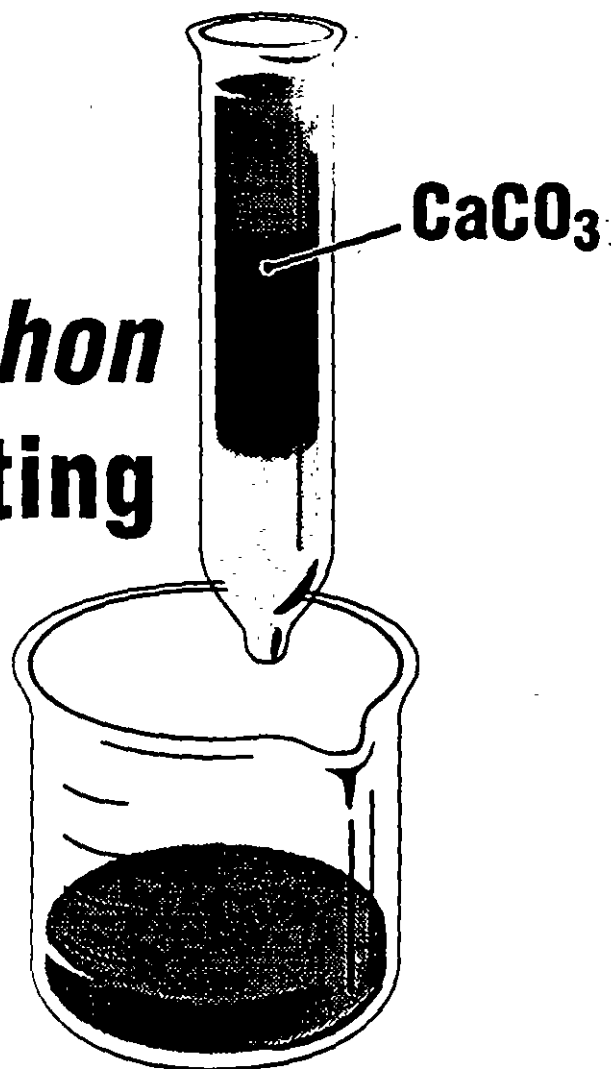


Figure 1-3: Early chromatography

# 1.3 The GC System

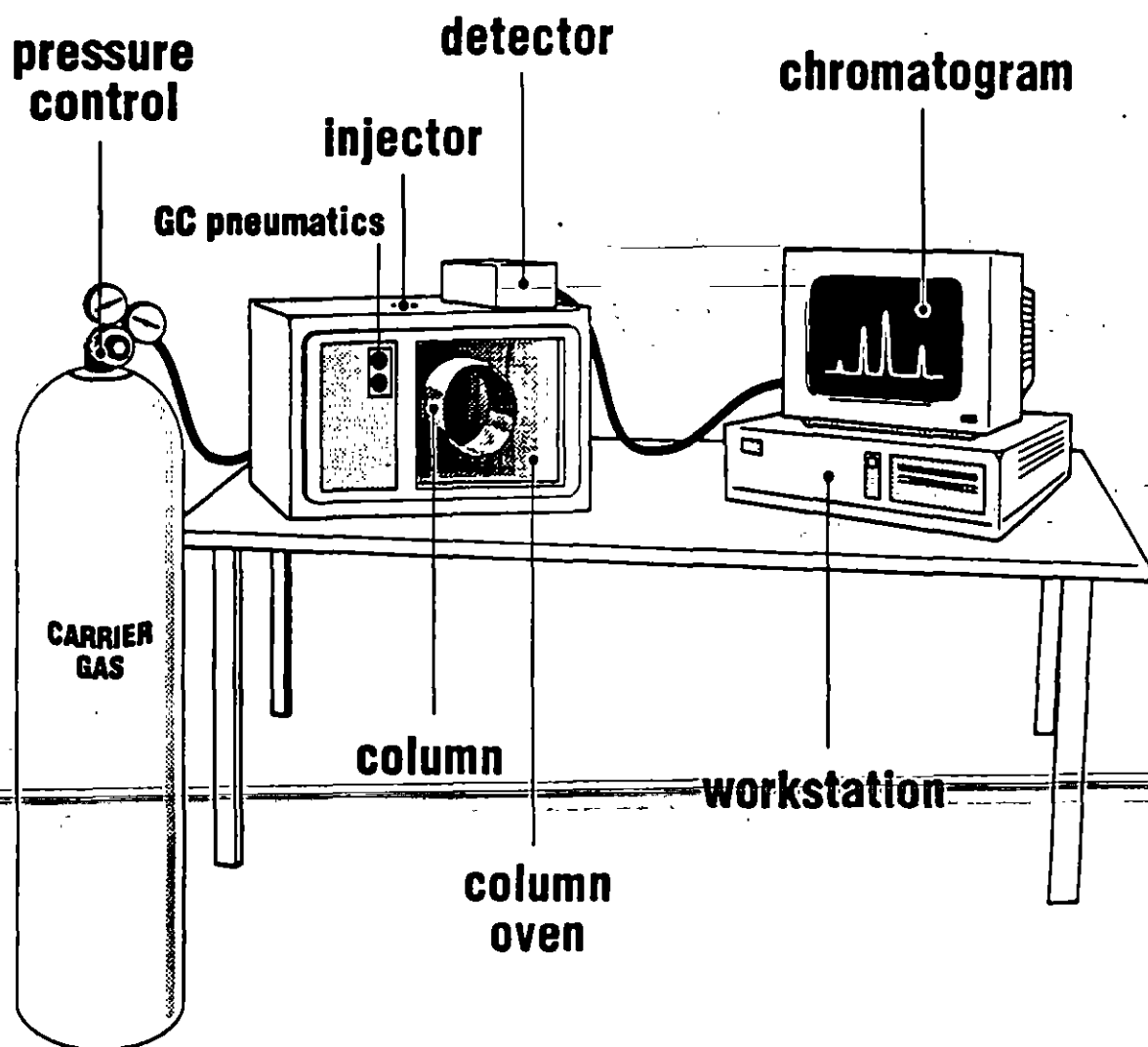
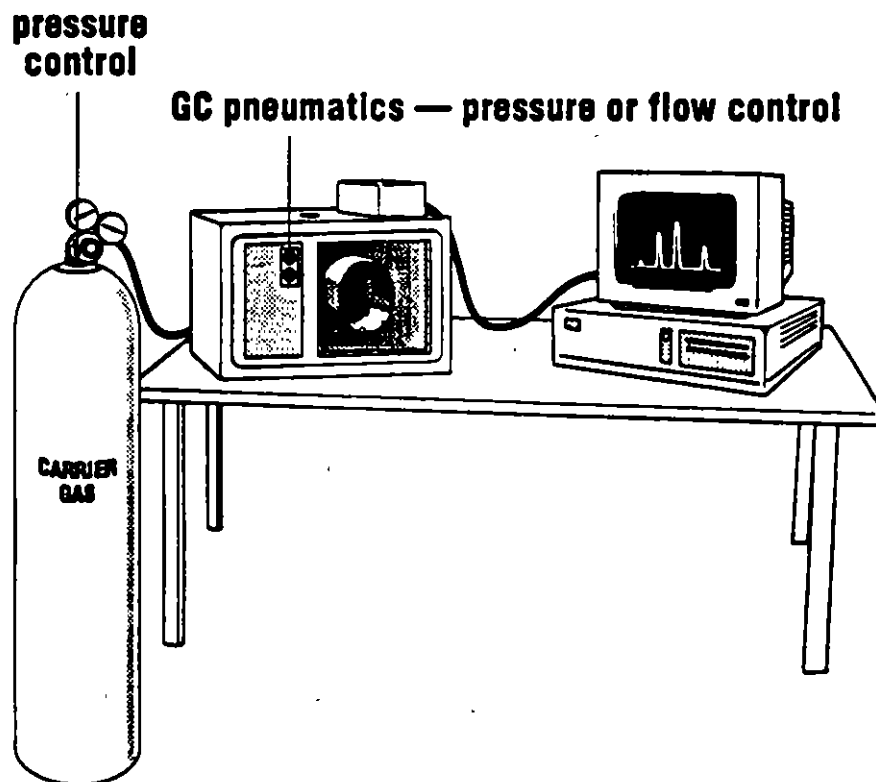


Figure 1-5: Gas chromatography system

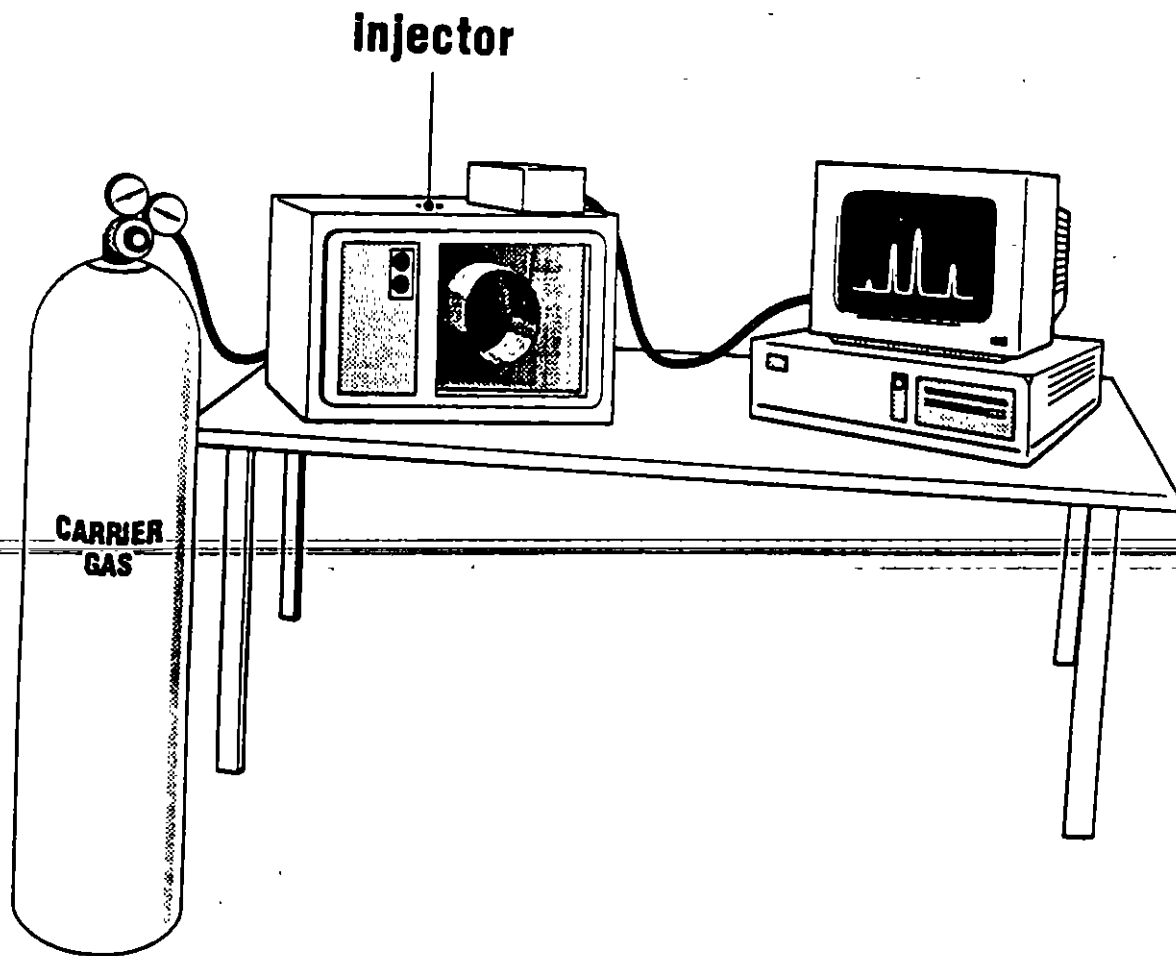
# Carrier Gas

- Inert.
- Helium, Argon, Nitrogen, Hydrogen.
- Choice dictated by detector, cost, availability.
- Pressure regulated for constant inlet pressure.
- Flow controlled for constant flow rate.



# Injector

- Sample introduction / vaporization.
- Syringe injection — accurate, reproducible.
- Injection techniques are sample dependent.





# Columns

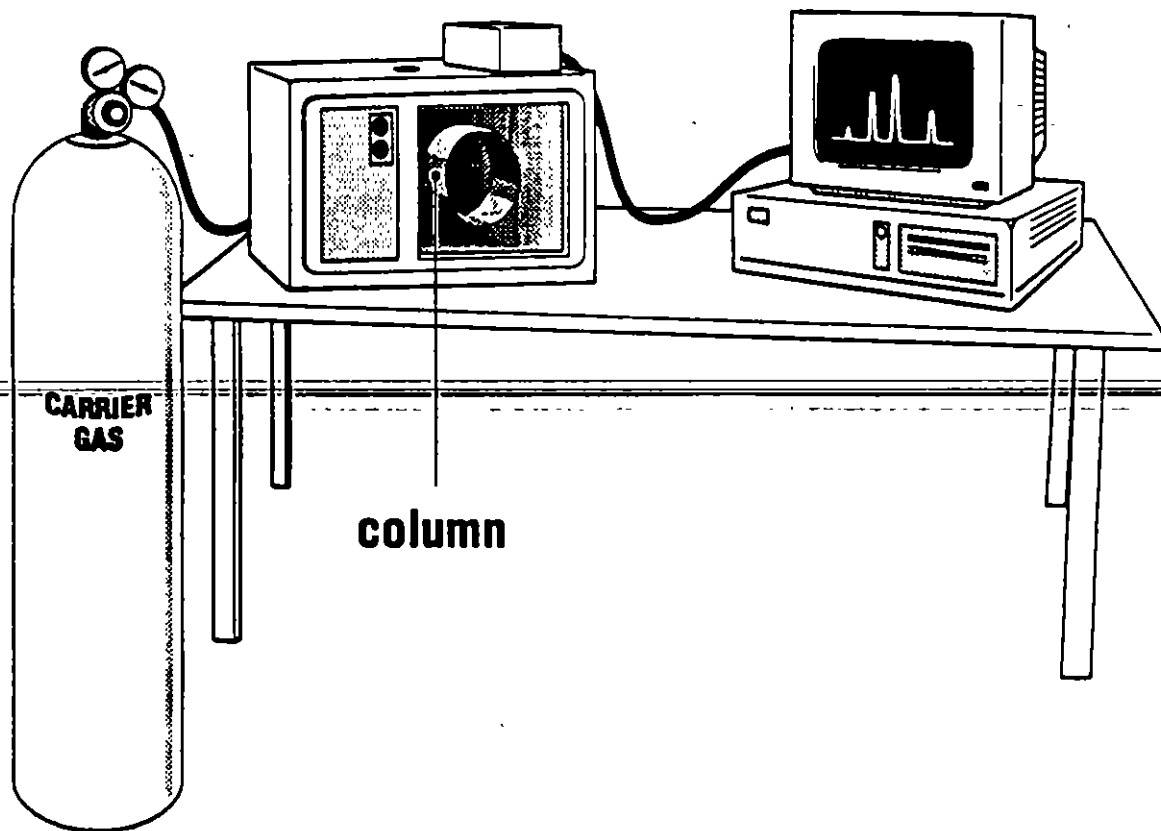
left 0.5  
right 2 um  
1.5 um 2.2

## *PACKED*

- 2 – 3 m long
- 2 – 4 mm ID
- Glass or metal

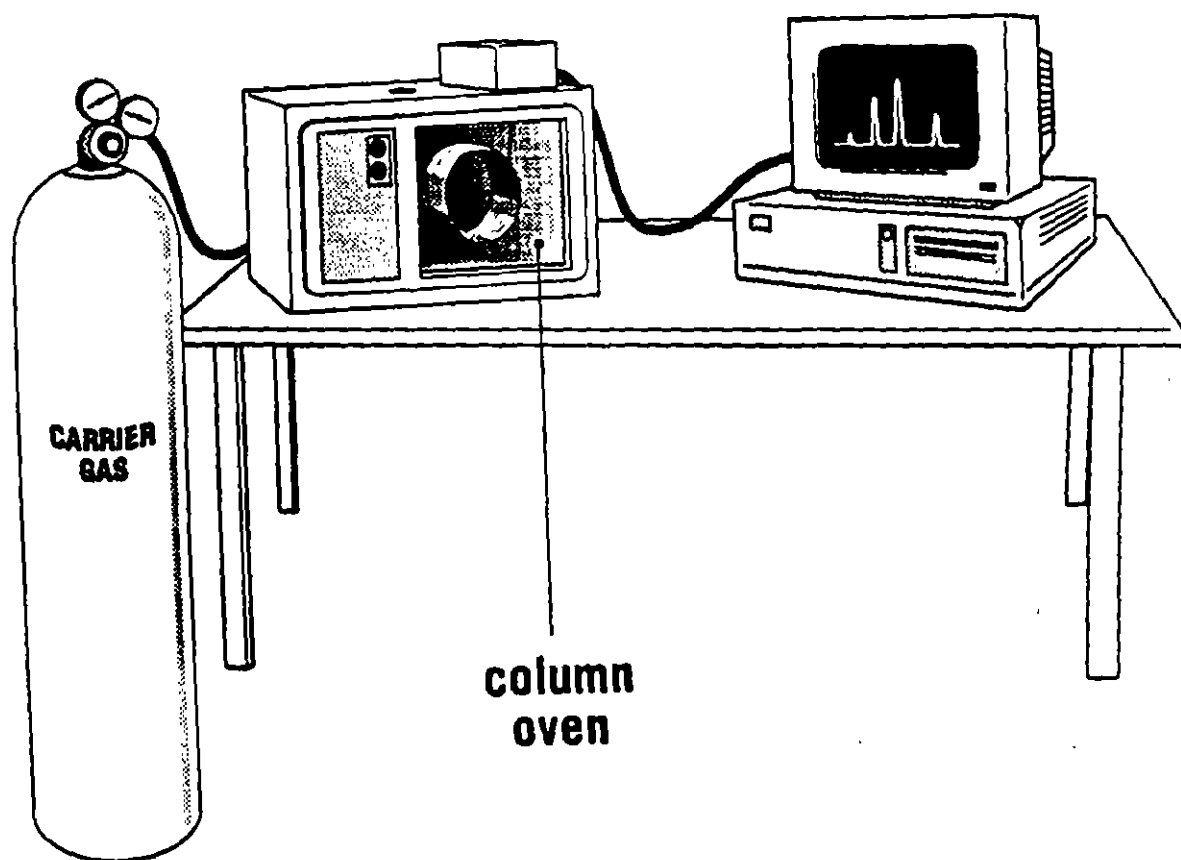
## *CAPILLARY*

- 10 – 100 m long
- 0.1 – 0.8 mm ID
- Polyimide coated fused silica



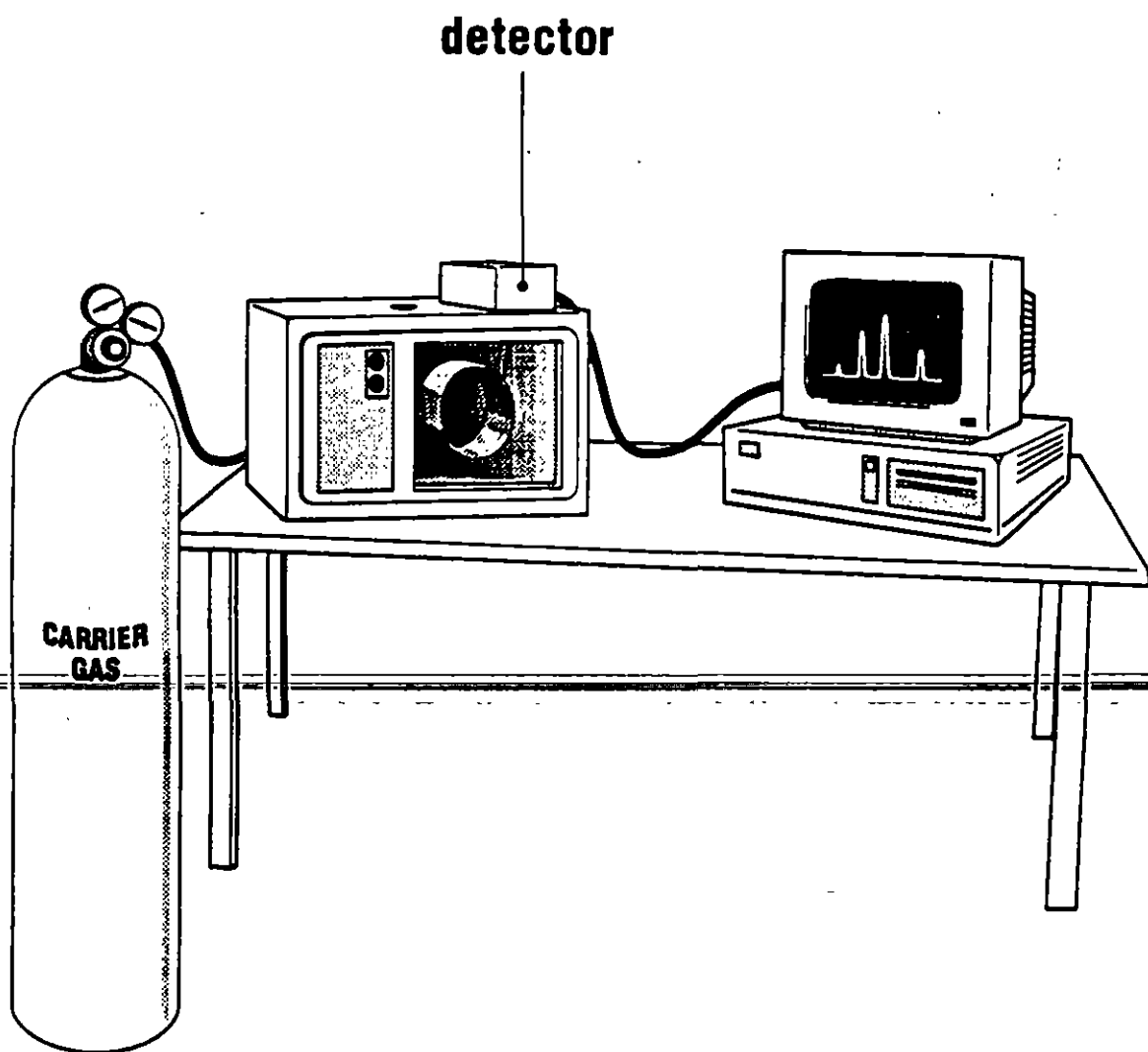
# Column Oven

- Accurate temperature control ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ).
- Temperature programmable.



# Detector

- Responds to components.
- Universal or selective detection.



# Chromatogram

- Plot of detector signal versus time.
- Components appear as peaks from baseline.
- Peak retention time and peak area.
- Qualitative analysis — *identity of component*.
- Quantitative analysis — *amount of component*.

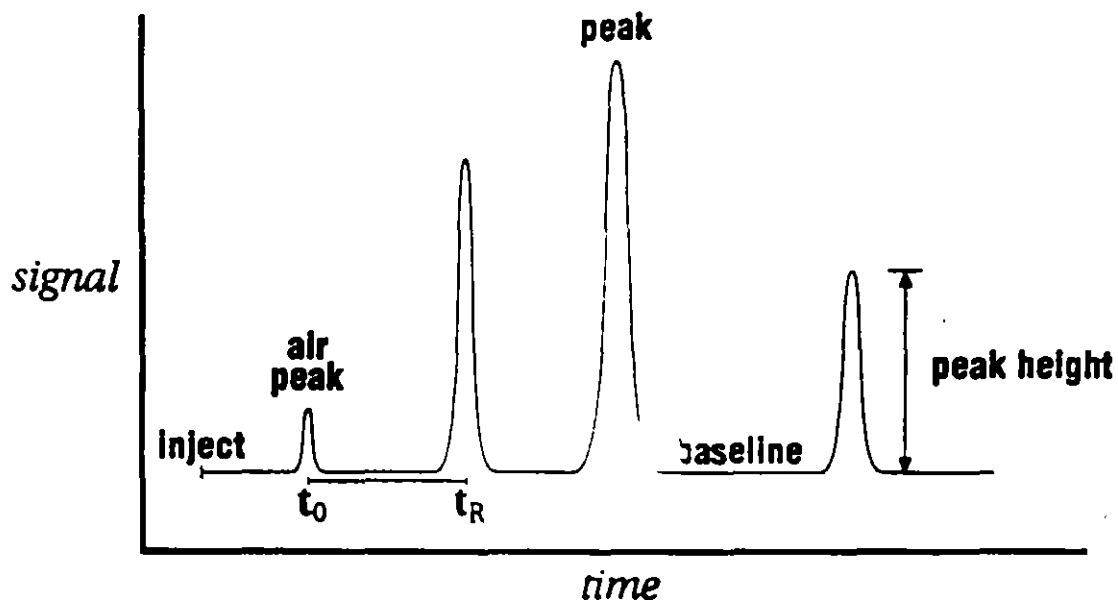


Figure 1-6: Chromatogram example

# 1.5 GC Theory

## Resolution

Degree of separation between two peaks.

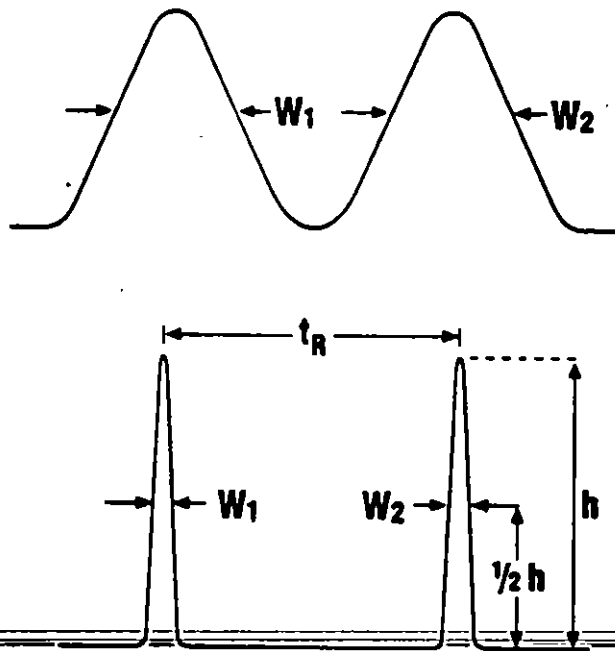


Figure 1-8: Resolution of packed (*top*) and capillary (*bottom*) columns

- Measure of peak width and distance between peaks.
- Capillary column has greater resolution than packed column.

$$R = \frac{1.18 \Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

where

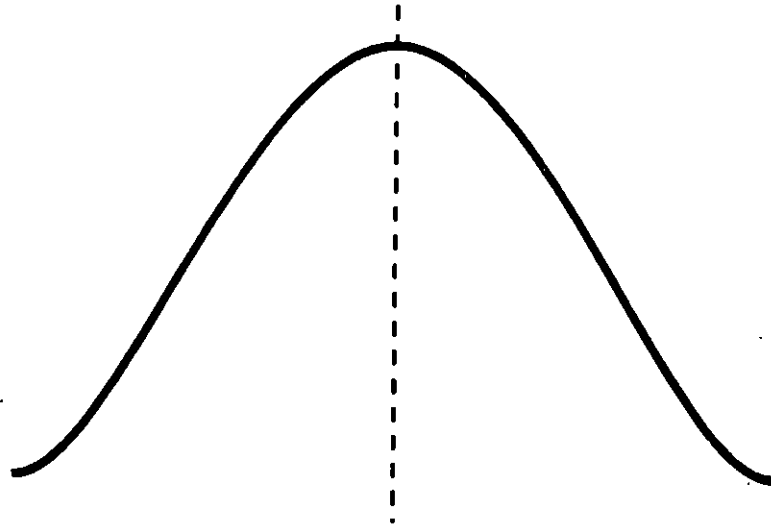
$\Delta t_R$  = Difference in retention times between the two peaks.

$W_1$  &  $W_2$  = Widths of the two peaks at half their heights.

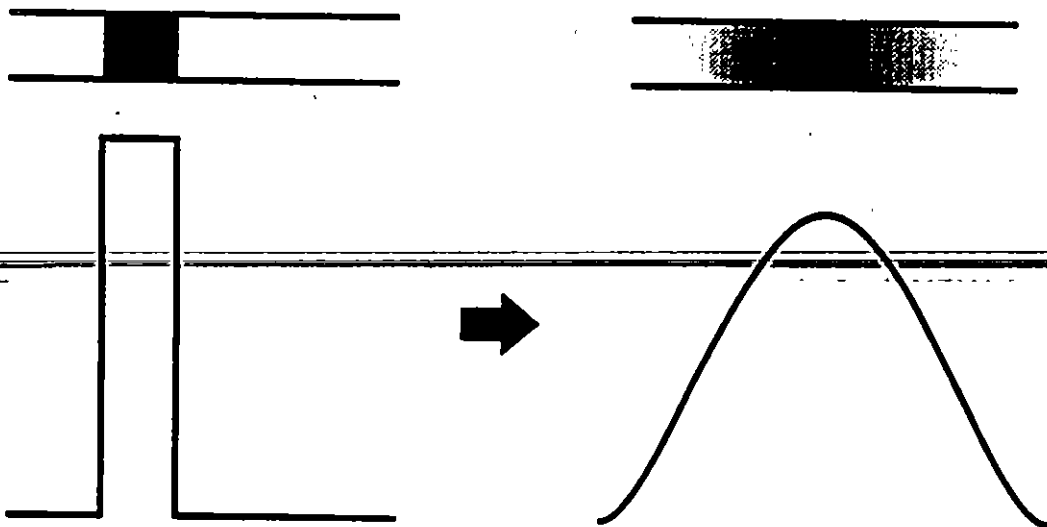
.....

$R = 1.0$  ... The two peaks are 98% separated to the baseline.

$R = 1.5$  ... The two peaks are 99.7% separated to the baseline.



- Ideal peak shape is a Gaussian curve.
- Statistical distribution of molecules.



**Figure 1-9:** Gaussian peak shape formation

**Column  
Selectivity**

**Column  
Efficiency**



**RESOLUTION**

- Selectivity is the ability to distinguish between two components.
- Efficiency is a measure of peak broadening.



# Column Efficiency

- Measure of peak broadening.
- Quantitatively expressed as number of plates.
- Vapor-liquid equilibrium in distillation.

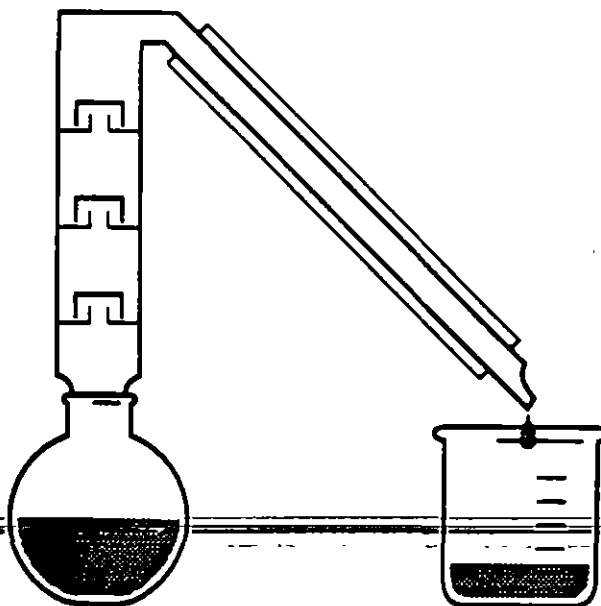
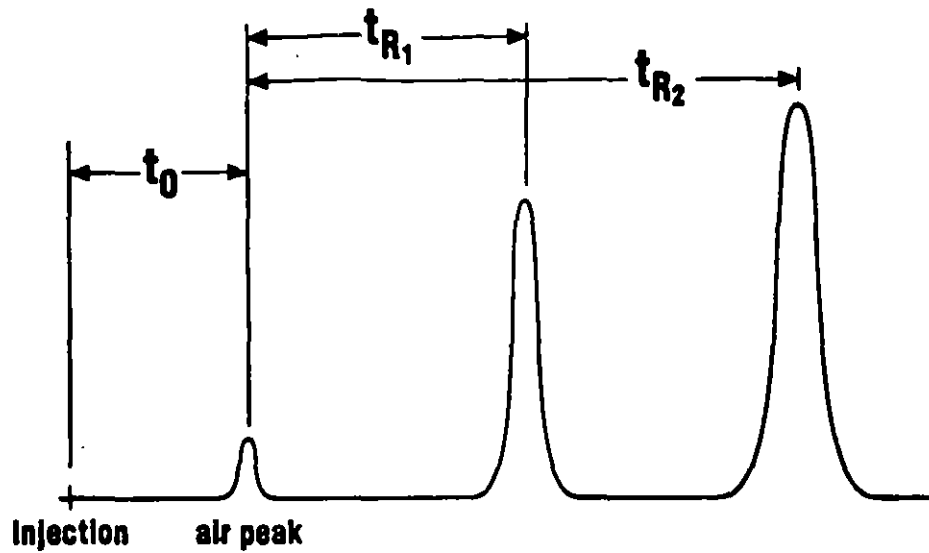


Figure 1-10: Plate theory

.....  
For the above bubble-cap column, the  
number of plates = 3.



For a packed column:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

For a capillary column:

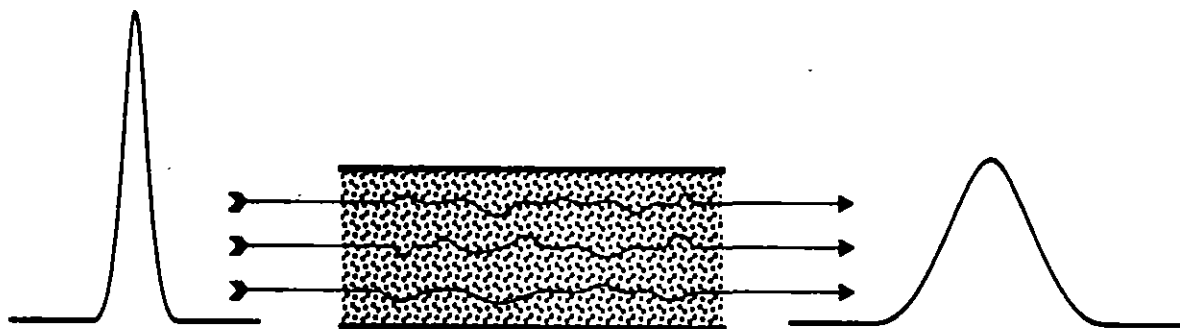
$$N = 5.54 \left( \frac{t'_R}{W} \right)^2$$

Adjusted retention time is the retention time for the component minus the retention time for an unretained component (air peak).

$$t'_{R_1} = t_{R_1} - t_0$$

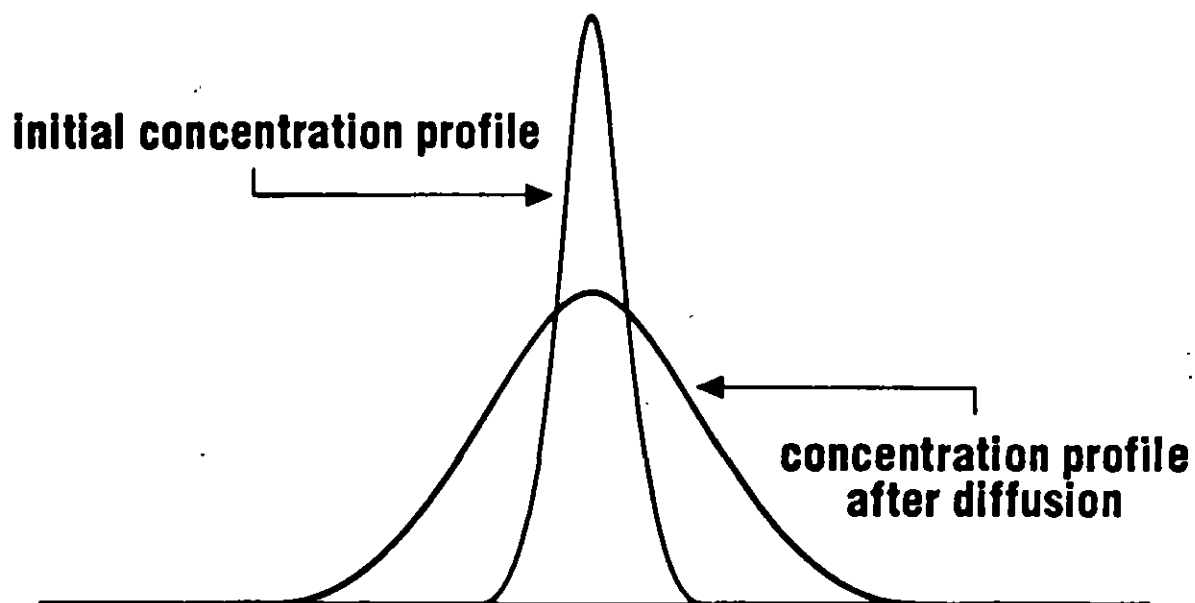
# **Factors Influencing Column Efficiency**

## **A. Eddy diffusion (multipath effect).**



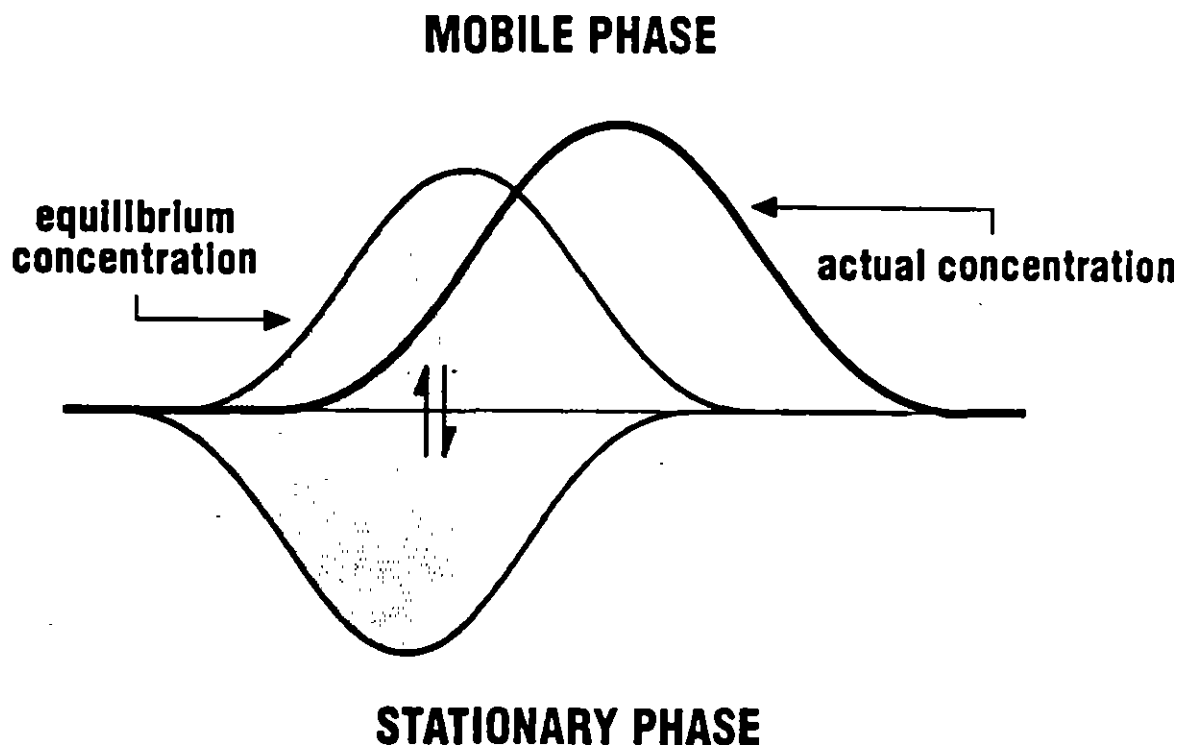
- Depends on size, shape of packing, and how well column was packed.
- Negligible for capillary columns.

## B. Longitudinal diffusion:



- Molecular diffusion in gas phase.
- Strongly dependent on flow rate.

## C. Resistance to mass transfer.



- Ease of transfer of sample components from gas phase to stationary phase.
- Strongly dependent on flow rate and amount of stationary phase.

# The Van Deemter Equation

- Combines the three band broadening effects.
- **HETP**: Height equivalent to a theoretical plate

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

where

A = Eddy diffusion

B = Longitudinal diffusion

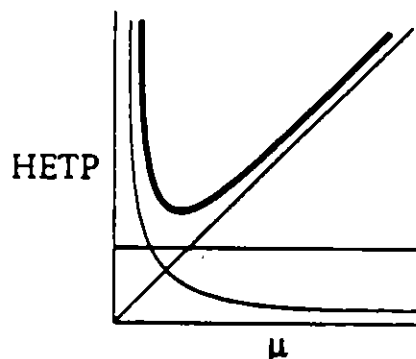
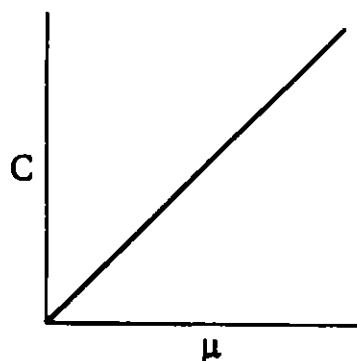
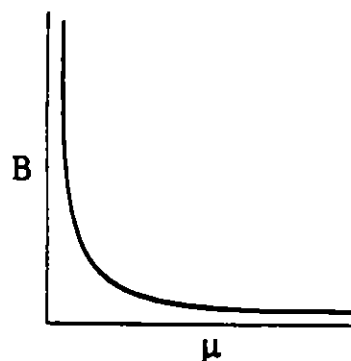
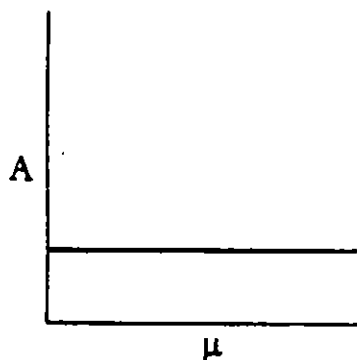
C = Resistance to mass transfer

$\mu$  = Carrier gas linear velocity

- .....
- Low HETP = high column efficiency.
  - Can be calculated if effective number of plates is known:

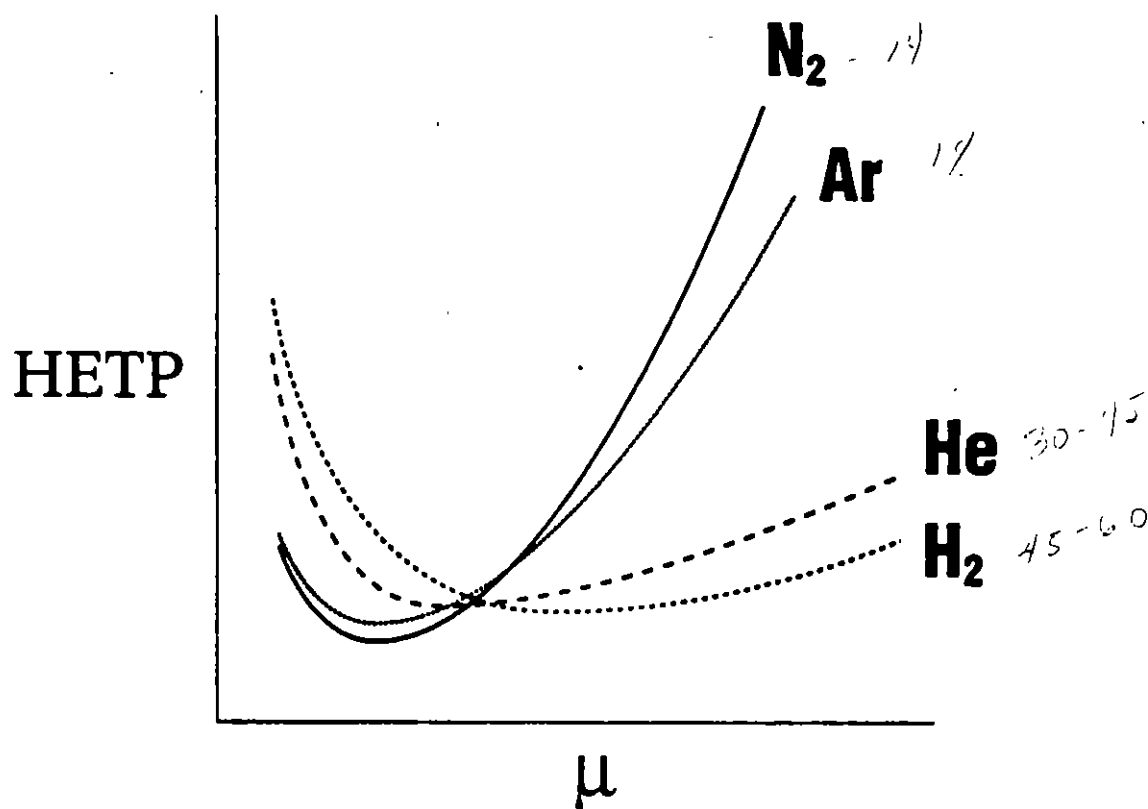
$$\text{HETP} = \frac{L_{\text{col}}}{N_{\text{eff}}}$$

# The Van Deemter Plots



- Plot determines optimum linear velocity.
- Loss of eddy diffusion in capillary columns results in lower HETP.

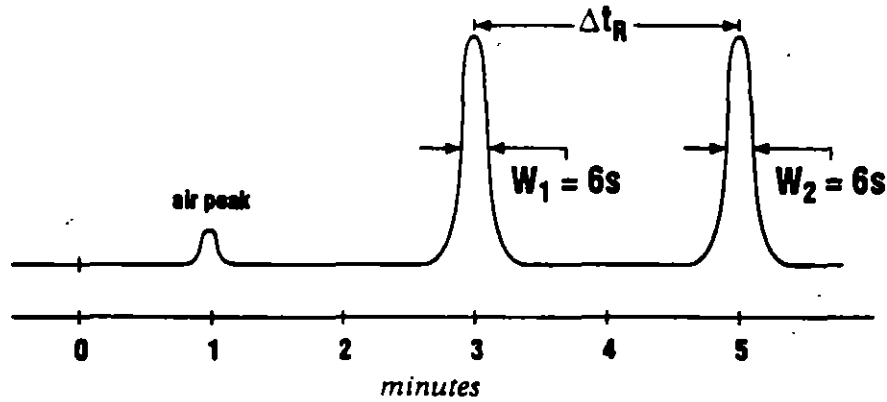
# Carrier Gas Affects the Van Deemter Plot



- $N_2$ , having highest m.w., gives lowest HETP.
- $H_2$  and He give flatter curves at higher flow rates for faster analysis time.



# Example Calculations



Given chromatogram and a capillary column of 15 m.

$$R = 1.18 \left( \frac{120}{6+6} \right) = 11.8 \quad \checkmark$$

$$N_{\text{eff}} = 5.54 \left( \frac{240}{6} \right)^2 = 860 \times 8864$$

$$\alpha = \frac{300}{180} = 1.7 \quad \checkmark$$

$$\text{HETP} = \frac{1500 \text{ cm}}{8,860} = .17 \text{ cm} \quad \checkmark$$

$N_{\text{eff}}$  typically calculated on a peak of at least 5 times the retention of an "air peak."

# **Summary**

	<b>Packed Columns</b>	<b>Capillary Columns</b>
<b>column length, meters</b>	2-3	15-100
<b>ID, millimeters</b>	2-4	0.1-0.8
<b>plates per second</b>	5-20	50-200
<b>plates per column</b>	4,000-5,000	200,000-250,000
<b>efficiency, plates per meter</b>	1,500-2,500	3,000-4,000

**Table 1-12:** Typical column characteristics

- Major difference is length of capillary column.
- Plates per meter for capillary columns is slightly higher due to absence of eddy diffusion.

# **Basic GC Hardware**

---

- 2.1 Safety Considerations**
- 2.2 Power Requirements**
- 2.3 Carrier Gas Supply and Control**
- 2.4 Inlet Devices**
- 2.5 Column Materials and Construction**
- 2.6 Column Installation**
- 2.7 Detectors**
- 2.8 GC Electronics**
- 2.9 The Keyboard and Display**
- 2.10 Data Output Devices**

# 2.1 Safety Considerations

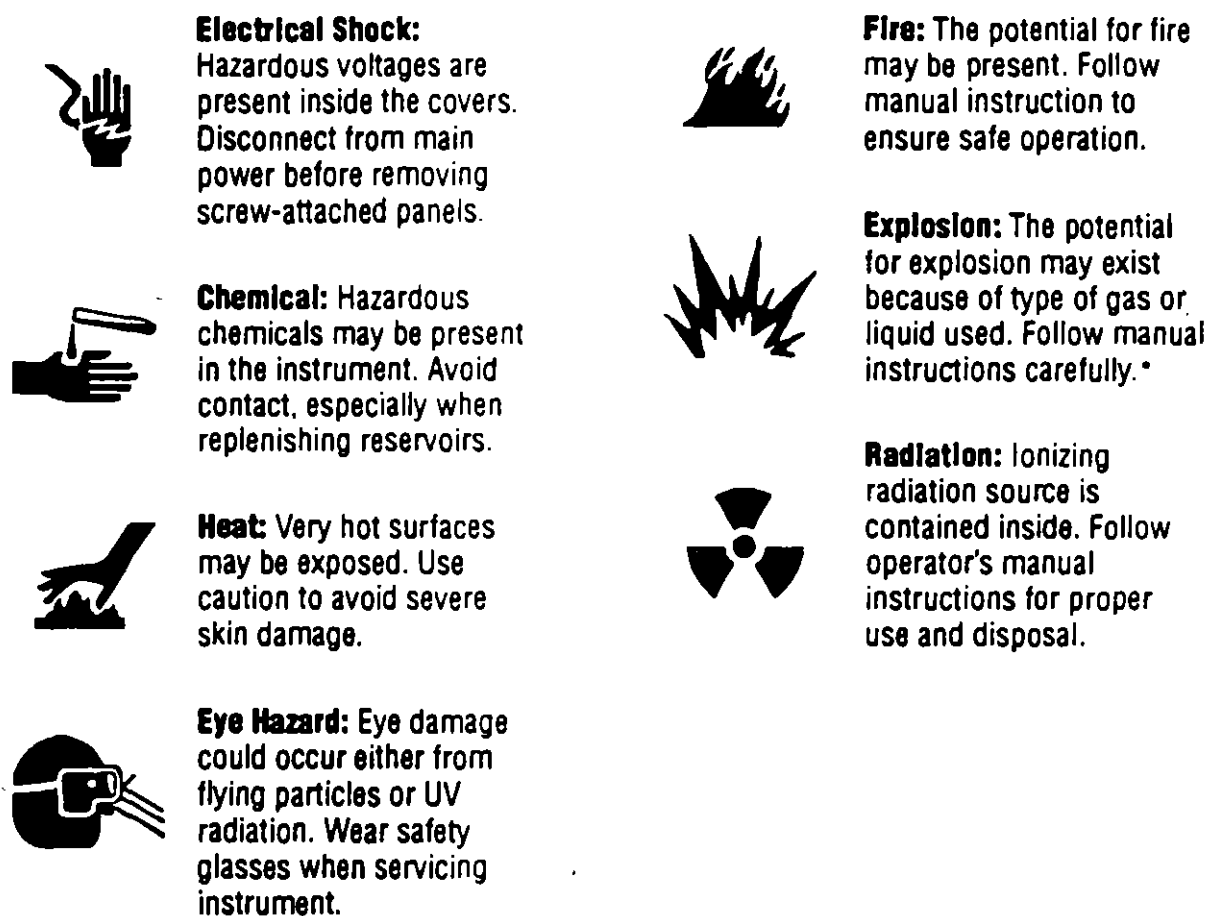


Figure 2-1: Hazard symbols and their meanings

## 2.2 Power Requirements

- Separate circuits with reliable ground.
- Ground to neutral potential must not exceed 3V (AC or DC).
- Single phase (phase neutral) power only.
- 15 amps for 99 – 132V or 8 amps for 198 – 264V.
- Quality of power:
  - 120 AC  $\pm$  8%V, 60 Hz  $\pm$  3 Hz
  - 220/240 AC  $\pm$  8%, 50 Hz  $\pm$  3Hz
- Free of short or long duration fluctuations

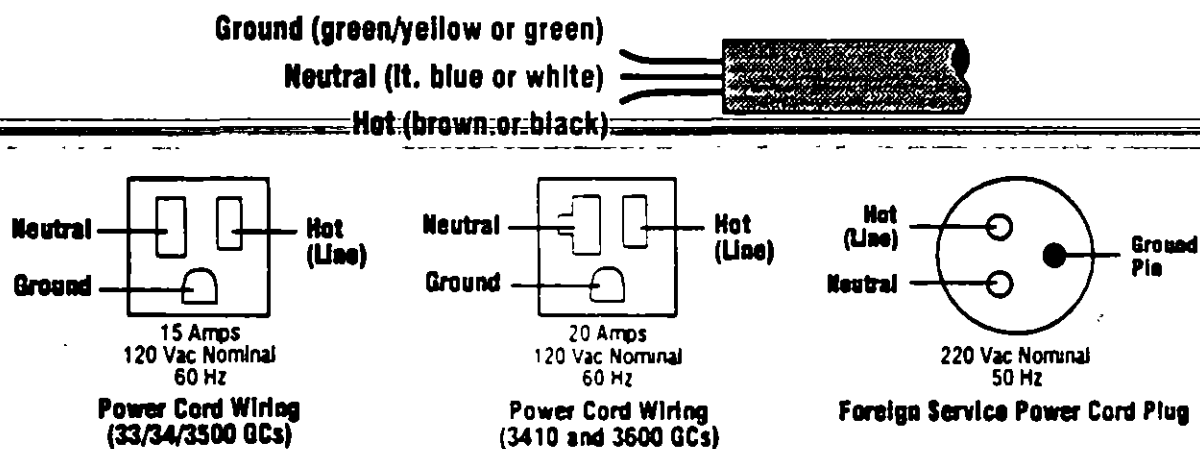


Figure 2-2: Power cord wiring and plugs

## 2.3 Carrier Gas Supply and Control

- Dictated by detector.

Detector	TCD	ECD	FID	TSD	FPD	ELCD	PID
Carrier Gases	He N <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Ar	N <sub>2</sub>	He N <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	He N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	He	He N <sub>2</sub>
Fuel Gases			H <sub>2</sub> Air	H <sub>2</sub> Air	H <sub>2</sub> Air	H <sub>2</sub> Air	

Table 2-1: Gas requirements

- Chromatographic grade gases (high purity).
- Filtering system:
  - Catalyst for oxygen.
  - Active charcoal for heavy hydrocarbons.
  - Molecular sieve for water vapor.

# **Gas Inlets and Connections**

- Two stage regulators.
  - Low pressure stage rated for zero to 100 psig.
  - Inlet pressures for carrier gases:
    - H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub>, Ar — normally 80 psig.
  - Inlet pressures for fuel gases:
    - H<sub>2</sub> — normally 40 psig.
    - Air — normally 60 psig.
  - All gases connect to 1/8" Swagelok® fittings on rear of instrument.
- 
- *Do not use uncleaned tubing.*

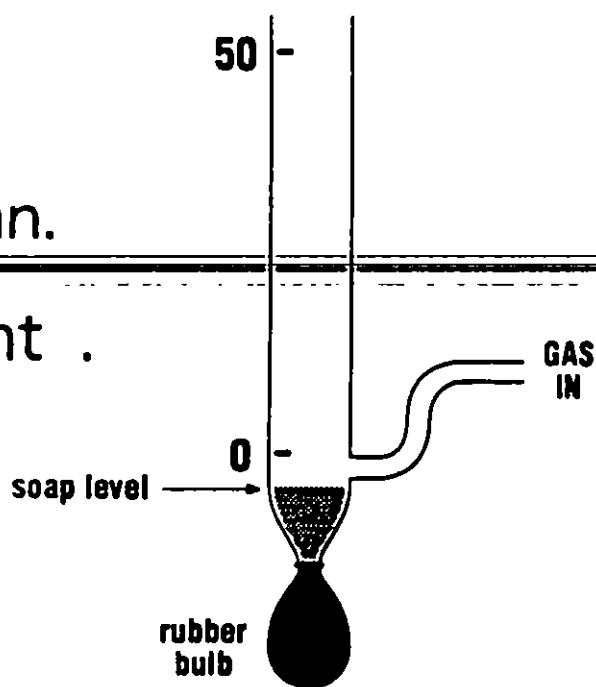
# **Gas Cylinder Safety**

- Never move cylinders with regulators installed.
- Install safety cap when moving.
- Chain cylinders to the bench or wall.
- Use labels to indicate "FULL," "IN USE," or "EMPTY."
- Do not use cylinders below 100 psig.
- Do not expose to  $>125^{\circ}\text{F}$ .
- Use only approved regulators and tubing.
- Route gas lines safely.



# GC Pneumatics

- Pressure regulated.
  - Constant inlet pressure.
  - Suitable for isothermal analysis.
  - Flow varies with downstream pressure changes.
- Flow controlled.
  - Keeps volumetric flow constant.
  - Responds to downstream pressure changes.
- Pressure gauges.
  - Indicates inlet pressure to column.
- Flow measurement .
  - Soap film flowmeter.
  - Volumetric flow rate.



---

## 2.4 Inlet Devices

### **Packed Column Injectors**

- Vaporizes sample
- Transfers to head of column
- Aluminum block injector oven
- Heater cartridge and probe

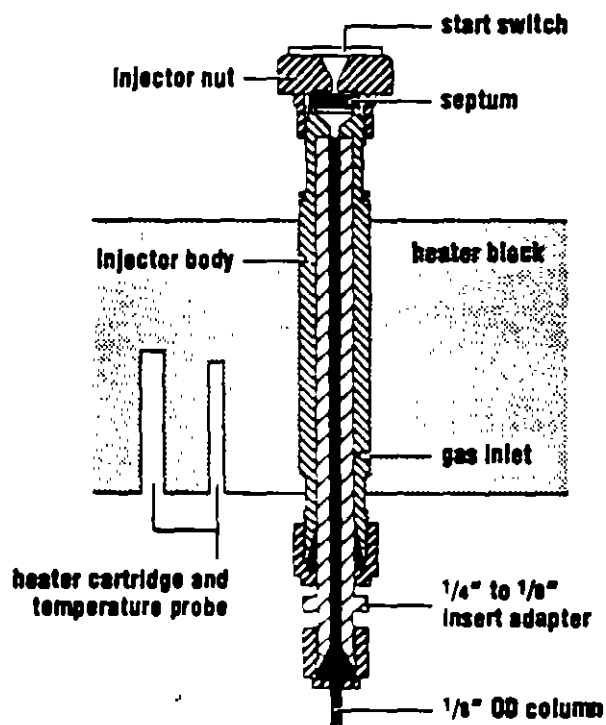


Figure 2-3: A packed injector

# Capillary Injectors

- Smaller sample capacity
  - Special techniques — split / splitless / on-column
- Low carrier gas flow rates
  - Make up gas required for detector
- Special hardware
  - Septum purge
  - Splitter
  - Pressure / flow regulation

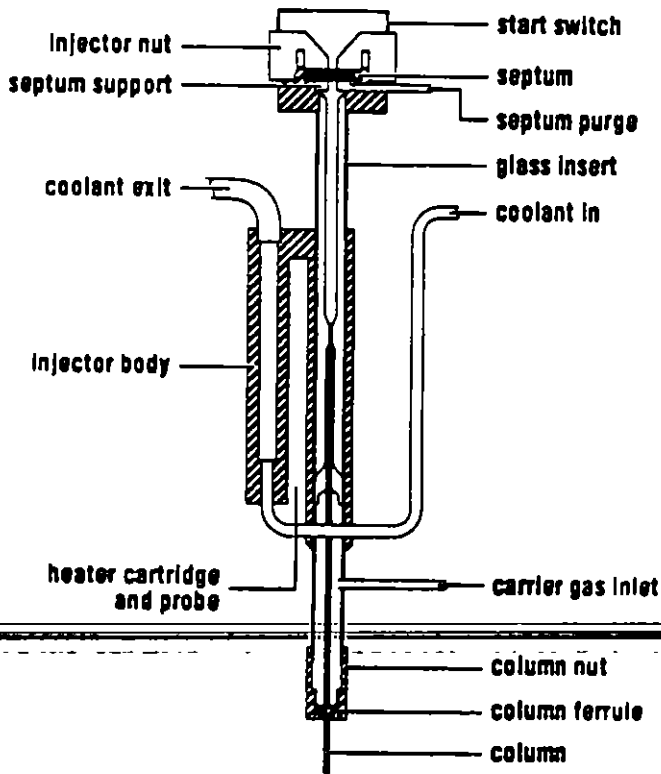


Figure 2-4: A capillary injector

# Gas Sampling Valves

- For use with gaseous samples.
- Operated manually or automatically.
- Load position — sample fills loop as a known amount.

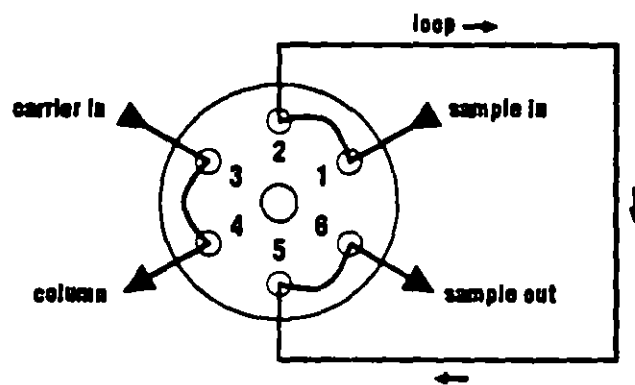


Figure 2-5: Gas sampling valve in the *load* position

- Inject position — sample is flushed from loop into column by the carrier gas.

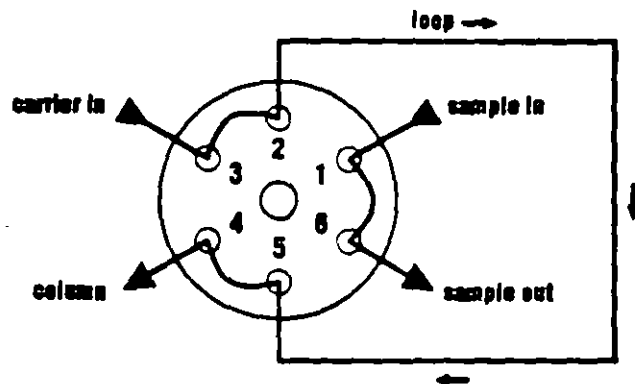


Figure 2-6: Gas sampling valve in the *inject* position

---

## 2.5 Column Materials and Construction

**Packed columns** — Short (2–3 m), wide bore tubing.

**Capillary columns** — Long (>60 m), narrow bore tubing.

All materials should be thermally and chemically stable.

**Thermally stable** — Temperatures needed for analysis will not decompose the column materials.

---

**Chemically stable** — Inert materials, free of oxides or active sites.

Use chromatography grade, clean materials.

# **Packed Columns**

- Stainless steel tubing is most often used because it is inert and rigid.
- Glass, nickel, and teflon-lined stainless steel are also available (more inert).

<b>Material</b>	<b>ID</b>	<b>OD</b>	<b>Length</b>
<b>Stainless Steel</b>	<b>2 mm</b>	<b>1/8 inch</b>	<b>2-3 meters</b>
<b>Glass</b>	<b>2 mm</b>	<b>1/4 inch</b>	<b>2 meters</b>
<b>Teflon</b>	<b>2 mm</b>	<b>1/8 inch</b>	<b>&lt;10 meters</b>

**Table 2-2: Packed column dimensions**

- The packing consists of a solid support coated with a liquid phase for GLC columns, or a porous solid for GSC columns.

# **Solid Support**

- Serves as base for liquid phase.
- Increases surface area available to sample.
- Small, uniformly sized, porous particles.
- High concentration of silica.
- Standard mesh sizes.

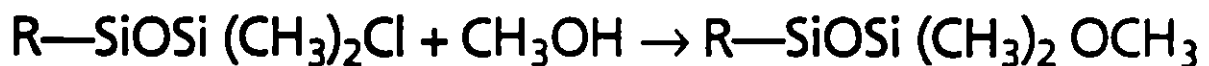
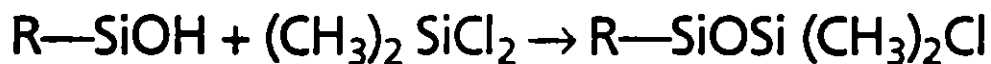
<b>Mesh Size</b>	<b>Average Diameter Range</b>
<b>60 / 80</b>	<b>177 to 260 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>80 / 100</b>	<b>149 to 177 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>100 / 120</b>	<b>125 to 149 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>120 / 140</b>	<b>105 to 125 <math>\mu\text{m}</math></b>

**Table 2-3:** Diameter equivalents to mesh size

**Example:** Mesh 80/100 means that all the particles will pass through an 80 mesh screen but not through a 100 mesh screen. An 80 mesh screen is one that has 80 standard diameter wires per inch.

# Silylation

- Surface deactivation.
- Washing with strong acid removes metals.
- Chemical treatment (DMCS, TMCS).
- Final polarity compatible with stationary phase.



- Methyl functional groups replace alcohol groups.



## **Liquid Phases (GLC)**

- Uniformly coated on the solid support.
- Recommended loading 2 – 10% by weight.
- Non-volatile liquids.
- Selectivity — separating power.
- Vary in chemical composition.

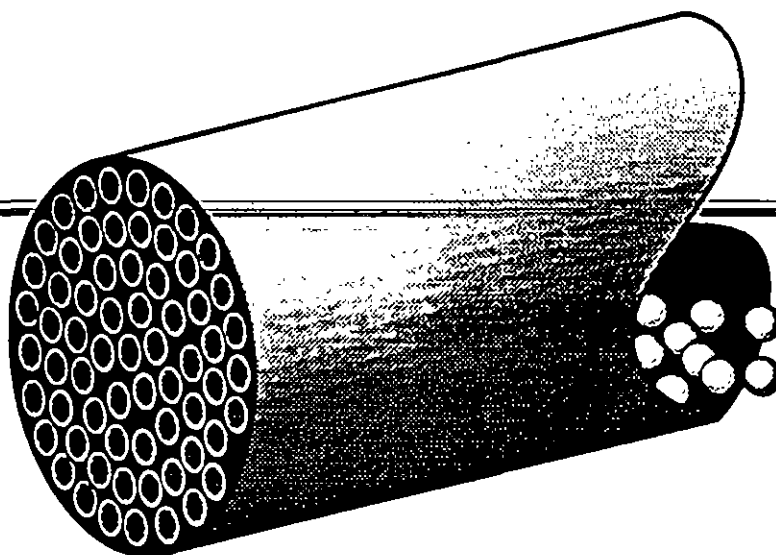


Figure 2-7: Cross-section of a packed column

# **Solid Adsorbents (GSC)**

- Porous adsorbents.
- Requires no liquid phase.
- Silica gel, alumina, molecular sieve.
- Porous polymer beads.
  - Ethylvinyl benzene cross-linked with divinyl benzene.
  - Functions as solid support and stationary phase.
  - Available in range of polarities.

# **Capillary Columns**

- Stainless steel → glass → fused silica.
  - Flexible but mechanically strong.
  - Inert.
  - 0.05 – 0.80 mm ID.
  - Lengths greater than 100 m possible.
  - Layer of polyamide applied to outside to fill flaws and strengthen.
  - Inner surface undergoes silylation.
  - Stationary phase coated on inner wall.
-

# Stationary Phase

- Coated as a thin uniform film on inner walls.
- Similar in composition to liquid phase in packed columns.
- **WCOT** — inner surface coated with thin layer of stationary phase.
- **PLOT** — inner surface coated with porous layer of solid support or adsorbent.
- **SCOT** — inner surface first coated with a solid support, then the stationary phase.

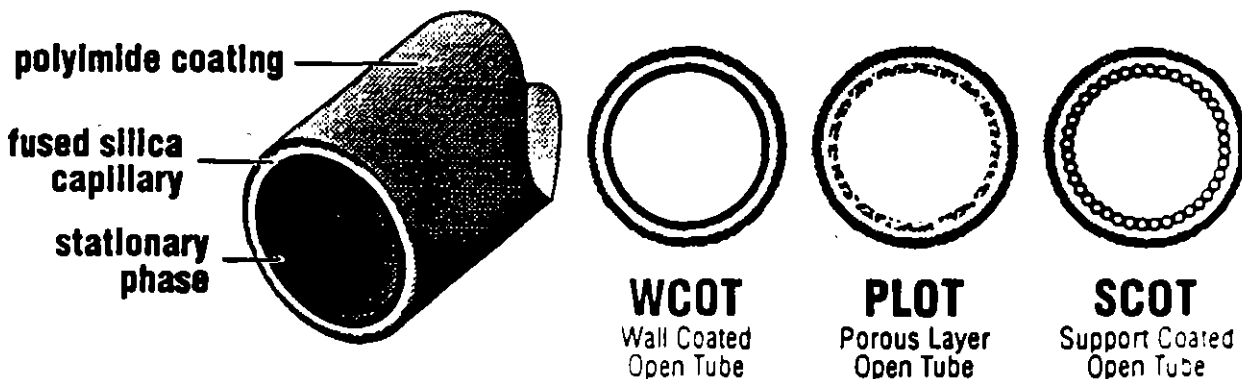
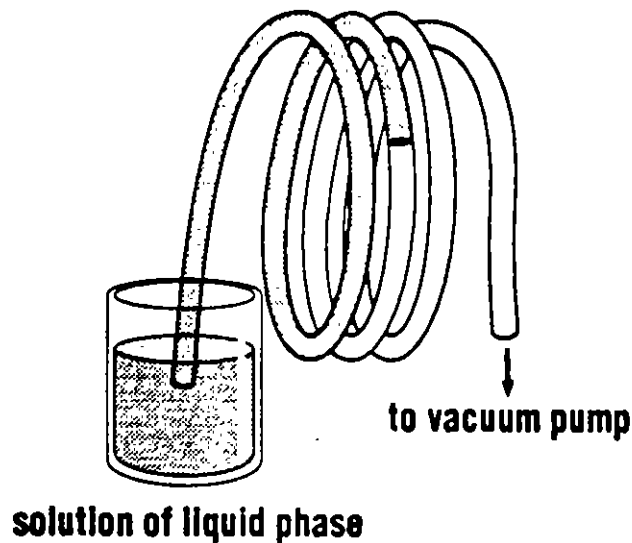


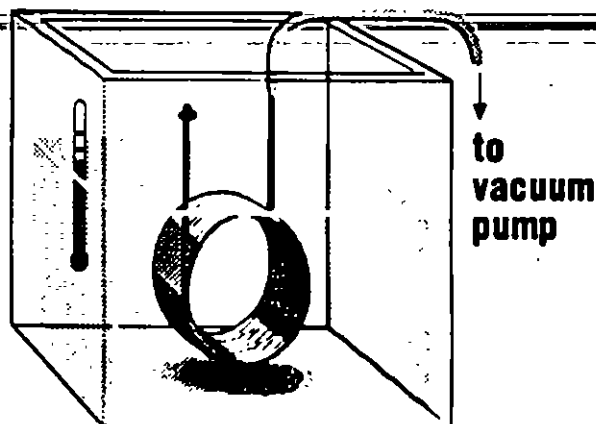
Figure 2-8: Cross-sectional view of a capillary column

# Coating Methods

- ***Dynamic method:*** pressure, evaporation, and conditioning.



- ***Static method:*** filling, vacuum evaporation, and conditioning.



---

## 2.6 Column Installation

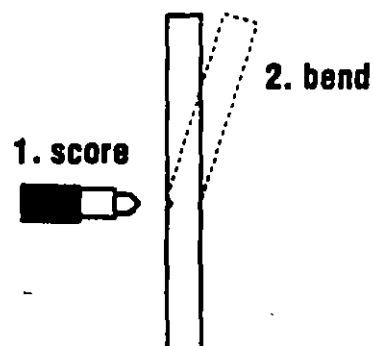
### **Cutting the Capillary Column**

---

1. Thread nut and ferrule over column.

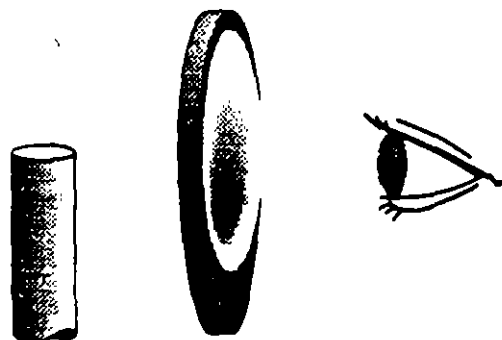


2. Use sharp scoring tool.



3. Inspect cut with eye piece.

*a jagged-edged column can disrupt carrier gas flow causing tailing and peak broadening.*



# Installation

The column should be inserted the measured amount specified for your injector and detector.

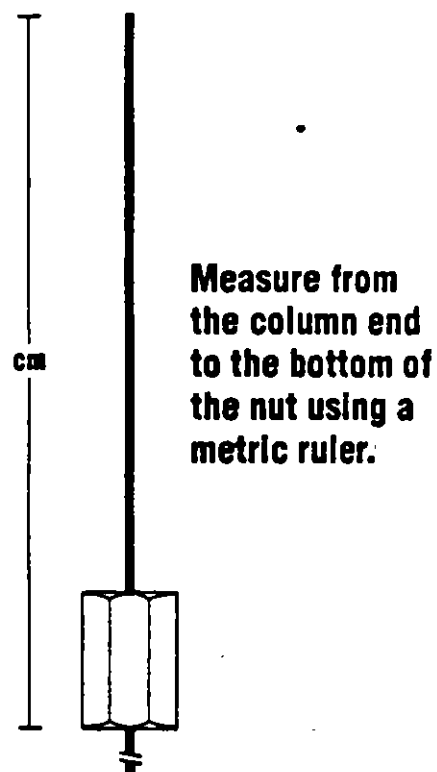


Figure 2-9: Measuring capillary column connection depths

3300, 3400 3600		3500	Injectors
11.5 cm	FID	8.7 cm	5.7 cm 1075
	TSD		1077
	FPD		
	PID		
9.5 cm	ELCD	6.4 cm	to stop all others
13.2 cm	ECD		
3.3 cm	TCD		

Table 2-4: Column insertion depths

# **Column Conditioning**

- Ensure carrier gas has been flowing through columns for at least 15 – 30 minutes.
- Slowly (5°/min.) ramp to conditioning temperature.
- Condition initially for  $\geq 4$  hours.
- If contaminated, condition at 20°C below maximum recommended column temperature.
- Normal recommended conditioning temperature:

$$T_{\text{cond}} = \frac{T_{\text{max}} - T_{\text{app}}}{2} + T_{\text{app}}$$

where

$T_{\text{cond}}$  = Conditioning temperature

$T_{\text{max}}$  = Maximum recommended temperature for column

$T_{\text{app}}$  = Maximum temperature of your application



# **Flow Rate Measurement**

- Use for carrier gas linear velocity (cm/s) and volumetric flow rate (cm<sup>3</sup>/min.).
- Measure retention time of unretained peak.

$$\text{linear velocity} = \mu = \frac{\text{column length}}{\text{air peak time}} = \frac{L \text{ (cm)}}{t_0 \text{ (sec)}}$$

$$\text{volumetric flow rate} = \frac{\text{cm}^3}{\text{minute}} = \frac{\pi r^2 L}{t_0}$$

- Recommended unretained compounds:

***Air*** – TCD, MS

***Butane*** – FID, TCD

***Methylene Chloride***\* – ECD

***Acetonitrile***\* – TSD

.....  
\* Headspace vapor.

---

## 2.7 Detectors

- Universal — respond to all classes of compounds, e.g. TCD, MS.
- Selective — Respond to limited classes of compounds, e.g. ECD, TSD.
- Sense some physical or chemical property.
- Respond to very low concentrations of components ( $\leq 1$  ng).
- Short response time ( $\leq 1$  second).
- Small voltage or current signal is amplified by detector electronics.
- Range and attenuation adjustments to control output signal.

# Range and Attenuation

- Both are time programmable.
- **Range**
  - amplifies original signal.
- Ranges indicate linearity of detector, e.g. FID —  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ .
- **Attenuation**
  - Binary attenuator with settings of 1, 2, 4, 8 ... 1024.
  - Divides the output signal by the chosen value.

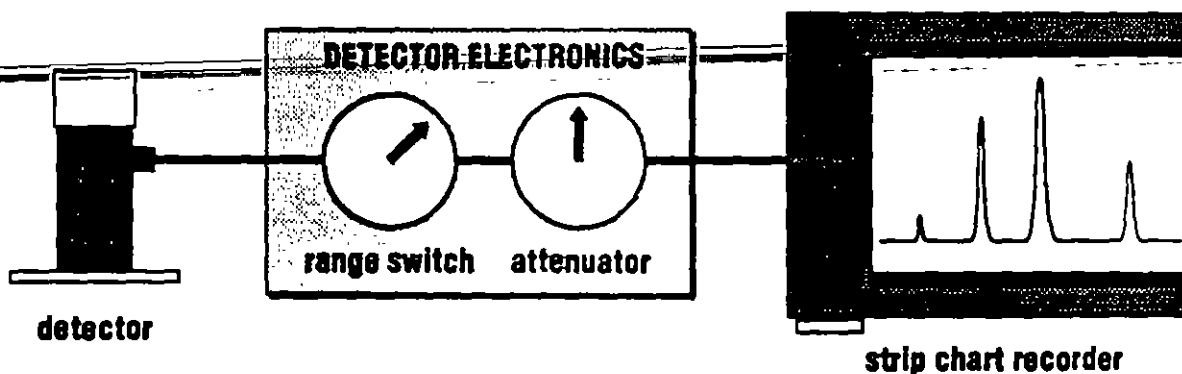
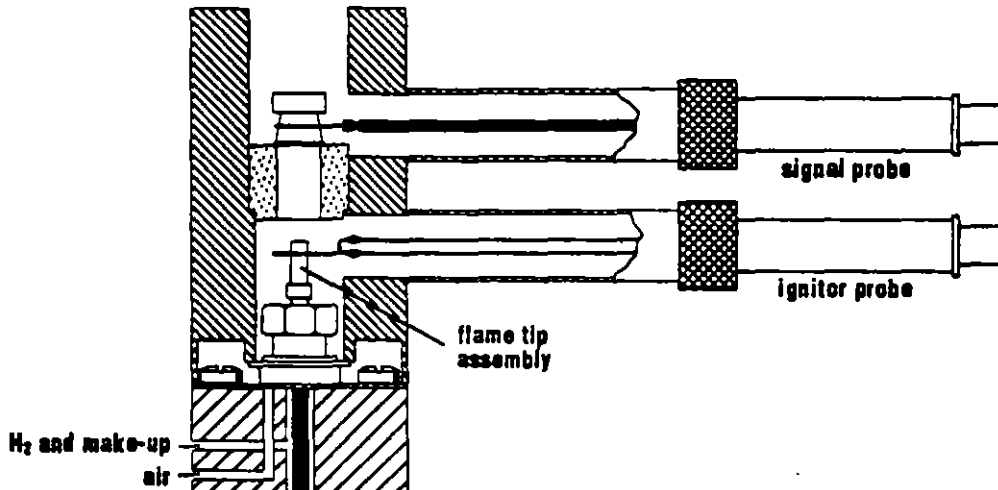


Figure 2-10: Range and attenuation

# FID

- Universal detector for organic molecules.
- Destructive detector — burns sample.



## *Theory:*

- A potential is applied between the flame tip and the collector (electrodes).
- Organic compounds are burned in the flame (2000°F).
- Ionic intermediates and electrons are formed between the electrodes.
- Charged species are attracted to and captured by the collector.
- Ion current is amplified and recorded.

## Response

- Number of ions is proportional to the number of carbon atoms (C-H bonds).
- Functional groups such as carbonyl, alcohol, halogen, and amine produce fewer ions or none at all.
- Insensitive to inorganic gases H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, and NO<sub>x</sub>.

## Flame

- Plumbed with air and hydrogen.
- Electrically ignited at controlled flow rates (heated coil).
- Invisible flame — unless contaminated.

Gas	Common Flow Rate (ml/min)
hydrogen	30 ± 1
air	300 ± 5
carrier	1-10 (capillary) or 30 ± 1 (packed)
makeup	20-29 (capillary)

Table 2-5: FID flow rates

## 2.8 GC Electronics

- **Micro processor controlled (CPU)**

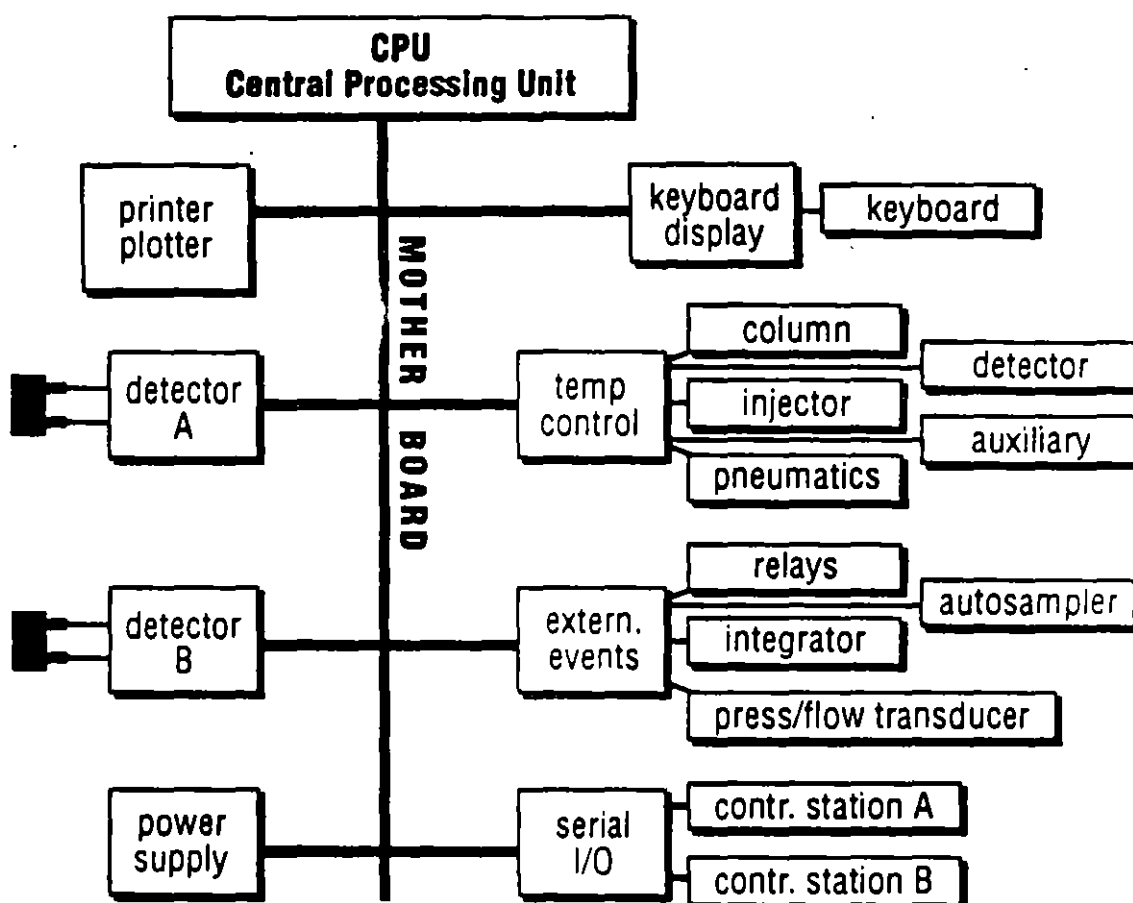
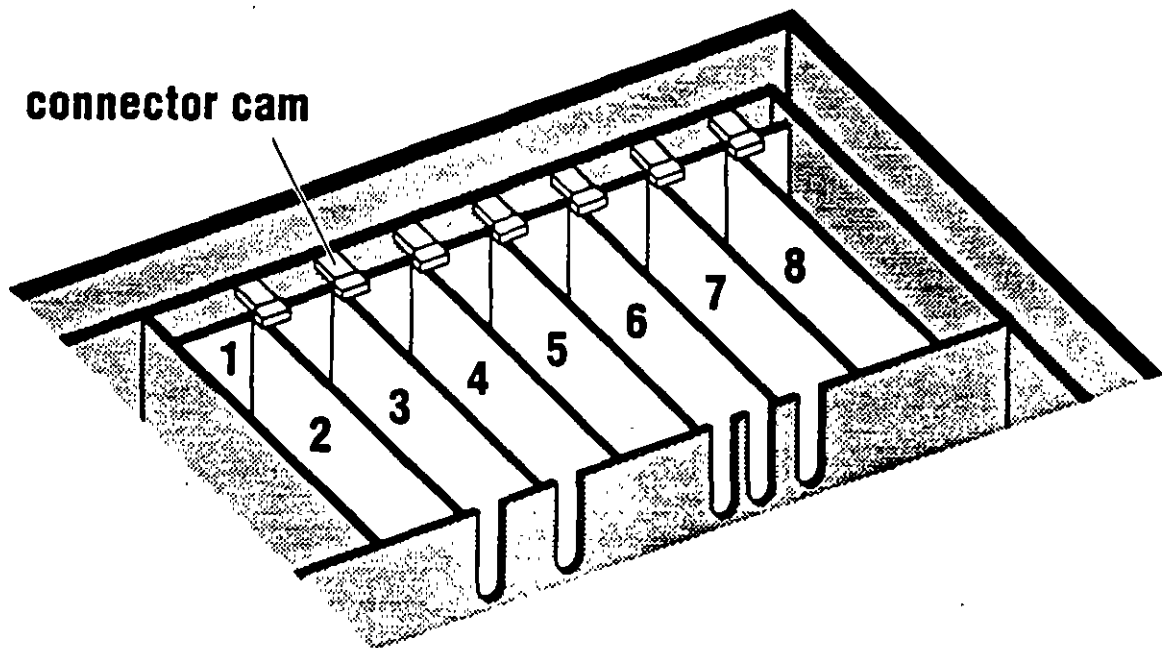


Figure 2-11: Electronics block diagram

- **Motherboard**
  - Interconnect board, power, and signal distribution
- **Central processing unit (CPU)**
  - Microprocessor control, memory, data handling

- **Keyboard and keyboard display**
  - User interface with GC
- **Power supply — basic supply voltages**
  - Monitors line voltage
  - Distributes power to other boards
- **Temperature control**
  - Monitors and controls heated zones
  - Injector, detector, and column ovens
  - Auxiliary (second injector or detector oven)
  - Pneumatics oven (constant 50°C)
  - Controls coolant solenoid
- **Detector boards**
  - Monitors detector signal
  - Range and attenuation
  - Output signal to chart recorder, data system
- **External events / autosampler board**
  - Control switching relays (1077, 1075, valves)
  - Pressure and flow transducers
  - Autosampler control
- **Serial I/O board**
  - Input / output to external data system
  - RS232 interface

# **Electronic Layout**



## **LEGEND**

- 1 mother board**
- 2 detector A board**
- 3 detector B board**
- 4 CPU board**
- 5 serial I/O board**
- 6 power supply board**
- 7 temperature control board**
- 8 external events/autosampler board**

**Figure 2-12: Printed circuit board locations**



---

## 2.9 The Keyboard and Display

- Configure the GC — heated zones, options.
- Build methods (up to four).
- Run instrument tests.
- Quickly change temperatures of heated zones / detector parameters.
- Control auto sampler or printer / plotter.
- Monitor conditions / fault messages.

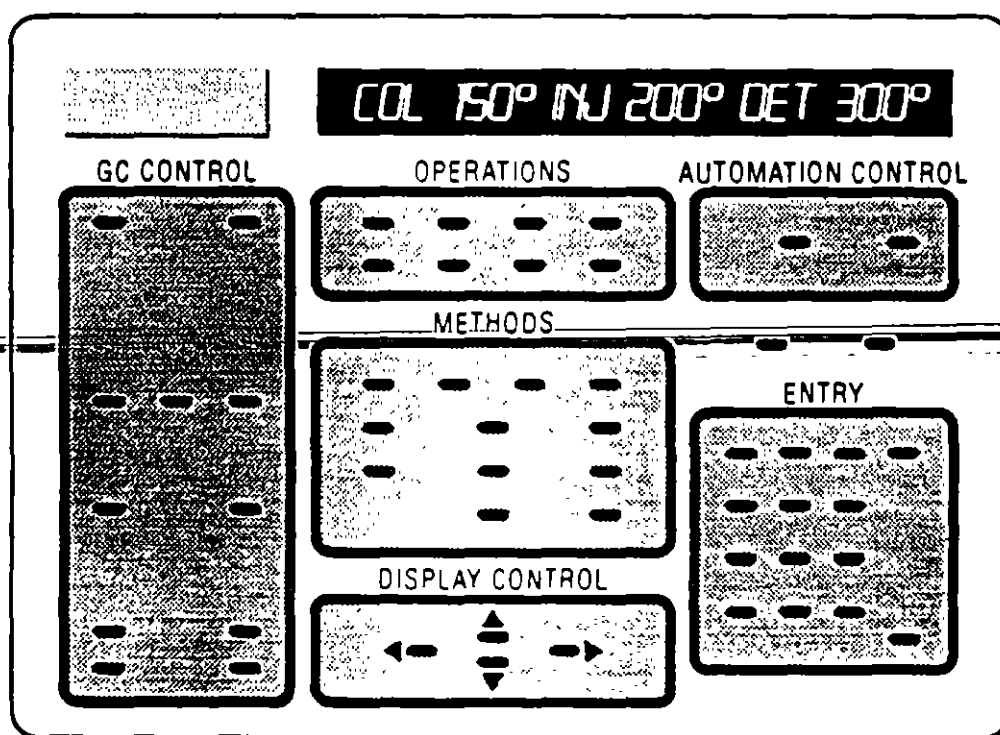


Figure 2-13: Keyboard and display

---

## 2.10 Data Output Devices

- Convert raw signal into usable data.
- Internal or external devices.
- Strip chart recorder — plots chromatogram.
- IBDH (in board data handling).
  - Basic integration and report.
  - Area %, normalized %, external/internal standard.
- External integrator.
  - Similar to IBDH integration.
  - Stores multiple runs.
  - Post-run recalculation.
- Workstation — PC-based, provide advanced integration, calculation, reporting, and GC instrument control.

# **The Injector and Column System**

---

- 3.1 Column Dimensions**
- 3.2 Liquid Stationary Phases**
- 3.3 Solid Supports**
- 3.4 Solid Stationary Phases**
- 3.5 The Partition Ratio and Coating Efficiency**

---

- 3.6 Packed Column Injectors**
- 3.7 Capillary Column Injectors**

---

# 3.1 Column Dimensions

## Column Length

- Only large length adjustments affect resolution.
- Packed columns are typically 2 – 3 m.
- Capillary columns are typically 15 – 30 m.
- 60m may be necessary for >100 components.
- Capillary columns may be cut to the desired length.

## Column Internal Diameter

- Packed columns fixed at 2 mm ID.
- Capillary columns vary from 0.10 – 0.8 mm ID.
- Affects column efficiency, retention, capacity.
- Smaller IDs have lower bleed and lower capacity.

# **ID Suggestions**

- 0.25 mm for split/splitless or on-column injection, if analyte overloading is not a problem.
- 0.32 mm for splitless or on-column injection when more concentrated samples are being analyzed.
- 0.53 mm if you are replacing a packed column and are separating fewer than 30 components.

<b>Column ID</b>	<b>Flow Rate (20 cm/sec helium)</b>	<b>Flow Rate (40 cm/sec hydrogen)</b>	<b>Sample Capacity</b>	<b>Theoretical Plates/m</b>	<b>Effective Plates/m</b>
<b>0.18 mm</b>	0.3 ml/min	0.6 ml/min	<50 ng	5,300	3,900
<b>0.25 mm</b>	0.7 ml/min	1.4 ml/min	50–100 ng	3,300	2,500
<b>0.32 mm</b>	1.2 ml/min	2.4 ml/min	400–500 ng	2,700	2,100
<b>0.53 mm</b>	2.6 ml/min	5.2 ml/min	1–2 µg	1,600	1,200

**Table 3-1: Typical capillary column characteristics**

# **Film Thickness**

- Amount of stationary phase coating.
- Affects retention and capacity.
- Thicker films increase retention and capacity.
- Thin films are useful for high boilers.
- Standard capillary columns typically 0.25  $\mu\text{m}$ .
- 0.53mm ID columns typically 1.0 – 1.5  $\mu\text{m}$ .
- Packed columns typically  $>10 \mu\text{m}$ .

# Phase Ratio

$$\beta = \frac{r}{2d_f}$$

where

$r$  = column radius in  $\mu\text{m}$

$d_f$  = film thickness in  $\mu\text{m}$

---

For the same stationary phase, column temperature, and sample, a smaller phase ratio will yield better separation.

# Column Capacity

Column capacity is the maximum amount of sample that can be injected onto the column without significant peak distortion.

*Column capacity increases with:*

- film thickness ( $d_f$ ).
- temperature.
- internal diameter (ID).
- stationary phase selectivity.

*if exceeded, results in:*

- peak broadening.
- asymmetry.
- leading edge or tailing.

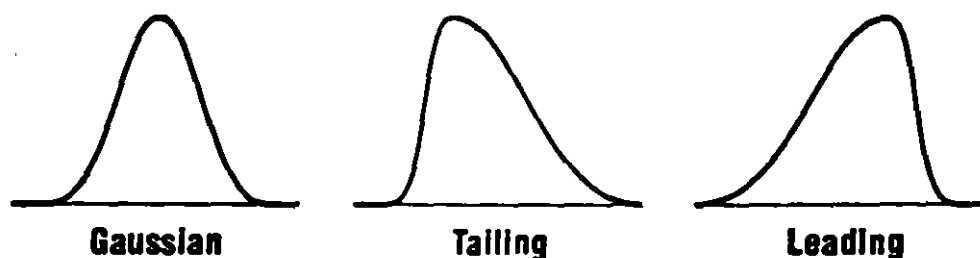


Figure 3-1: Peak shapes

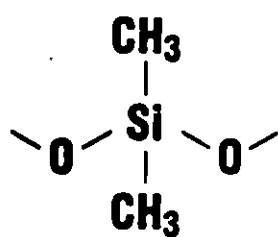
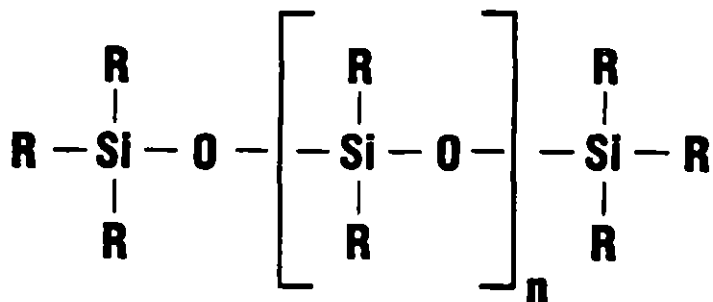


## 3.2 Liquid Stationary Phases

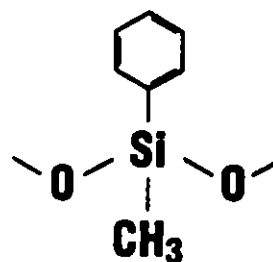
---

- Choice of phase determines column selectivity.
- Hundreds of phases available, particularly for packed columns.
- Many phases give same separation — polarity differences are minimal.
- Same phase may have multiple brand names.
- Stationary phase selection for capillary columns is much simpler.
- "Like dissolves like"
  - Use polar phases for polar components.
  - Use non-polar phases for non-polar components.
- Polarity represents separation of charge.
  - Presence of dipole moment.

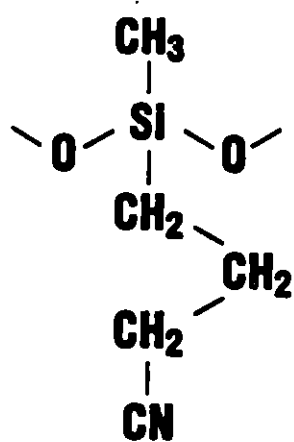
# Siloxane Backbone



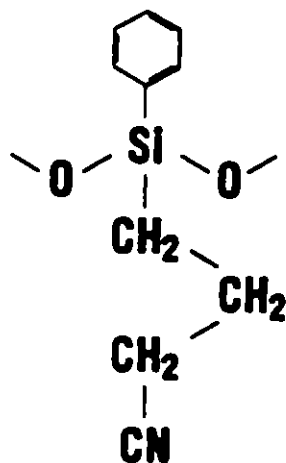
methyl



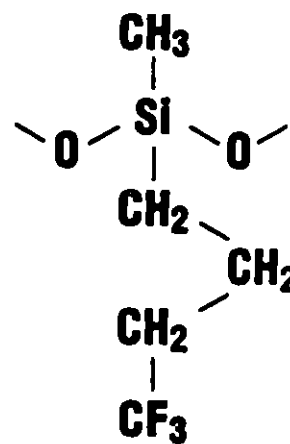
phenyl



cyanopropyl



cyanopropylphenyl



trifluoropropyl

Figure 3-2: Stationary phase substitution

# 7

## 25

# **Backbone Substitution**

- Amount and type of substitution determines phase type.
- Increased substitution decreases thermal stability.
- To increase polarity use phenyl, cyanopropyl, cyanopropylphenyl, or trifluoropropyl substitution.
- Polar polyethylene glycol phases are also common.



- Bonded and cross-linked phases improve thermal stability.

<b>Composition and Description</b>	<b>Equivalent Packed Column Stationary Phase</b>	<b>Equivalent Capillary Column Stationary Phase</b>
<b>100% Methyl substitution</b> Least polar.	OV-1, OV-101, SP-2100, DC-200, UC-W982, S96, CP-SIL 5, SE-30	DB-1, HP-1, HP-101, Ultra-1, SPB-1
<b>5% Phenyl, 95% Methyl substitution</b>	OV-3, OV-73, Fluorolube, CP Sil 8	DB-5, HP-2, Ultra-2, SPB-5, CP-Sil 8CB
<b>6% Cyanopropylphenyl, 94% Methyl substitution</b>		DB-1301
<b>14% Cyanopropylphenyl, 86% Methyl substitution</b>	OV-1701	DB-1701, SPB-7, CP-Sil 19CB, Rtx-1701
<b>50% Phenyl, 50% Methyl substitution</b> Moderate increase of polarity. Drug, pesticide, biochemical.	OV-17, OV-11, OV-22, SP-2250, DG-710	DB-17, HP-17, RSL-400, Rtx-50, PE-17, 007-17, SP-2250
<b>50% Trifluoropropyl, 50% Methyl substitution</b> Moderate polarity. Pharmaceuticals.	OV-210, OV-202, OV-215, QF-1, SP-2401	DB-210, RSL-500, SP-2401
<b>50% Cyanopropylphenyl, 50% Methyl substitution</b> High polarity.	OV-225, Silar 5 CP	DB-225, HP-225, SP-2330, CP-Sil 43CB, RSL-500
<b>Polyethylene Glycol</b> High polarity. Alcohol, Phenol, Hydrogen bonders.	Carbowax 20M, Superox, Supelcowax 10, PEG	DB-WAX, HP-20M, Supelcowax 10, CP-Wax 52CB, Superox II
<b>Polyethylene Glycol</b> Acid modified.	OV-351, FFAP, Carbowax 20M-Terephthalic Acid	DB-FFAP, HP-FFAP, Nukol, Superox FA, Stabilwax-DA
<b>50% Cyanopropyl, 50% Methyl substitution.</b>	SP-2310, SP-2330, CP-SIL 58	DB-23, SP-2330, Rtx-2330, PE-CPS-1, 007-CPS-1

**Table 3-2: Stationary phase cross-reference in order of increasing polarity**

# **Column Bleed**

Seen as the normal background signal from the detector. Bleed is caused by a breakdown of the stationary phase.

- Bleed increases with film thickness, column diameter, length, and temperature.
- Polar columns have higher bleed.
- Bleed is excessive when the column is damaged or degraded — *avoid leaks!*
- Avoid strong acids and bases.
- Adhere to manufacturer's recommended temperature limits.

<b>Strong Acids</b>	<b>Strong Bases</b>
HCl	KOH
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> OH
HNO <sub>3</sub>	

**Table 3-3:** Strong acids and bases

# **Temperature Limits**

**Lower Limit:** Phase takes on properties of a solid, is less efficient, but undamaged.

**Isothermal Upper Limit:** Highest recommended temperature for isothermal operation.

**Programmed Upper Limit:** Should only be reached for short periods, typically 20°C above isothermal limit.

*Excessive peak tailing and column bleed are noticeable on a thermally damaged column.*

## **Summary: Choosing a Liquid Stationary Phase**

- Match polarity of sample components to phase chosen.
- Non-polar phase columns last longer — choose least polar phase that gives adequate separation.
- For general-purpose GC, a slightly polar phase such as DB-5 is common.
- Avoid phases with elements that respond in your detector.
- Use polyethylene glycol phases for hydrogen-bonding samples.
- Gas analyses may require a solid stationary phase.

## 3.3 Solid Supports

- Chromasorb™ series is most popular.
- Used in packed and SCOT columns.

<b>Chromasorb™ Solid Supports</b>	<b>Description</b>
<b>P</b>	Pink, least inert, highest efficiency
<b>W</b>	White, more inert, but less efficient than Chromasorb™ P, for drugs, pesticides, and biochemicals
<b>G</b>	Lower surface area, more inert and rugged than W, general-purpose
<b>A</b>	Similar to Chromasorb™ P, but higher surface area, for gaseous samples
<b>W-HP</b>	High performance, acid washed to minimize absorptive sites, good for steroids, carbohydrates, pesticides, etc.
<b>T</b>	Teflon-based, for separating very polar compounds — H <sub>2</sub> O, acetic acid, NH <sub>3</sub> , sulfur gas, etc.

**Table 3-4:** Chromasorb™ solid supports



---

## 3.4 Solid Stationary Phases

- GSC is primarily used for gaseous samples.
- Fewer solid support adsorptive sites to cause tailing.
- No liquid phase column bleed.

<b>Material</b>	<b>Application</b>
<b>charcoal</b>	gaseous mixtures, hydrocarbons
<b>alumina</b>	gaseous mixtures, C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub>
<b>silica gel</b>	carbon dioxide, hydrocarbons
<b>molecular sieve</b>	O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , CO
<b>porous polymer</b>	gases and polar compounds

Table 3-5: Solid stationary phases

# **Porous Polymers**

- Porapak<sup>®</sup> and Hayesep<sup>®</sup>.
- Ethylvinylbenzene cross-linked with divinylbenzene.
- Can be modified by copolymerization with polar monomers.
- Available in many pore and mesh sizes.

---

## 3.5 The Partition Ratio and Coating Efficiency

### Partition Ratio

Ratio of time spent in stationary phase versus mobile phase:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

where

---

$t_R$  = retention time of component

$t_0$  = time for unretained air peak

# **Coating Efficiency**

Coating efficiency is the comparison of the actual column efficiency to the theoretical maximum column efficiency.

- Thinner films have higher coating efficiencies.
- Non-polar column has typical coating efficiency of 90 – 100%.
- Polar column has typical coating efficiency of 60 – 80%.

$$CE\% = \frac{\text{actual } N_{\text{eff}}}{\text{theoretical } N_{\text{eff}}} \times 100$$

or

$$CE\% = \frac{\text{theoretical HETP}}{\text{actual HETP}} \times 100$$

**Example:** Given the chromatogram shown and a column ID of 0.53 mm, a film thickness of 0.25  $\mu\text{m}$ , and a column length of 15.0 meters, calculate

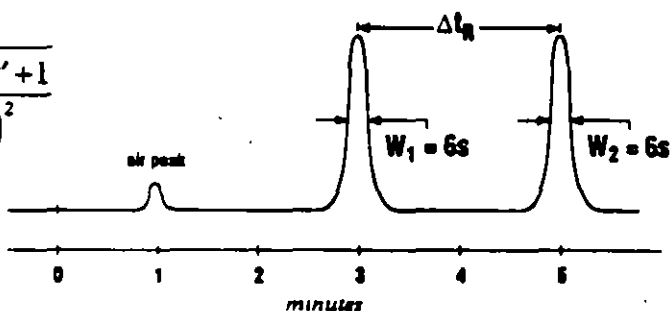
(a) phase ratio,

(b) partition ratio,

(c) coating efficiency.

Use the Golay-Giddings equation to determine the theoretical HETP:

$$HETP_{theor} = r \sqrt{\frac{11k'^2 + 6k' + 1}{3(1+k')^2}}$$



(a)

$$\beta = \frac{265 \mu\text{m}}{2(0.25 \mu\text{m})}$$

$$\beta = 530$$

(b)

$$k' = \frac{6 \text{ min.} - 1 \text{ min.}}{1 \text{ min.}}$$

$$k' = 5$$

(c)

~~$$N_{eff} = 5.54 \cdot \left( \frac{300 \text{ sec.}}{6.0 \text{ sec.}} \right)^2 \left( \frac{11 \times 5^2 + 6 \times 5 + 1}{3(1+5)^2} \right)^{-1/2}$$~~

~~$$N_{eff} = 13,850$$~~

~~$$HETP_{meas} = \frac{1500 \text{ cm}}{13,850}$$~~

~~$$HETP_{meas} = 0.11 \text{ cm}$$~~

$$HETP_{theor} = 0.0265 \text{ cm} \sqrt{\frac{11 \times 5^2 + (6 \times 5) + 1}{3(1+5)^2}}$$

$$HETP_{theor} = 0.045 \text{ cm}$$

$$CE\% = \frac{0.045 \text{ cm}}{0.11 \text{ cm}} \times 100$$

$$CE\% = 41\%$$

---

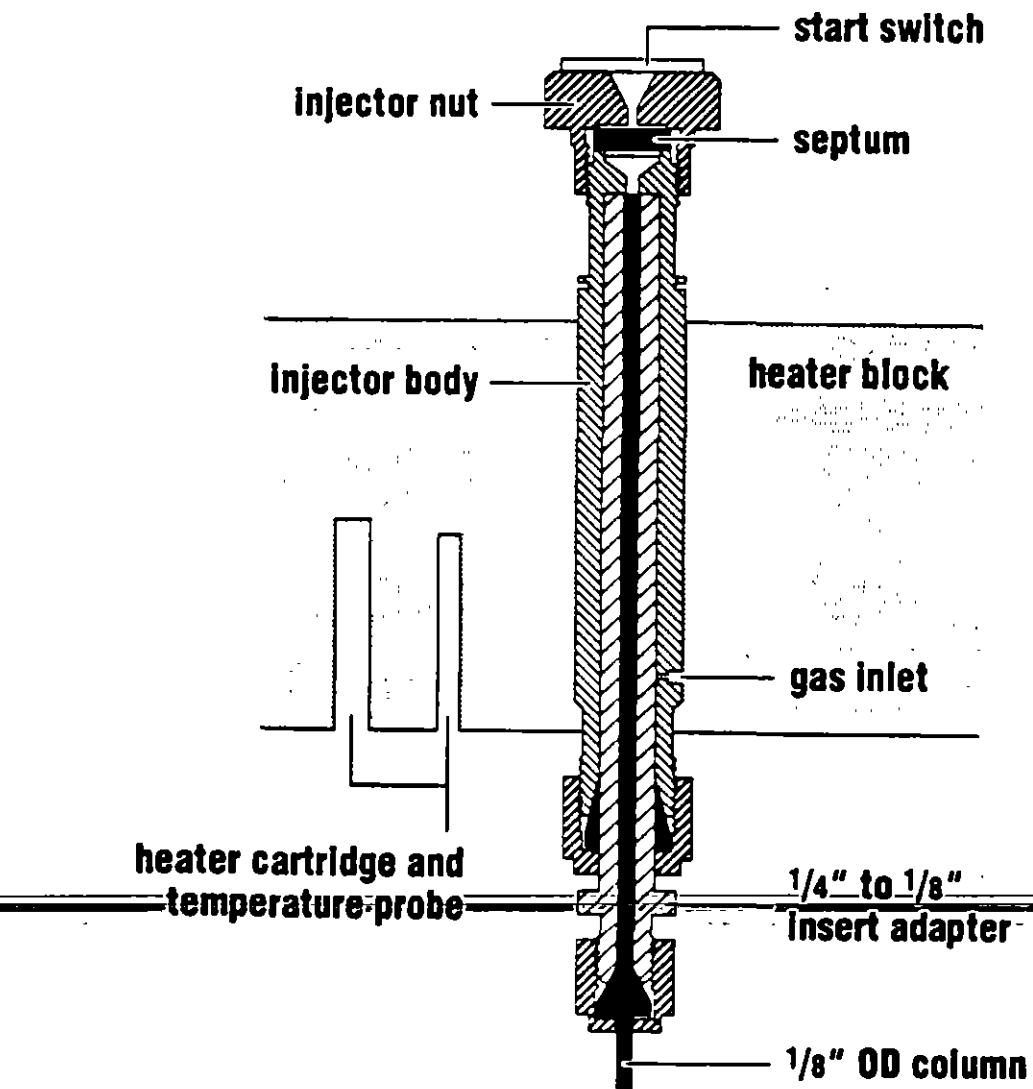
## 3.6 Packed Column Injectors

- On-column injection
- Flash-vaporization

### **On-Column**

- Liquid sample is injected directly onto the head of the column.
- Eliminates sample loss during vaporization.
- Eliminates sample loss during transfer from injector to column.
- Allows for a wide volatility range of samples.
- Accuracy for thermally labile compounds.
- Excellent quantitative precision.
- Best with clean and dilute samples.

# **Model 1040**



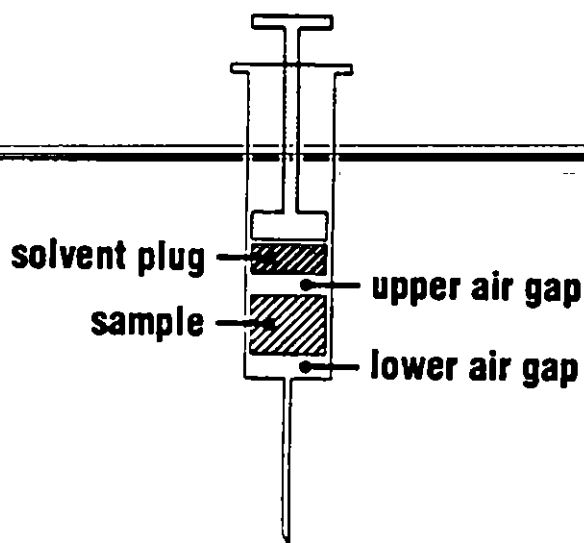
# **Model 1040**

- Packing is removed from the front end of column.
- Column is installed up to the septum.
- Sample is deposited by syringe where packing begins.
- Designed for 1/8" or 1/4" OD packed columns.
- Conversion fitting will allow large bore capillaries.
- The injector should be set at or slightly above the column oven temperature for isothermal analysis.



# **Sandwich Injection**

1. Flush the syringe with clean solvent.
2. Expel solvent and retract the plunger (in air) to the 1.0  $\mu\text{l}$  mark.
3. Draw several microliters of sample into the syringe barrel, remove syringe from sample vial and expel sample until the plunger is at 2  $\mu\text{l}$ .
4. Retract the plunger, pulling the needle load entirely into the barrel and note the volume of the sample plug.
5. Insert needle into the injector, inject the sample and quickly remove the syringe.



**Figure 3-2:** Sandwich injection technique

# **Injection Speed**

- Injection speed can affect solvent peak tailing and resolution.

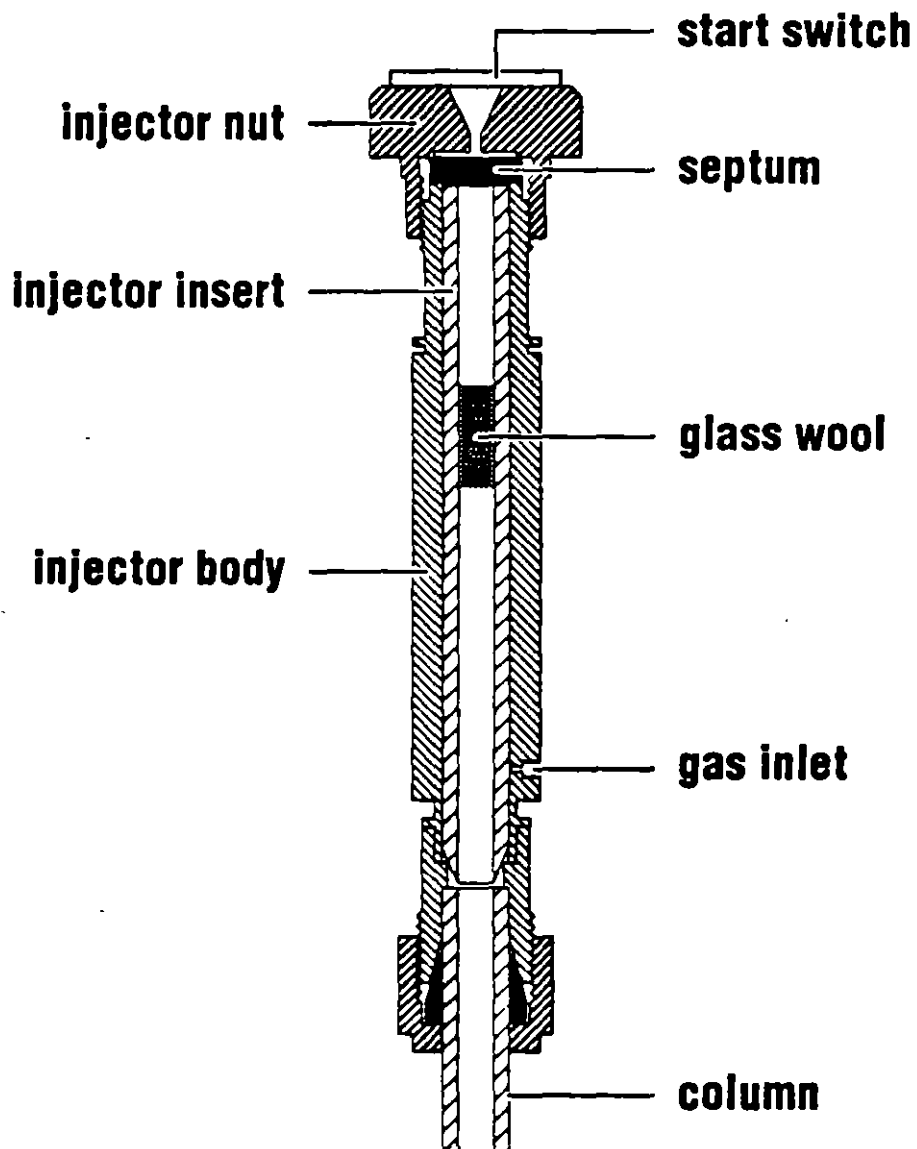
<b>Sample Size</b>	<b>Injection Speed</b>
0.5–1 $\mu$ l	5–10 $\mu$ l/sec
$\geq 1$ $\mu$ l	1–5 $\mu$ l/sec

**Table 3-6: Injection speeds**

# **Flash-Vaporization**

- For concentrated or dirty samples.
- Column connects at bottom of injector.
- Column remains completely packed.
- Sample vaporizes in the glass liner.
- Injector should be at least 50°C above the column oven temperature.
- Can be modified for use with large bore capillaries.

# Model 1060



---

## 3.7 Capillary Column Injectors

- Requires different hardware and techniques.
- Direct injection.
- Split/splitless injection.
- On-column injection.

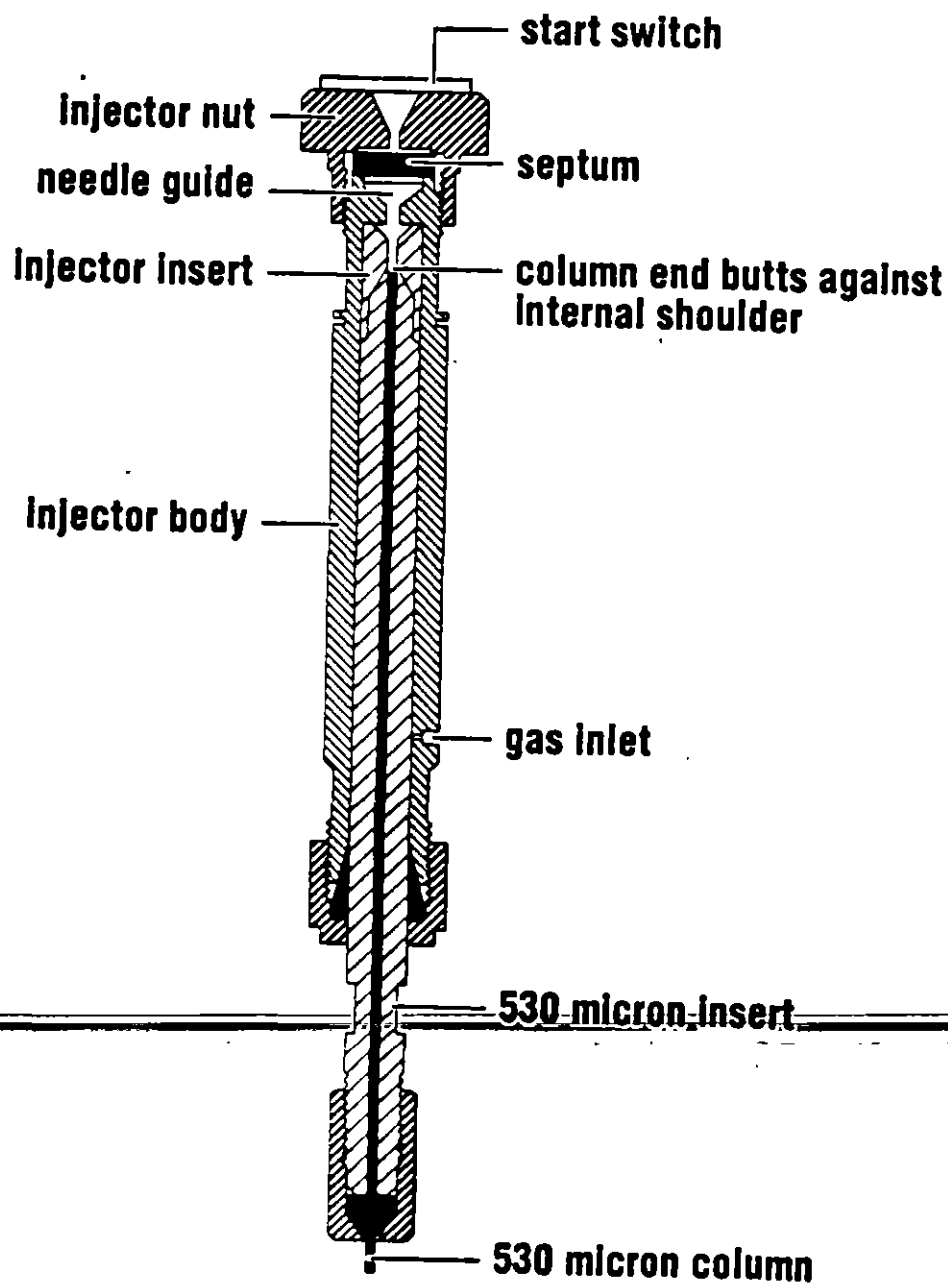
### **Direct Injection (On-Column or Flash Vaporization)**

- Large bore ( $\geq 0.53$  mm ID) only.
- Complete syringe contents transferred to column.
- Allows slow injection of large volume ( $\geq 2$   $\mu$ l) of dilute samples.
- Relatively low injector temperature may be used.

# **On-Column (Capillary)**

- Designed for use with 0.53 mm ID columns.
- Injector insert used to reduce the internal diameter of the injector.
- Use a retention gap and press-fit connection to adapt to narrow bore columns.
- Injector should be set at or slightly above the column oven temperature.

# **Model 1041**



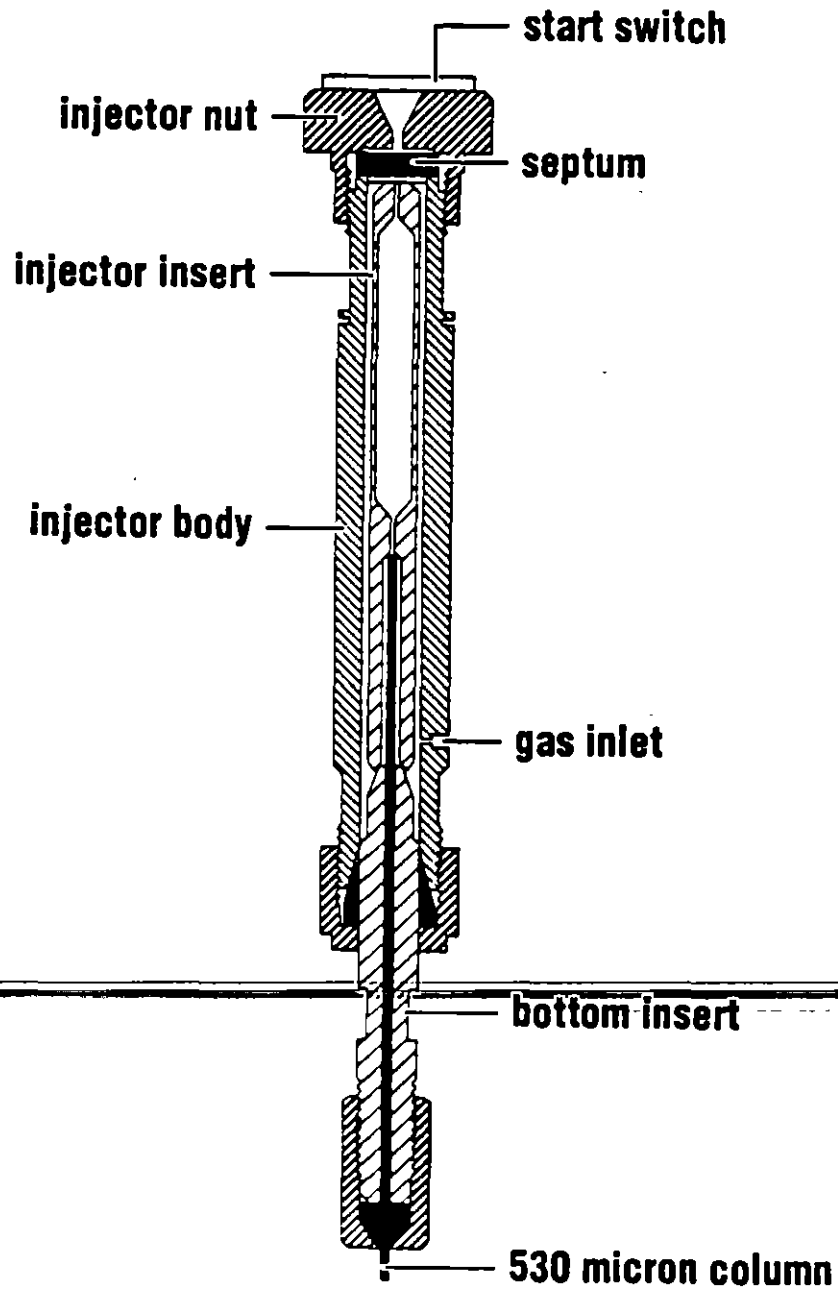
# **Flash Vaporization (Capillary)**

---

- Flash-vaporized, direct injection.
- Designed for use with 0.53 mm columns.
- Use a retention gap and press fit connection to adapt to narrow bore columns.
- Sample vaporizes in the glass insert.
- Column butts against restriction in lower portion of the insert.
- Injector temperature should be at least 50°C higher than the column oven (isothermal analysis).



# **Model 1061**



# **Split/Splitless Injection**

- Models 1075 and 1077 (pneumatics differ).
- Designed for narrow to large-bore fused silica columns 0.1 – 0.53 mm ID.
- Operate in either mode — split or splitless.

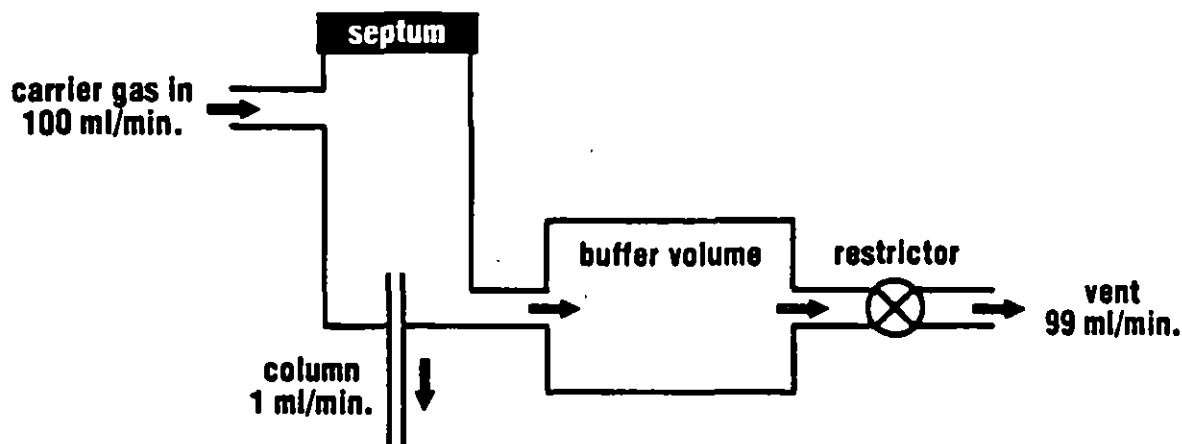
## **Split**

- Allows only a representative fraction of the sample into the column.
- Used when components of interest are highly concentrated.

## **Splitless**

- Acts like a direct injector.
- Deposits most of the sample on the column.
- Most popular capillary injection technique.

# Splitter



- Samples a representative fraction that could not be measured by syringe.
- Reproducible split ratios.
- Sample vaporizes in a glass insert.
- Homogeneous vaporized sample passes over the split point (column tip).
- Buffer volume provides expansion space to decrease viscosity changes.
- *Mass discrimination* may be a problem.

.....

**Mass discrimination:** Lower response to higher molecular weight components — non-uniform vaporization.

## **Split Ratio**

- $S.R. = \frac{\text{vent} + \text{column flow}}{\text{column flow}}$
- Split ratio used is determined by sample complexity and concentration.

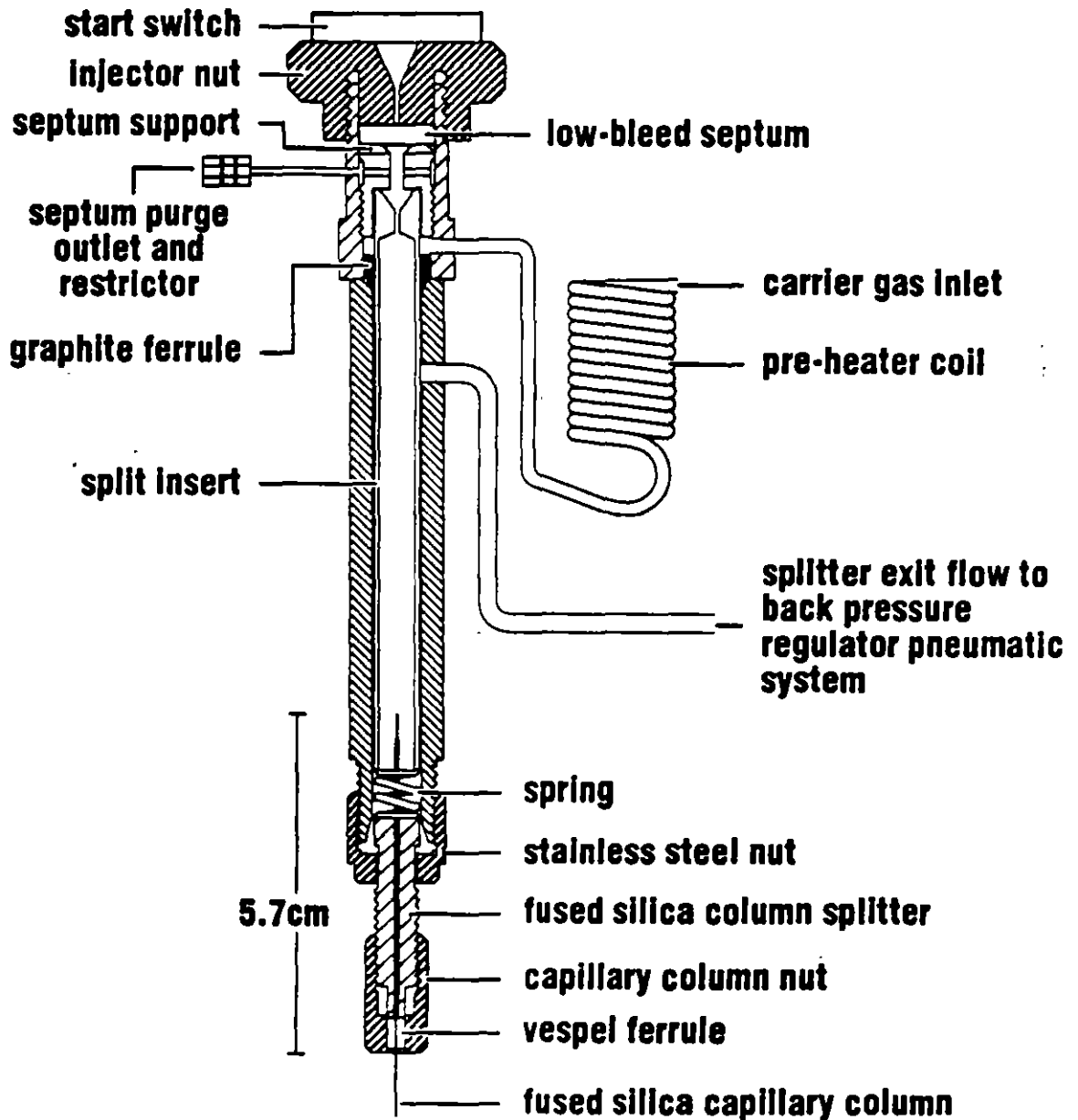
## **Septum Purge**

- 2 – 5 ml/min of carrier gas directed across underside of septum.
- Removes residual sample and solvent.
- Controlled by a fritted restrictor or needle valve.
- Used in all dedicated capillary injectors.

# **Model 1077**

- Back-pressure/flow controlled pneumatics.
- Flow controller sets total amount of carrier gas exiting the split vent, septum purge, and column.
- Back pressure regulator permits flow from split vent at a controlled pressure.
- Back pressure regulator controls the column flow rate.
- Three-way solenoid valve directs most of carrier flow either through injector (split) or to vent (splitless).
- Flow through split vent remains constant in split or splitless modes.

# **Model 1077**



# Pneumatics of 1077 Injector

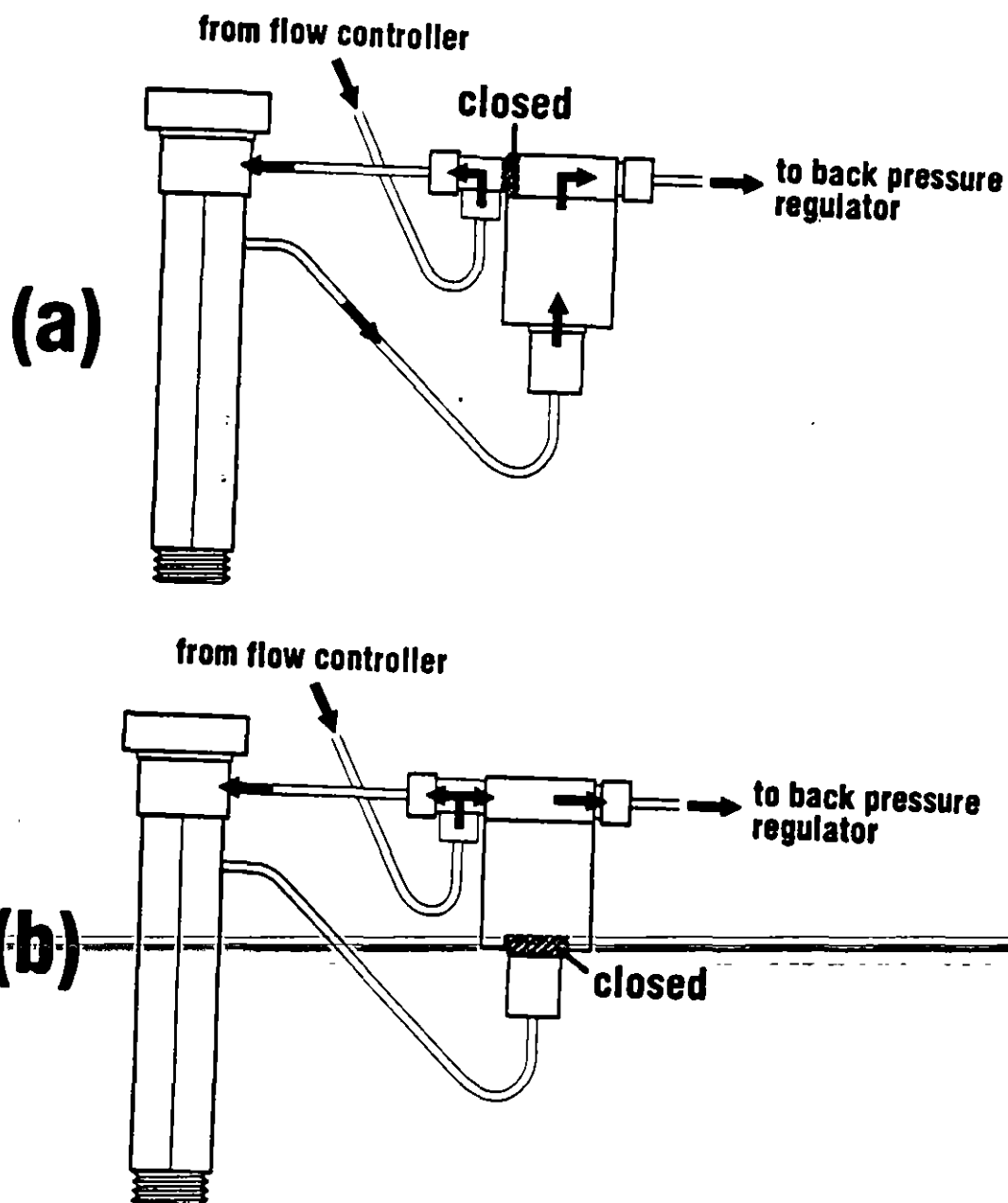


Figure 3-3: 1077 in the split (a) and splitless (b) modes

# Injector Inserts

Insert	Technique	Function
Open	splitless	Narrow bore allowing close contact between sample vapor and column entrance ensuring sample reconcentration
Frit	split	Sintered glass frit for linear splitting, sample mixing, instantaneous vaporization
Packed	split	Packed with Chromasorb™ W-HP for non-volatile or dirty samples

Table 3-7: 1075/1077 injector inserts

- Several designs are used for split mode.
- More surface area reduces mass discrimination.

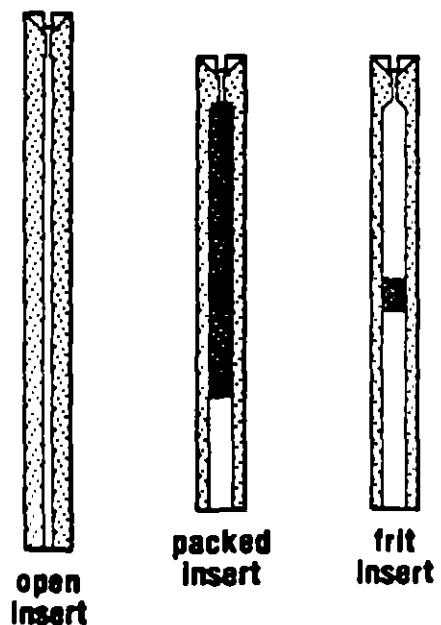


Figure 3-4: 1075/1077 injector inserts



# **Split Injection Guidelines**

- Injector temperature should be at least 20°C higher than the highest boiling components for efficient and reproducible vaporization.
- Use a fast injection speed without preheating needle and remove needle immediately following injection. An autosampler should be used for reproducible injections.
- Injection volume should be 1 µl or less.
- If temperature programming, the initial column oven temperature should be just above the solvent boiling point; the ramp should be started immediately after injection.
- Be certain the septum purge is uncapped and set to 2 – 5 ml/min.

# **Splitless Injection Guidelines**

---

- Switch to splitless mode. All injector flow will be through column and septum purge.
- Set injector temperature at the boiling point of the highest boiling component.
- Inject sample slowly using sandwich technique. Preheat needle in the injector .05 min. Use an injection rate of 1.0  $\mu$ /sec. Leave syringe in injection port several seconds to ensure complete vaporization.
- Start column oven 20°C lower than solvent boiling point, hold for 1 min., ramp at 30°C/min to 40 – 60°C above solvent boiling point and continue program as required for the sample.
- Use a sampling time of 0.5 – 1.0 minutes. The injector is then switched to split mode to flush. The vent flow should be set to at least 50 ml/min.
- Make sure the septum purge is uncapped and set to 2 – 5 ml/min.

# **Splitless Sampling Time**

To determine the relay timing for a splitless injection, follow these guidelines:

- First run a chromatogram without turning on the vent.
- Look at the profile of the solvent tail and leading edge of first peak.
- Time the relay for between the solvent tail and first leading edge.
- If peak areas decrease, increase the time of the relay.
- If unchanged or increased peak areas, decrease the time of the relay until peaks decrease.

---

## **Relay Control on GC**

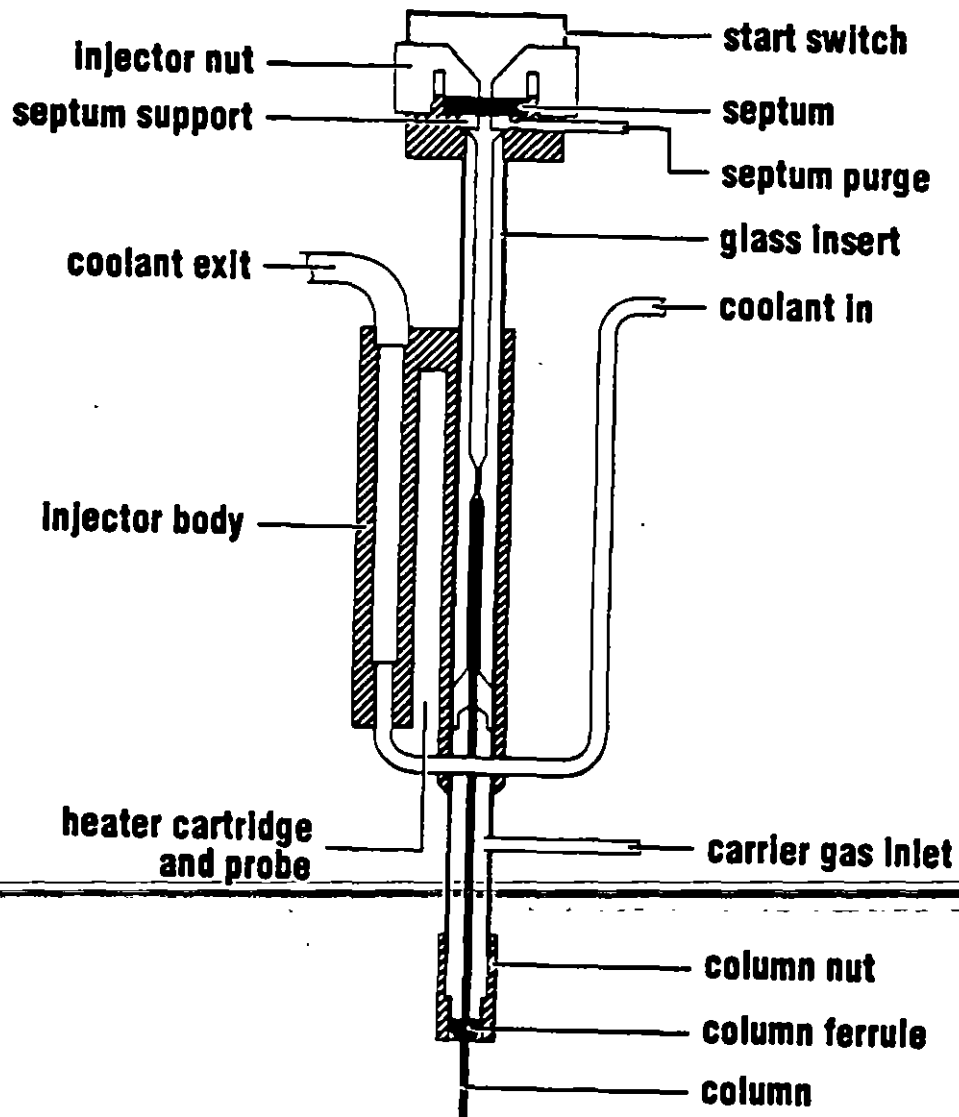
- For 1077, -1 indicates split and +1 indicates splitless.
- For 1075, -1 indicates splitless and +1 indicates split.

# **Temperature Programmable Injection**

---

- Cryofocusing of analytes.
- Heating rates from 20° – 180°C/minute.
- Liquid carbon dioxide, liquid nitrogen, or air used for cooling.
- Manual or autosampler injections.
- Flow-controlled or pressure-regulated pneumatics.

# SPI Injector



# **SPI Advantages**

- Designed for labile or high molecular weight samples.
- Replaces cold, on-column, or programmable vaporizer injectors.
- Direct, loss-free injection on-column.
- Eliminates molecular weight discrimination, thermal decomposition, sample adsorption onto hot surfaces.
- Improved peak resolution.
- Improved quantitation.
- Minimized sample tailing.
- Can be used as an isothermal injector.
- Trace and semi-trace analyses.

# **SPI Inserts**

Insert	Technique	Comments
high performance	analogous to on-column	For 0.10–0.32 mm ID columns; most widely used
large bore on-column	on-column into large bore	For 0.53 mm ID or larger; can be inverted
packed	for dirty samples or routine use	For 0.53 mm ID or larger; packed with glass wool

Table 3-8: 1093/1094 injector inserts

- It is imperative that an effective seal be made between the column and insert.

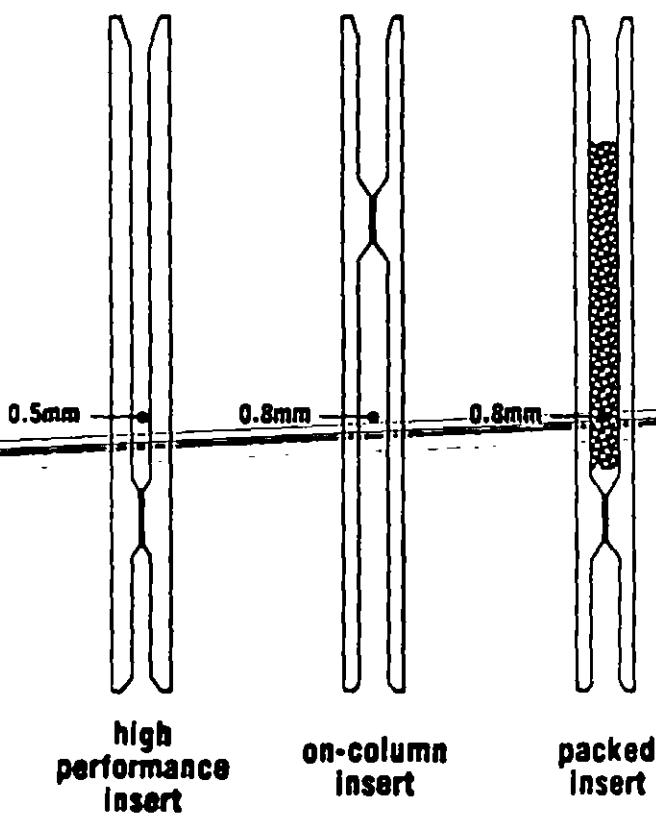


Figure 3-5: 1093/1094 injector inserts

# **SPI Injection Guidelines**

- Use GC keyboard or GC-WS to program SPI.
- Initial SPI temperature should be 10 – 20°C below solvent boiling point.
- Program SPI at least 100°C/min. to temperature required for complete vaporization of sample.
- Initial column oven temperature should be at solvent boiling point.
- Hold column at initial temperature until SPI reaches its maximum.
- Program column oven at rate required for analysis.



# **Detectors**

---

**5.1 The Universal Detectors**

**5.2 The Selective Detectors**

**5.3 Gas Chromatography/  
Mass Spectrometry**

---

# **Introduction**

- Seven common detectors available for GC.
- Universal — responds to all compounds.
- Selective — response depends on specific physical or chemical property of components.
- Destructive — components are physically changed — cannot be used in series.
- Non-destructive — components are not physically changed — can be used in series.
- Mass flow dependent
  - Measures rate flow of compound through cell.
  - Gives consistent detector response with changes in flow rate.
- Concentration dependent
  - Measures concentration of the compound in the cell.
  - Gives variation in peak area with changing flow rate.
  - Peak height is often measured.

# **Specifications**

<b>Detector</b>	<b>Selectivity</b>	<b>Detectivity</b>	<b>LDR</b>
<b>TCD</b>	<b>universal</b>	<b>0.2 ppm</b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>FID</b>	<b>universal for hydrocarbons</b>	<b>&lt;10 pg/sec</b>	<b>10<sup>7</sup></b>
<b>ECD</b>	<b>halogens, peroxides, quinones, organometallics, nitro groups</b>	<b>&lt;0.1 ppb</b>	<b>10<sup>3</sup></b>
<b>FPD</b>	<b>sulfur, phosphorus</b>	<b>0.1 ng S/sec 1 pg P/sec</b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>TSD</b>	<b>phosphorus, nitrogen</b>	<b>&lt;0.05 pg P/sec &lt;0.1 pg N/sec</b>	<b>10<sup>3</sup></b>
<b>ELCD</b>	<b>organic compounds with nitrogen, sulfur, or halogenated functional groups</b>	<b>2 pg N/sec 2 pg S/sec 0.5 pg Cl/sec</b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>PID</b>	<b>aromatics, phenols, unsaturated hydrocarbons</b>	<b>&lt;10 pg/sec</b>	<b>10<sup>7</sup></b>

**Table 1-1: Detector specifications**

# 5.1 The Universal Detectors

## TCD

- Thermal conductivity detector.
- One of first GC detectors, 1946.
- Measures changes in the thermal conductivity of the sample gas stream.
- Thermal conductivity — flow of heat from a hot body to a cooler body.

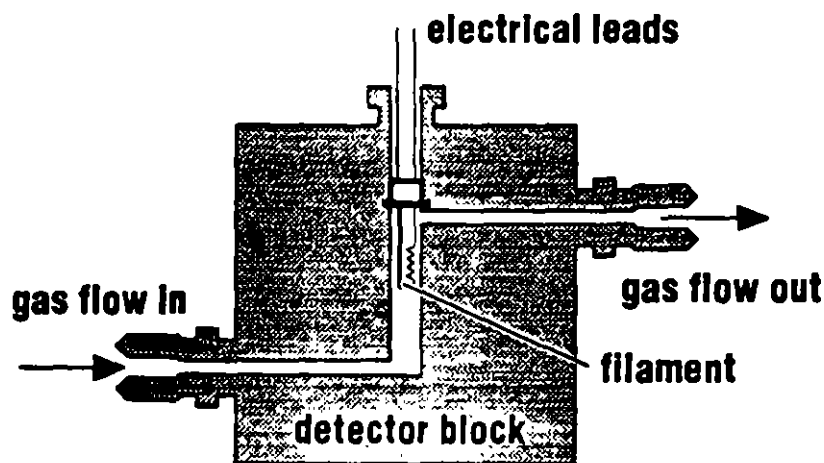


Figure 5-1: Thermal conductivity detector

- Heat flows from hot wire filament to detector block or wall.

# **TCD Filament**

- Electrically heated.
- Tungsten, tungsten rhenium alloy, or a semiconducting thermistor.
- High temperature coefficient of resistance.

## **Theory**

- At a constant electrical current, filament temperature depends on the thermal conductivity of surrounding gas.
- Gas molecules strike the hot filament and rebound with higher K.E. causing heat transfer.
- The greater number of collisions, the greater rate of heat loss.
- Temperature change is measured by resistance change.
- The higher the temperature of the filament, the higher the resistance.
- TCD electronics convert resistance changes to signal.

# TCD Cell

- Two parallel gas streams.
- Sample stream.
- Reference stream
  - Direct carrier gas stream to cell or second injector/column system.

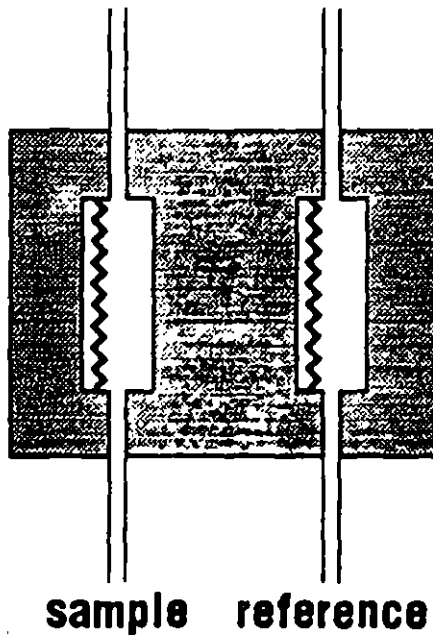


Figure 5-2: Sample and reference cell

- Wheatstone bridge circuit is used to compare the resistance of the two streams.
- Effects of variation in flow rate, pressure, and electrical power are minimized.

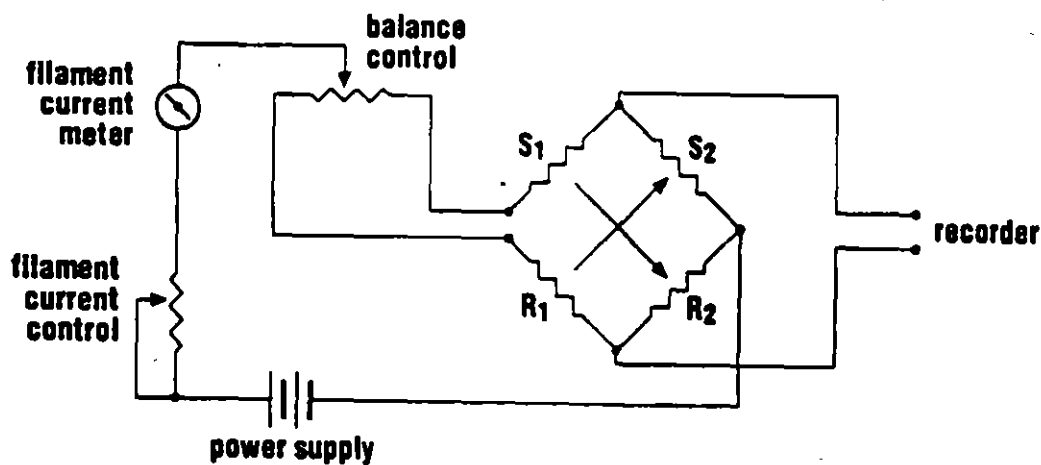


Figure 5-3: Wheatstone bridge circuitry

## Carrier Gas

- H<sub>2</sub> or He most common, N<sub>2</sub> or Ar acceptable.
- H<sub>2</sub> and He have thermal conductivities 6 – 10 times that of most organic compounds or inorganic gases.

# **Thermal Conductivity of Gases**

- Based on speed or mobility of molecules.
- Speed is a function of molecular weight.
- The smaller the molecule, the higher the speed and thermal conductivity.
- H<sub>2</sub> and He, being the smallest molecules, have the highest thermal conductivities.

<b>Gas</b>	<b>Thermal Conductivity Cal/(cm<sup>2</sup> • s • °C)</b>
<b>hydrogen</b>	<b>458.72</b>
<b>helium</b>	<b>368.63</b>
<b>methane</b>	<b>85.54</b>
<b>oxygen</b>	<b>65.91</b>
<b>nitrogen</b>	<b>64.06</b>
<b>carbon monoxide</b>	<b>61.99</b>
<b>water</b>	<b>44.63</b>
<b>argon</b>	<b>44.22</b>
<b>carbon dioxide</b>	<b>41.74</b>

**Table 5-2: Thermal conductivities of common gases**



## **Design**

- Requires accurate pneumatic control with pressure regulator or flow controller.
- Cell is insulated with a second aluminum block to absorb environmental temperature changes.
- Filament protection circuitry — shuts off power to filaments if carrier gas is lost.

## **Maintenance**

- Cell contamination is indicated by noisy or fluctuating baseline — bake out TCD by heating block to 350°C, purging with carrier gas for several hours.
- Filaments age and require replacement periodically.

# **Advantages**

- Simple design.
- Large linear dynamic range.
- Responds to organic and inorganic components.
- Non-destructive — can be used in series.
- No fuel gases.

# **Disadvantages**

- Low sensitivity — to increase sensitivity, increase filament current, decrease block temperature, and reduce flow rate.
- Not well suited for narrow bore capillary columns — requires larger volumes to sweep cell.
- Sensitive to leaks, flow rate changes, and temperature fluctuations.

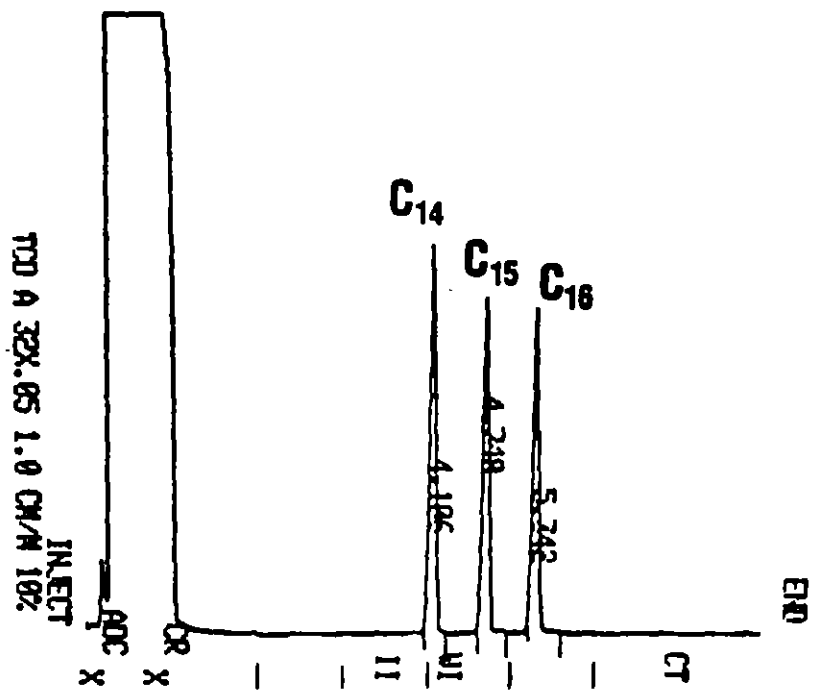
## **Design**

- Requires accurate pneumatic control with pressure regulator or flow controller.
- Cell is insulated with a second aluminum block to absorb environmental temperature changes.
- Filament protection circuitry — shuts off power to filaments if carrier gas is lost.

## **Maintenance**

- Cell contamination is indicated by noisy or fluctuating baseline — bake out TCD by heating block to 350°C, purging with carrier gas for several hours.
- Filaments age and require replacement periodically.

### Example: TCD Test Chromatogram



The TCD test sample contains approximately 0.3% C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, and C<sub>16</sub> alkanes in iso-octane.

# **FID**

- Flame ionization detector.
- Most common GC detector
  - Universal response to carbon containing compounds.
  - Detectivity of  $<10$  pg.
  - Linear range of  $10^7$ .
  - Ease of use.
- Requires fuel gases —  $H_2$  and air.
- Response dependent on structure.
- Destructive.

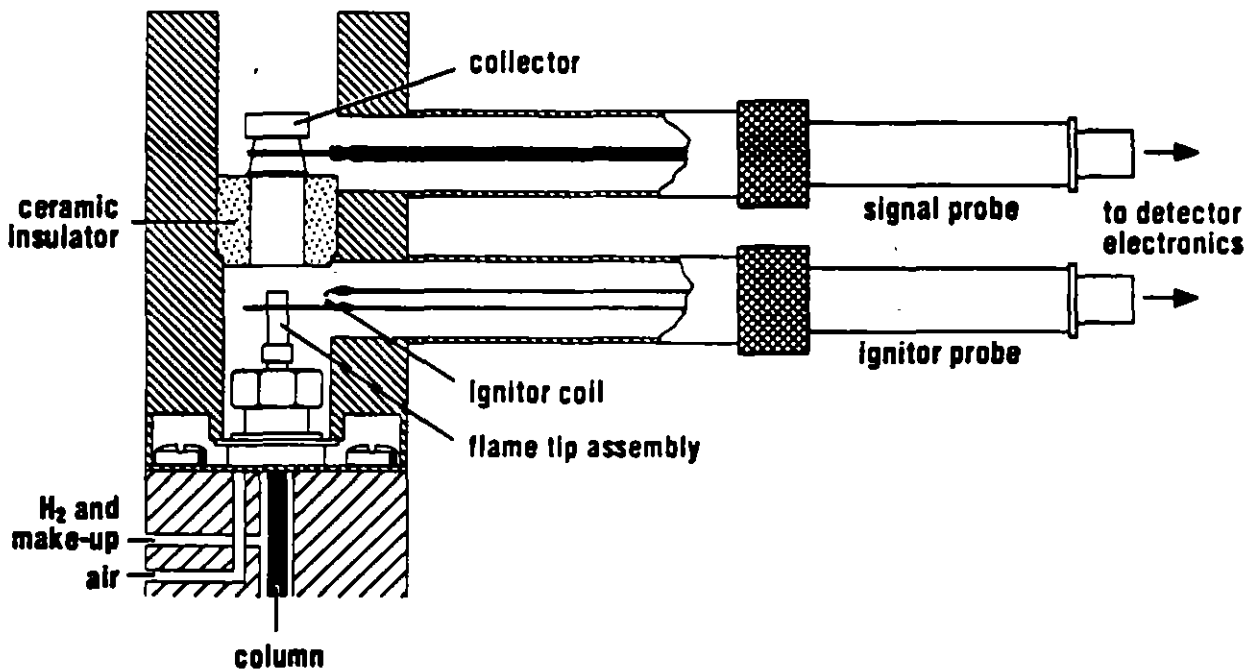


Figure 5-4: Flame ionization detector

# Theory

- H<sub>2</sub>/air flame between two electrodes at a potential difference of 100 – 300 V.
- Ions formed in flame produce current across the electrodes.
- Current is measured by an electrometer.
- Flame produces a small number of ions providing a background signal.
- Hydrocarbons burn (2000°C), ionize, and produce larger current flow.
- ~~Response depends on number of carbon atoms and amount of substitution.~~
- CO, CO<sub>2</sub>, COS, CS<sub>2</sub> give little or no response.

# Fuel Gases

- H<sub>2</sub> typically set at 1:1 with carrier flow rate (or carrier + make up).
- Air is set at 10 times the H<sub>2</sub> flow.
- High air flow and hot detector tower removes excess water vapor.

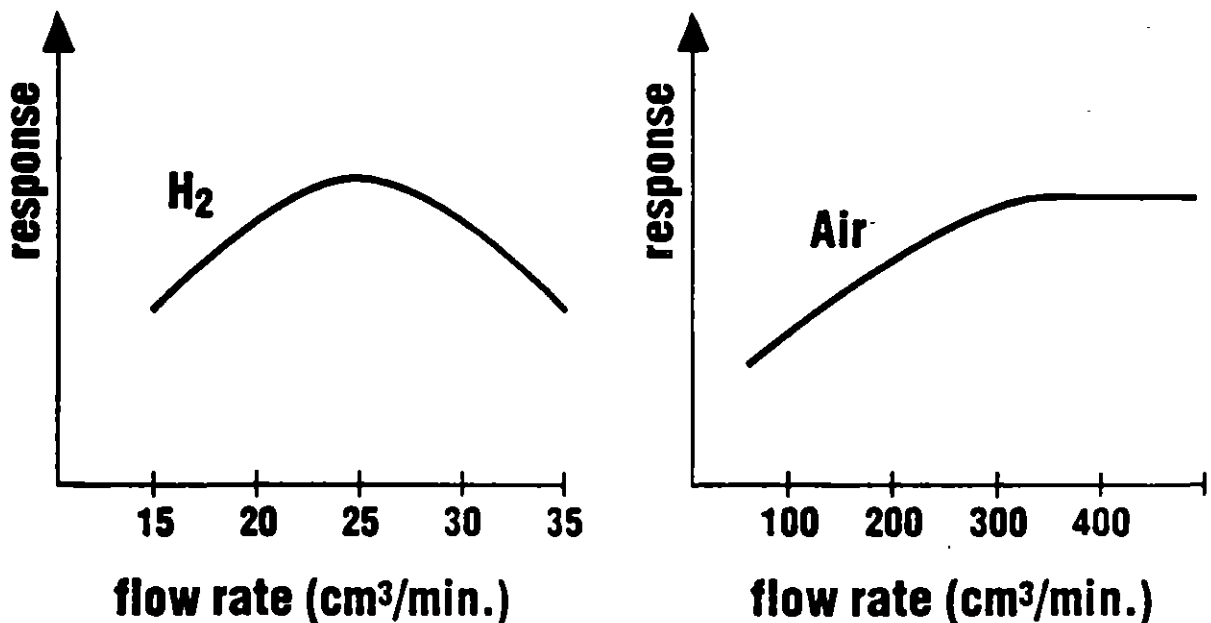


Figure 5-5: Flow rate dependency of fuel gases for FID

# **Maintenance**

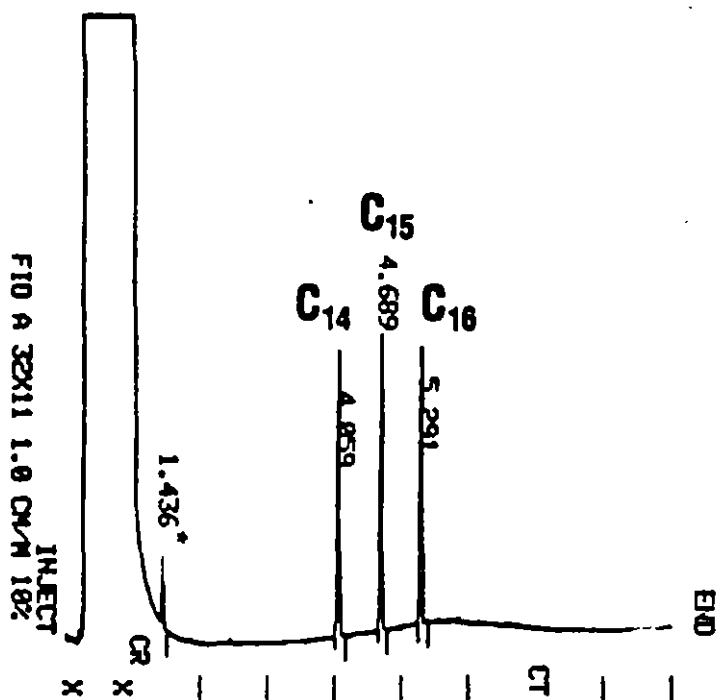
- Cleanliness is indicated by a colorless flame.

**Warning: Do not look into the FID tower without eye protection.**

- Clean flame tip and collector regularly with wire brush or emery cloth.
- Install capillary column recommended depth — polyimide coating can burn and increase background signal.



## Example: FID Test Chromatogram



The FID capillary column test sample contains approximately 0.003% C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, and C<sub>16</sub> alkanes in iso-octane.

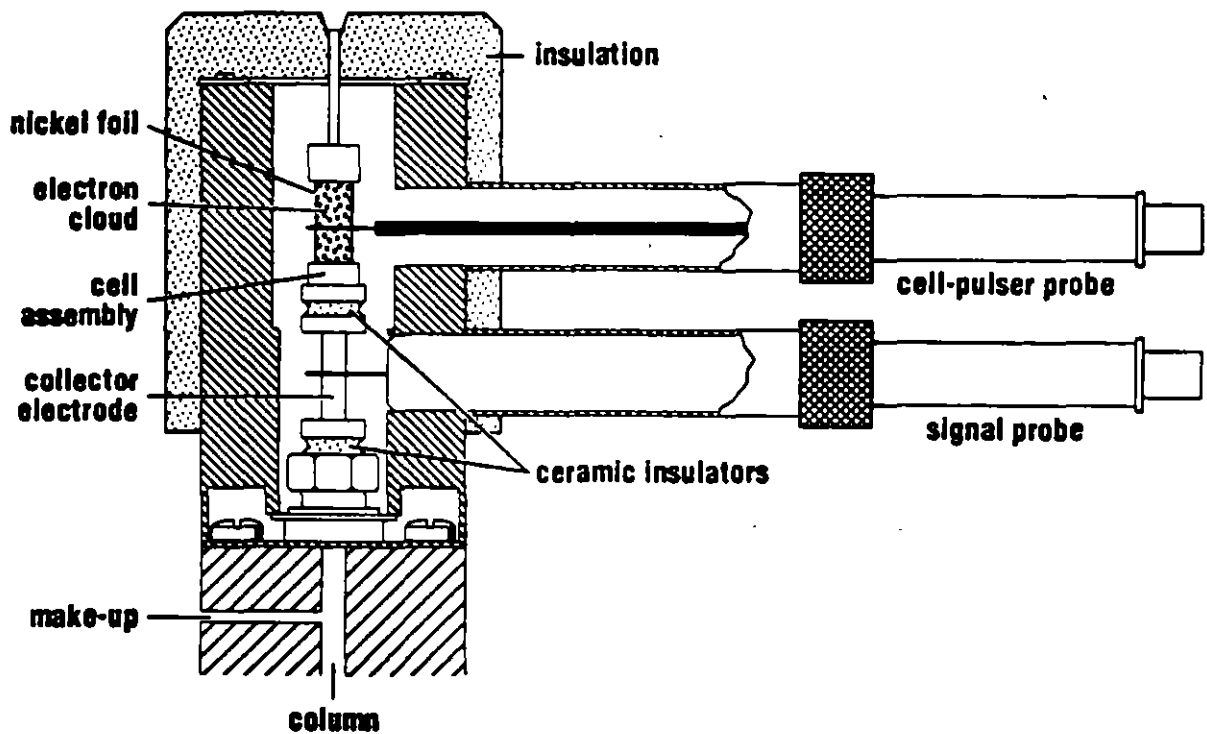
---

## 5.2 The Selective Detectors

### **ECD**

- Electron capture detector.
- Non-destructive.
- Common applications — chlorinated pesticides, insecticides, and drugs.
- Detects molecules with high electronegativities — affinity for electrons.
- Sensitive to halogens, peroxides, quinones, organometallics, and nitro groups.
- Insensitive to amines, alcohols, and hydrocarbons.
- Narrow linear range —  $10^3$ .
- Requires nitrogen carrier gas or make up.

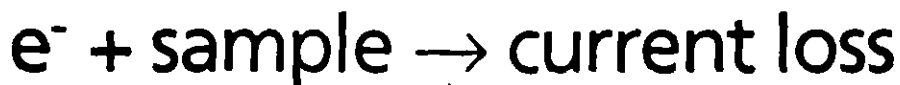
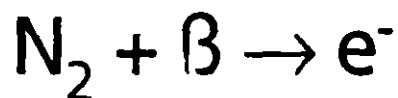
# **ECD Assembly**



**Note:** Radioactive  $^{63}\text{Ni}$  foil is enclosed within cell assembly.

# Theory

- Sample gas stream passes over  $\beta$  emitter.
    - Emits radioactive  $\beta$  particles.
    - Commonly  $^{63}\text{Ni}$  foil.
  - $\beta$  particles cause ionization of carrier gas producing a cloud of electrons within the cell.
  - Electrons produce stable current across cell electrodes.
  - Current is converted and amplified by the electrometer into output signal.
  - When an electron absorbing species enters cell, the current decreases because the electron capture results in fewer electrons.
- 



# **ECD Current**

- Constant current achieved by pulsed voltage.
- Cell is pulsed at the frequency that produces a current identical to a reference current in the detector electronics.
- Frequency of pulses is increased to restore current when electron capturing species is passing through.
- Detection mechanism is the difference in the frequency of pulses.

$$\text{signal} = F_s - F_0$$

where

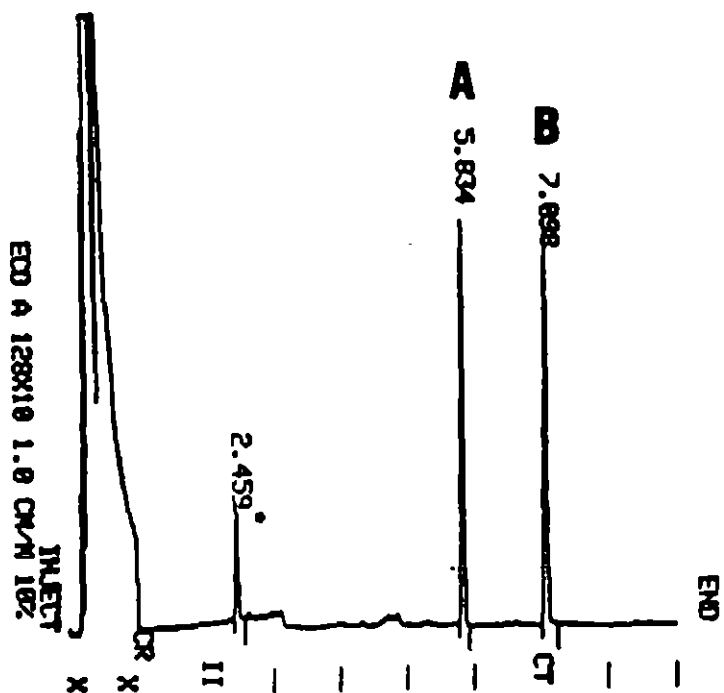
$F_s$  = sample frequency

$F_0$  = reference frequency

# **Contamination**

- Easily contaminated.
- Responsive to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O — imperative that system is leak free and filters changed regularly.
- Oxygen filter should always be used.
- <sup>63</sup>Ni foil can be heated to 350°C; keep column temperature lower.
- Trifluoropropyl stationary phases should not be used (OV-210, QF-1, etc.).
- Narrow linear range is further reduced when cell becomes contaminated.

## Example: ECD Test Chromatogram



The ECD test sample contains approximately 33 ppb lindane (A) and aldrin (B) in iso-octane.

# TSD

- Thermionic specific detector.
- Rugged, simple design, similar to FID.
- Selective to nitrogen and phosphorus.
- 500 times more sensitive to P than the FID.
- 50 times more sensitive to N than the FID.
- Applications include pesticides, petroleum and fossil fuels, foods and flavors, and pharmaceuticals.

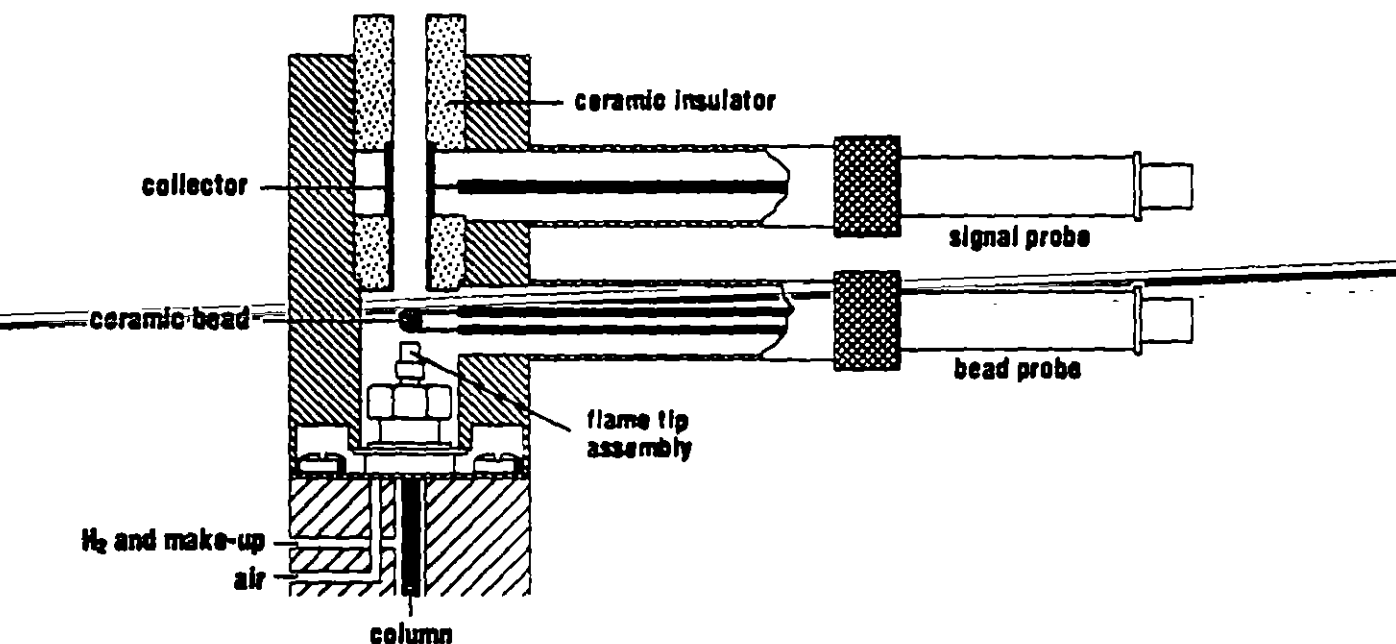


Figure 5-6: TSD assembly



# **Fuel Gases**

- Pneumatics must be flow controlled — optimization strongly depends on H<sub>2</sub> flow.
- H<sub>2</sub> flow typically 4.0 – 4.5 ml/min.
- Air flow is ≈170 ml/min.
- Plasma at 1600°C around bead.
- H<sub>2</sub> not recommended for carrier or make up because it affects TSD response.

# **TSD Bead**

- Ceramic bead impregnated with Rb<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Bead is supported on heating coil providing electrical heating.
- Bead is kept at 600° – 900°C during analysis.
- Temperature determines detector sensitivity, background current, and bead lifetime.

# **Theory**

- Heated bead surface emits thermally excited alkali atoms into the gas plasma.
- Collisions between alkali atoms and N or P containing molecules cause charge transfer reactions.
- Reactions result in alkali cations (+) and N or P anions (-).
- Cations return to bead while anions migrate to collector.

## **N/P vs. P Mode**

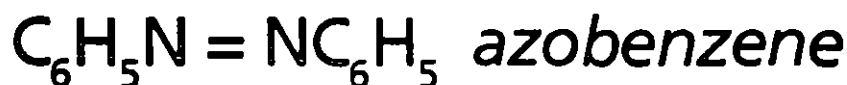
- N/P mode gives reasonable response to both N and P.
- P mode gives enhanced response to phosphorous.
- N/P mode reaction occurs on surface of bead while P mode reaction occurs in plasma.
- Operation in N/P mode is best for increasing bead lifetime, stabilizing drift, decreasing calibration.

# Optimizing TSD

1. Optimize N:C selectivity.
  - Set approximate flow rates.

Gas	Flow Rate (ml/min.)
Carrier (N <sub>2</sub> or He)	30
Air	170
Hydrogen	4.0 – 4.5

- Increase current until bead is 600 – 800°C (dull orange).
- Reduce H<sub>2</sub> flow until relative area response of azobenzene to heptadecane is ≥ 4.5:1.

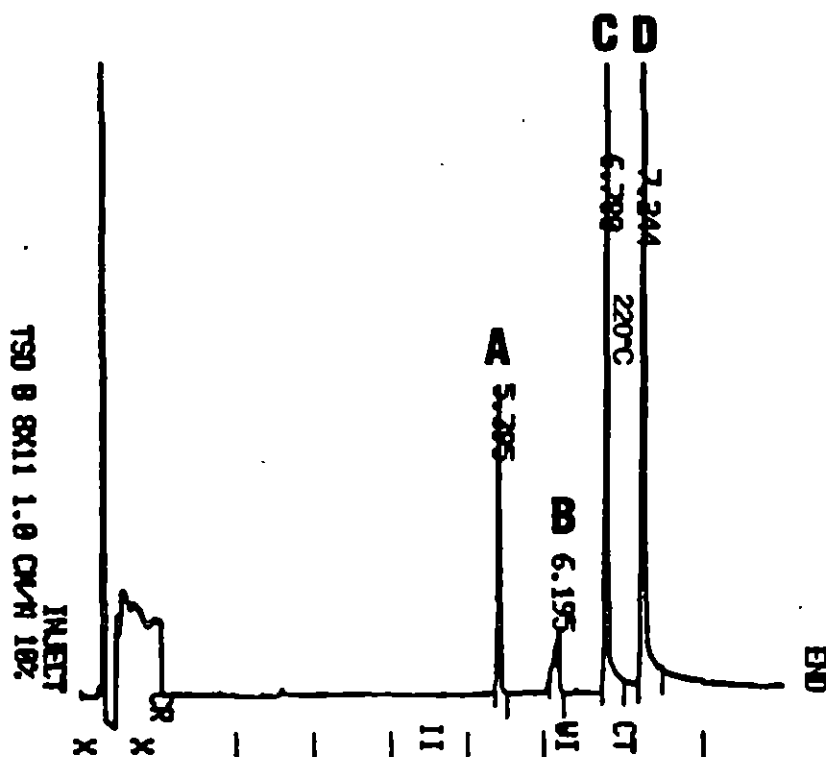


2. The above procedure also optimizes P:C selectivity.
3. Optimize sensitivity by adjusting bead current.
  - If H<sub>2</sub> was decreased during selectivity optimization, increase bead current to restore bead temperature.

# Maintenance

- Bead must be conditioned to bring  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$  to surface (increase bead current slowly in graduated increments).
- Bead requires replacing when  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$  depletes.
- To avoid contamination, do not use stationary phases containing N or P (OV-225, FFAP, etc.).
- Use caution when handling or cleaning bead (use fine sandpaper).
- ~~Disconnect column from detector~~ when conditioning or injecting a silylating agent.

## Example: TSD Test Chromatogram



The TSD test sample contains approximately 2 ppm azobenzene (A) and methyl parathion (D), 4 ppm malathion (C), and 4000 ppm heptadecane (B) in iso-octane.

# **FPD**

- Flame photometric detector.
- Selective to sulfur or phosphorous.
- Applications include detection of pollutants in water and air, analysis of pesticides and fossil fuel products.
- Dual or single flame design.

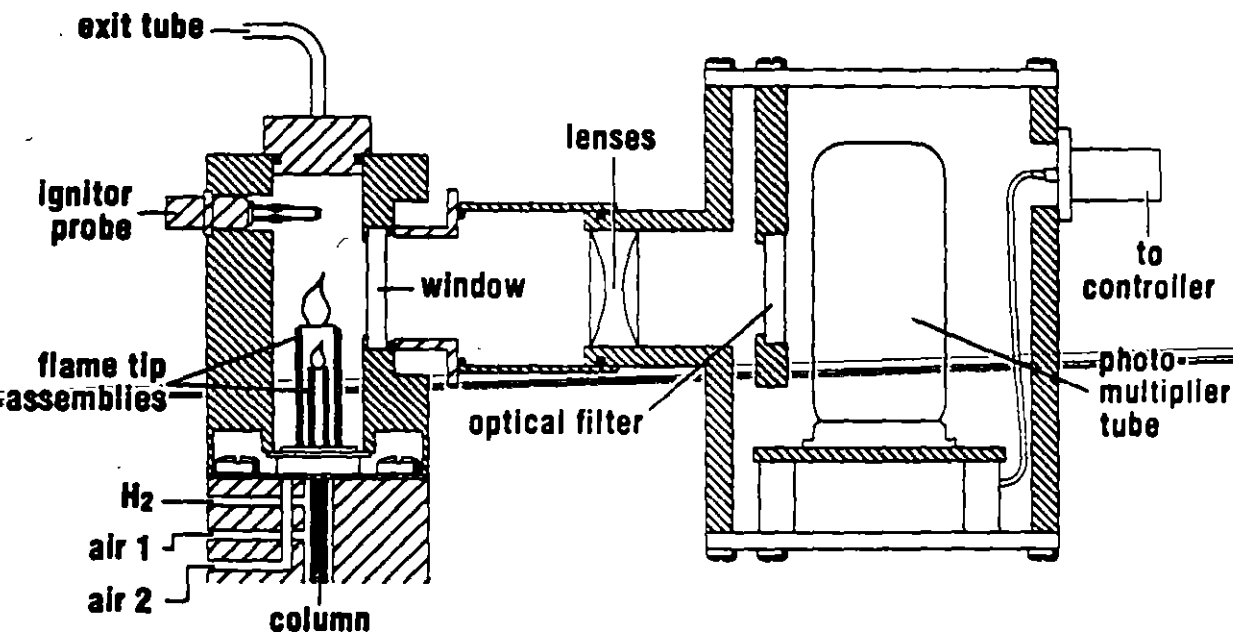


Figure 5-7: FPD assembly — dual flame

# **Theory**

- Light emitted from certain compounds when burned is detected by photomultiplier (PMT).
- Single flame designs are more sensitive while dual flame designs are more selective.
- Two flames used to separate regions of sample decomposition from chemiluminescence (radiation from an excited molecule).
- Lower flame converts molecules into combustion products,  $S_2$  and HPO.

- Upper flame generates light emitting excited species,  $S_2^*$  and  $HPO^*$ .
- Chemiluminating species are viewed photometrically through a window.
- Green emission of  $HPO^*$  is linearly related to flow rate of P in flame.
- Blue emission of  $S_2^*$  is related as square of flow rate of S in flame.
- PMT measures light intensity.
- Interposed filters select  $\lambda$  reaching PMT.



# **Operation**

- A filter change is required for switching between P and S detection.
- Intensity of light increases with decreasing flame temperature and with excess H<sub>2</sub> in flame.
- He or N<sub>2</sub> is recommended for carrier gas.
- If fuel gas flow rates can be decreased, background noise should also decrease.
- H<sub>2</sub> should be flow controlled so flame does not fluctuate.
- Detector temperature should remain constant at about 220°C for maximum sensitivity.

<b>Fuel Gas</b>	<b>Flow Rate (ml/min.)</b>
<b>hydrogen</b>	<b>140 ± 2</b>
<b>air #1</b>	<b>80 ± 2</b>
<b>air #2</b>	<b>170 ± 3</b>

# **Maintenance**

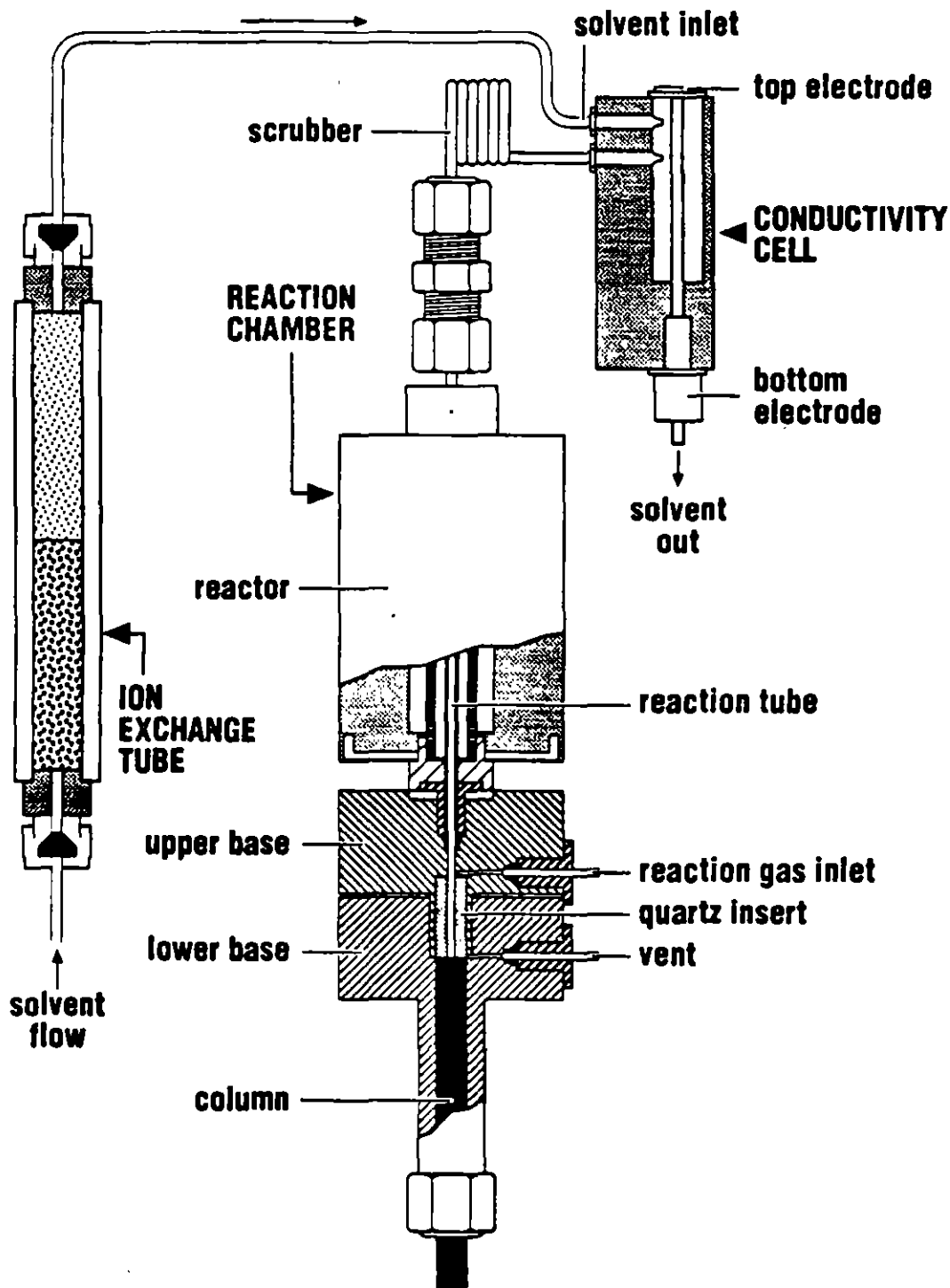
- Ensure correct flow rates are set.
- Filters and windows should be cleaned if response is low.
- Protect PMT when doing maintenance.
- Turn off high voltage to PMT before exposing it to light.



# **ELCD**

- Electrolytic conductivity detector.
- Developed in 1962 for detection of organics in aqueous solution.
- Selective to organic molecules containing N, S, F, Cl, Br, I.
- Applications include EPA methods 601, 501.1, and 502.2, and pesticides, herbicides, pharmaceuticals, and nitrosamines.
- Destructive.
- Electronics and solvent delivery system in outboard module.

# ELCD Assembly



# **Theory**

- Sample mixes with a reaction gas ( $H_2$  or  $O_2$ ) in reaction chamber (furnace -  $1000^\circ C$ ).
  - Reaction chamber acts as catalyst — nickel tube.
  - Oxidation or reduction reaction takes place in reaction tube.
  - Species formed in furnace are dissolved in solvent flowing through the conductivity cell.
  - Two electrodes monitor conductivity across cell.
  - Any species which is ionized during dissolution gives increased conductivity in the cell.
- 
- Scrubbers are used to remove unwanted reaction products.
  - pH and background conductivity of solvent are maintained by circulation through an ion-exchange resin.

## **Example**

In halogen mode, conductivity response is due to formation and dissolution of HI, HBr, HCl, or HF.



where

RX: sample halocarbon

H<sub>2</sub>: reducing agent (reaction gas)

HX: reduced halogen

CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>: by-products, not detected

# **Optimizing the ELCD**

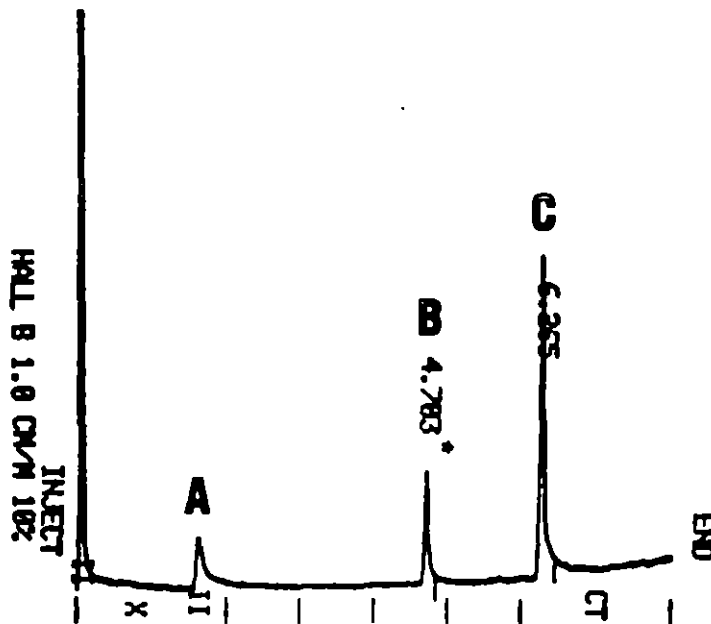
- Allow solvent to equilibrate for one day.
  - Condition nickel tube with reaction gas flowing.
  - Conditioning may take several days.
  - Adjust operating variables after conditioning.
  - Increase reactor temperature to get required response.
  - Low reaction gas flow will degrade catalyst.
- 
- Optimize solvent flow rate for desired sensitivity.



# Maintenance

- Ni tube needs replacing periodically.
  - Degraded tubes lead to loss of sensitivity, ghost peaks, and unstable baselines.
- Maintain constant flow rates of solvents and gases.
- Clean cell periodically.
- Quartz insert cracks easily.

## Example: ELCD Test Chromatogram



The ELCD test sample contains approximately 300 ppb azobenzene (A), thimet (B), and heptachlor (C) and 150 ppm octadecane in hexane.

# **Data Handling**

---

**6.1 Qualitative Analysis**

**6.2 Quantitative Analysis**

# **Introduction**

Data handling refers to what is done with the chromatographic data you collect, and what information you can learn from it.

**Qualitative analysis** — tells you what is in your sample.

**Quantitative analysis** — tells you in what amount components are present.

# **Errors in Data Handling**

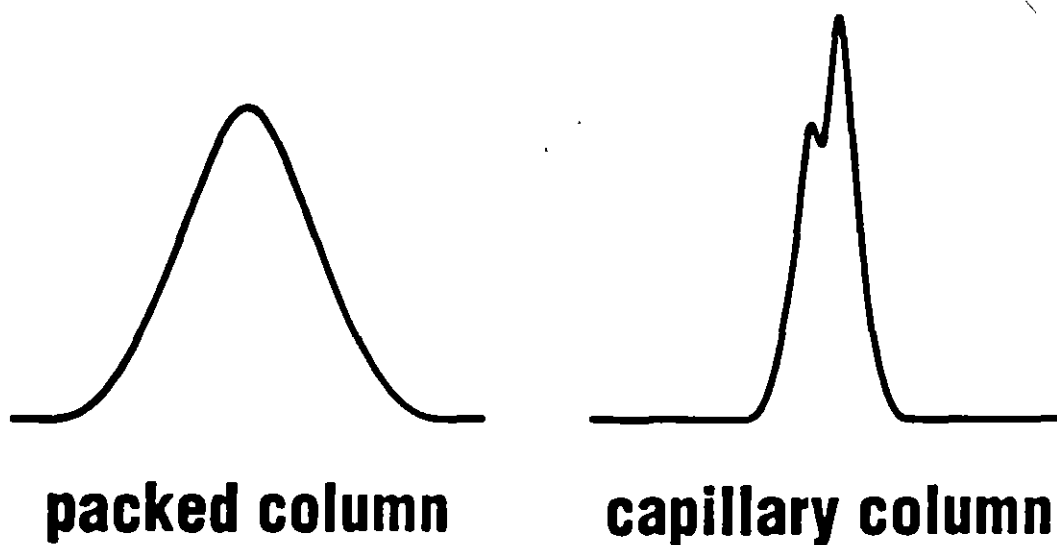
Error can be introduced in sampling and sample preparation.

- Multi-phase samples.
- Representative portion for sample preparation.
- Decomposition, vaporization, reactions.
- Adsorption at the injector, column, or detector.
- Response factors are necessary for ~~treating components equally.~~
- Chart recorder or data system parameters must be optimized to ensure accurate, reproducible data is collected.

---

# 6.1 Qualitative Analysis

- Identifying components with certainty is difficult with standard detectors.
- Capillary GC offers higher probability because of improved resolution over packed column GC.
- Broad peaks can conceal presence of two or more components.



**Figure 6-1:** Co-eluting peaks on a packed and a capillary column

# **Supplemental Analytical Techniques**

---

- Different compounds can have identical or very close retention times.
  
- Couple GC with other analytical techniques.
  - Infrared spectroscopy
  - Mass spectrometry
  - Nuclear magnetic resonance
  - Coulometry
  - Ultraviolet-visible spectroscopy
  
- Techniques which produce component "fingerprint," such as MS, are best.

# **Relative Retention Times**

- Compare retention times of known to unknown components under identical conditions.
- Using one standard eliminates variation in carrier gas flow rate and film thickness or packing.
- For multi-component sample, use multiple standards of increasing molecular weight.

$$\alpha = \frac{t_{R \text{ unknown}}}{t_{R \text{ standard}}}$$

# Relative Retention Systems

- "Rule of thumb":  $t_R$  doubles for every decrease of 20°C.
- Add certainty by comparing  $t_R$ s at two or more temperatures.
- Use two different column types (polar and non-polar).

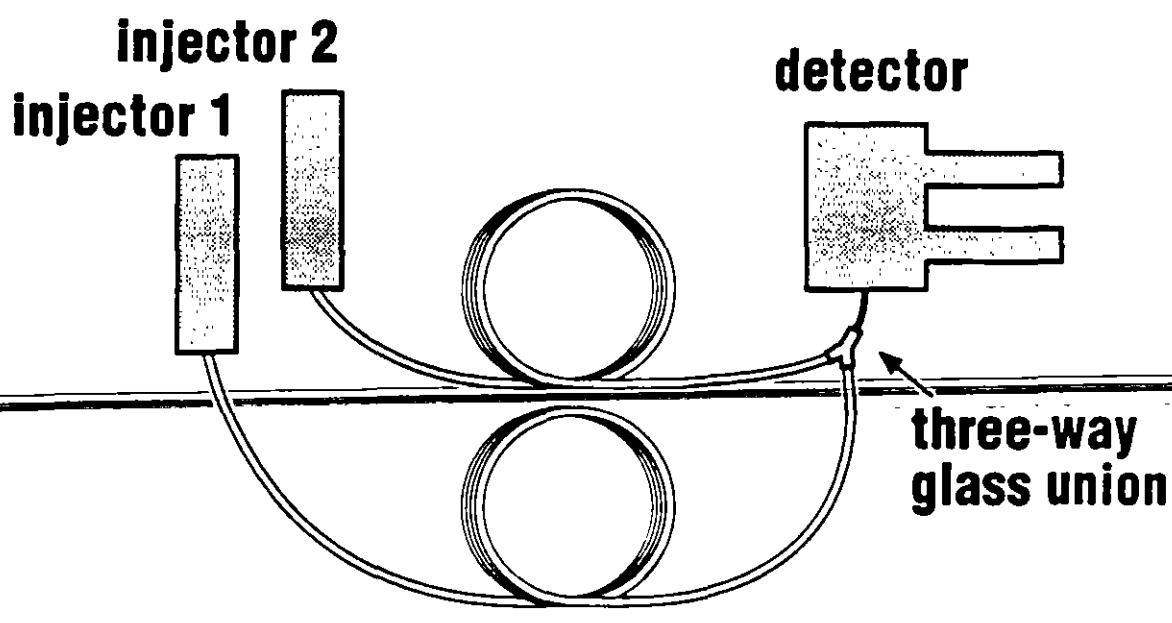
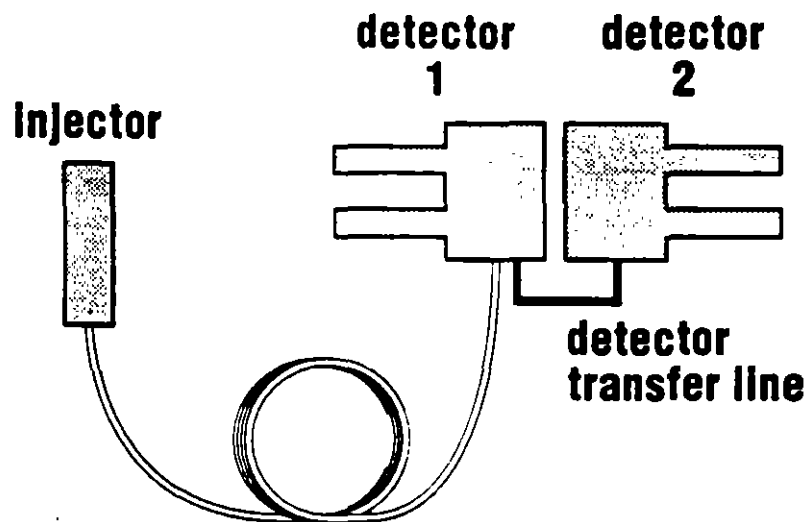
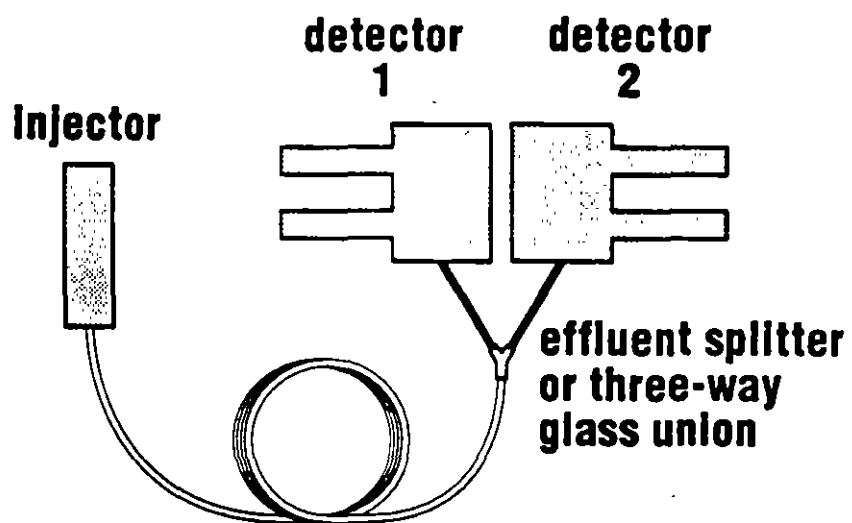


Figure 6-2: Relative retention analysis using two columns to one detector



- Compare relative responses from two different detectors.

$$\frac{A_{i, \text{det } 1}}{A_{i, \text{det } 2}} \approx \frac{A_{\text{ref}, \text{det } 1}}{A_{\text{ref}, \text{det } 2}}$$



**Figure 6-3:** Using two detectors for qualitative analysis in parallel (A) or in series (B)

- Insert two columns into the injector and analyze with two different detectors.

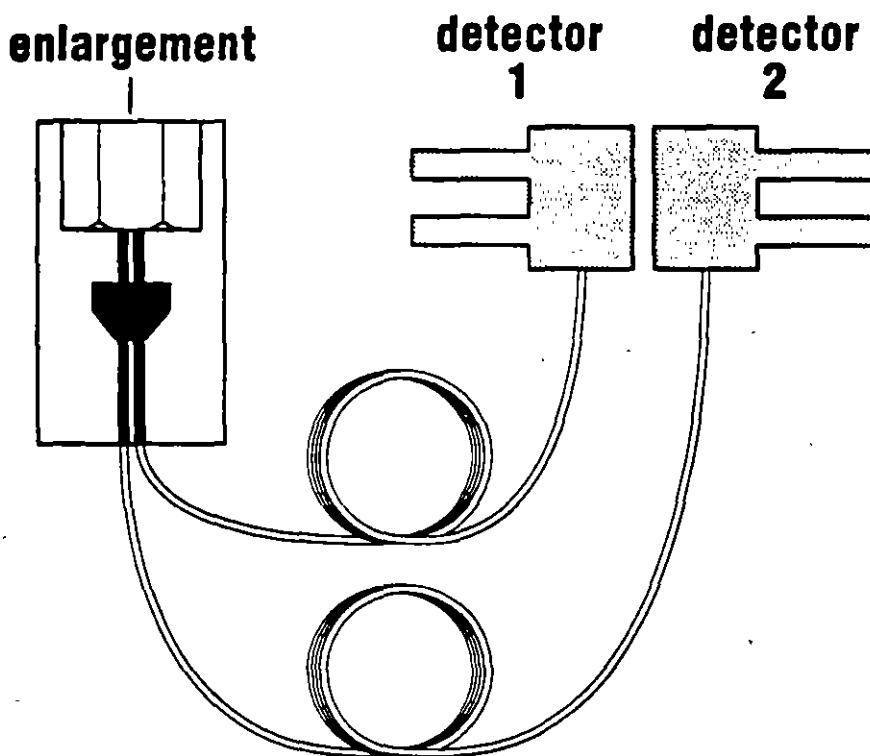


Figure 6-4: Using a two-hole ferrule for qualitative analysis

- ~~Spiking~~ — ~~add some standard to the~~ sample. If the peak gets larger without changing shape, the probability is high that the sample and standard are the same compound.

# Retention Indices

- Variety of retention index systems based on same principals.
- Kovat's retention indices — 2 or 3 compounds needed to establish slope of calibration curve. Curve is used to identify other members of the same series.
- $\log t_R$  vs. carbon number of a homologous series.

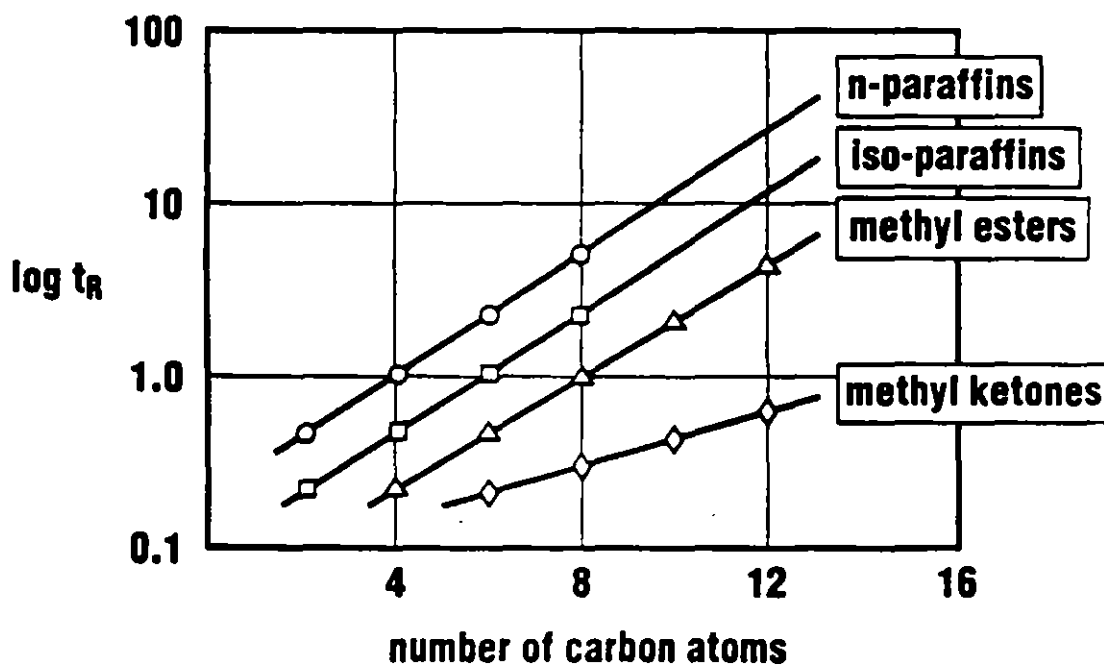


Figure 6-5: Example calibration curves for Kovat's retention indices

- $KI = 100z$ , where  $z =$  number of carbon atoms.
- Same type of column should be used to obtain calibration curve and component retention times.

$$KI(x) = 100z + 100 \frac{t_R(x) - t_R(z)}{t_R(z+1) - t_R(z)}$$

where

$t_R(x) =$  retention time of the unknown component

$t_R(z) =$  retention time of a straight chain hydrocarbon

- Compare indices from different samples to determine if they contain the same components.

.....  
**Note:** If temperature programming is being used, substitute the elution temperature for the retention times.

---

## 6.2 Quantitative Analysis

- Determines the mass or concentration of a component in the sample.
- Compares the percent composition of components in the sample.
- Common errors in quantitation:
  - Difference in response between detectors
  - Response changes due to temperature, flow, or current changes
  - Sample contamination
  - Loss of sample during injection
  - Wrong calibration curve
  - Calculation errors
  - Poor sampling technique
  - Prejudice
  - Random errors
- Averages and standard deviations should be used to express precision.

# Area Percent

- Simplest calculation type.
- All components in sample must respond equally in detector.
- All components must be well separated.
- Indication of amount of one component relative to other components in the sample.

$$\text{Area}\% = \frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

where

$A_i$  = area of individual peak

$\Sigma A$  = sum of all peak areas

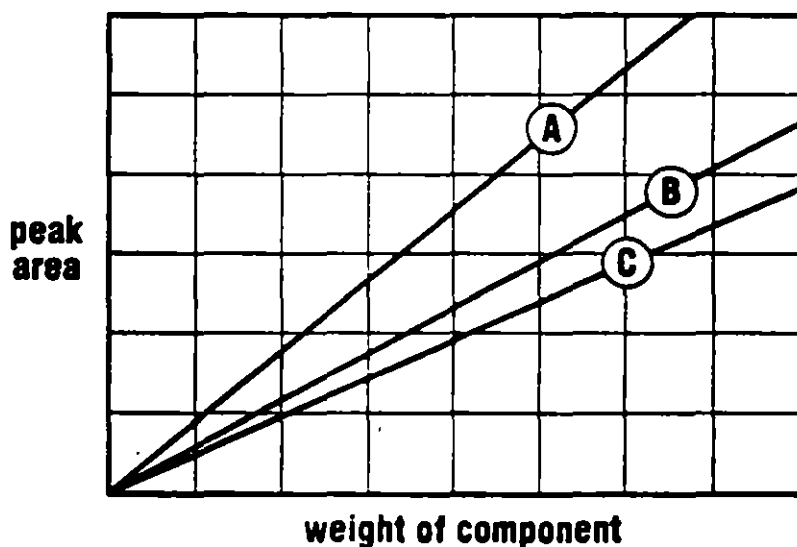
- ~~Amount injected does not need to be known exactly.~~

.....

Selective detector should not be used because they may not respond to the majority of the components in the sample.

# **External Standard**

- Use a series of knowns (external standards) to create a calibration curve.
- Curves are built for each component of interest.
- Must know exact amounts and volumes of pure standards injected.
- Calibration curves should be linear and pass through origin.



**Figure 6-6:** Calibration curve for external standards

- Must know exact amount of unknown and inject the same volume as the external standards.

# **Procedure**

1. Prepare standard mixes containing known amounts of compounds of interest.
2. Analyze standards; for each component, build a calibration curve of peak area vs. amount of component.
3. Prepare unknown sample and analyze using identical procedure to the standards.
4. Fit unknown peak areas to calibration curves to determine weight or concentration of components.

# **Drawbacks**

- Chromatographic conditions of unknown and standards must be identical.
- ~~Standards need to cover entire range of~~ concentration expected from unknowns.
- Precision is difficult because of small sample sizes and injection discrimination.
- New calibration curves need to be constructed whenever there is a change in conditions.



# **Internal Standard**

- Internal standard added to standards and unknown.
- Only complete resolution of peaks of interest and standard is required.
- Can quantify one, more than one, or all peaks.
- Amount injected and detector response do not need to be known precisely.
- Compatible internal standard:
  - not present in unknown.
  - completely resolved from sample components.
  - stable, non-reactive, and of high purity.
- Component response is calculated relative to internal standard response.
- More than one internal standard may be used.

# Procedure

1. Prepare standard mixtures which include known amounts of sample and internal standard. The internal standard concentration should be similar to the samples.
2. Chromatograph the standards.
3. Measure peak areas of the samples.
4. Construct calibration curve by plotting area ratios vs. amount ratios.

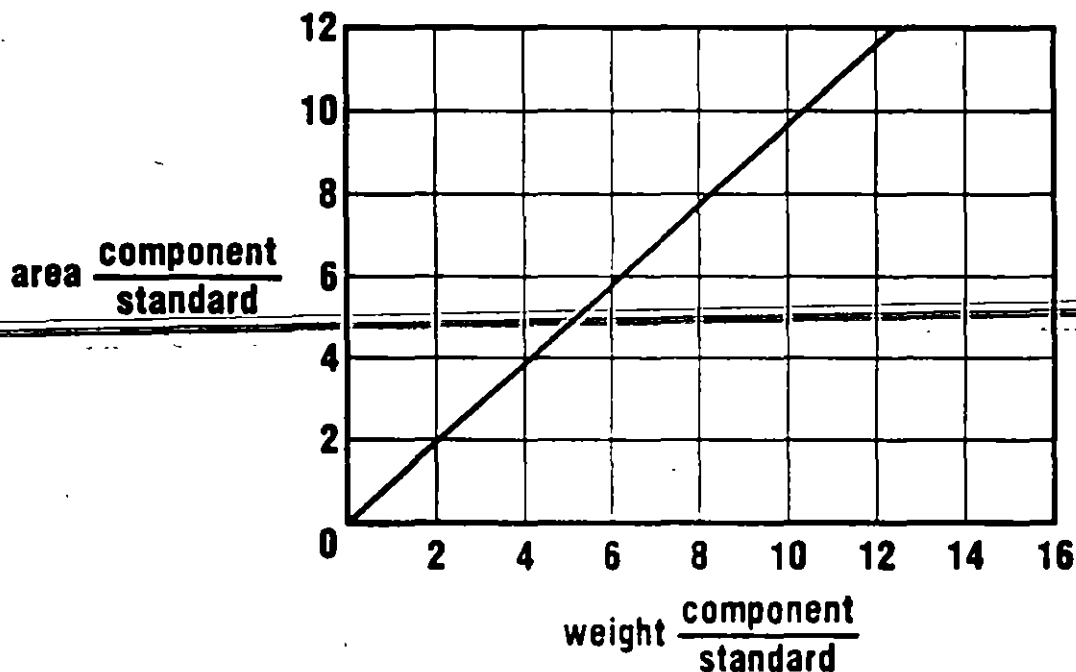


Figure 6-7: Calibration curve for an internal standard

5. Prepare unknown sample by adding known amount of internal standard.
6. Chromatograph the sample using identical conditions used for calibration.
7. Measure area ratios of the peaks from the chromatogram.
8. Use the calibration curve to match the ratio and determine the amount of unknown.

$$RRF_i = f_i = \frac{\text{amount}_i}{\text{Area}_i} \times \frac{\text{Area}_{\text{ref}}}{\text{amount}_{\text{ref}}}$$

$$\text{mass}_i = \frac{\text{Area}_i f_i M_{\text{ref}}}{\text{Area}_{\text{ref}}}$$

where

$f_i$  = relative response factor of  $i^{\text{th}}$  peak

$\text{amount}_i$  = concentration or mass of  $i^{\text{th}}$  peak

$\text{Area}_i$  = area of  $i^{\text{th}}$  peak

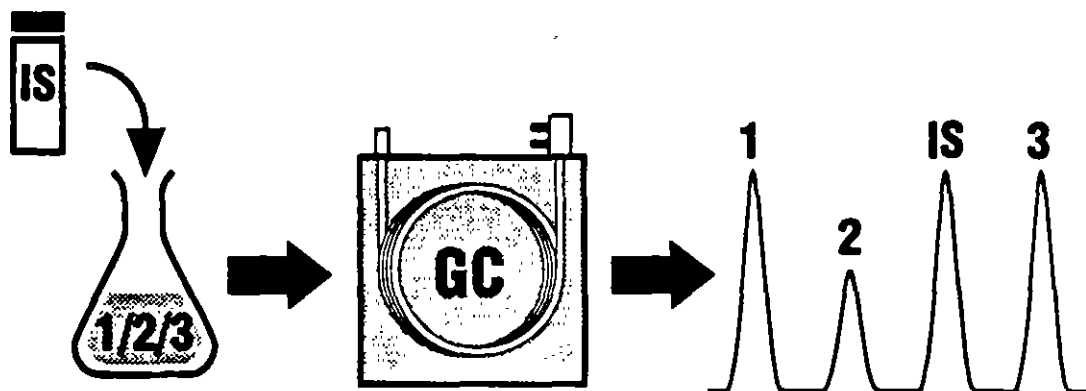
$\text{Area}_{\text{ref}}$  = area of internal standard peak

$\text{amount}_{\text{ref}}$  = concentration or mass of internal standard peak

$\text{mass}_i$  = mass of  $i^{\text{th}}$  peak

$M_{\text{ref}}$  = mass of internal standard added

## Example: Calculating relative response factors



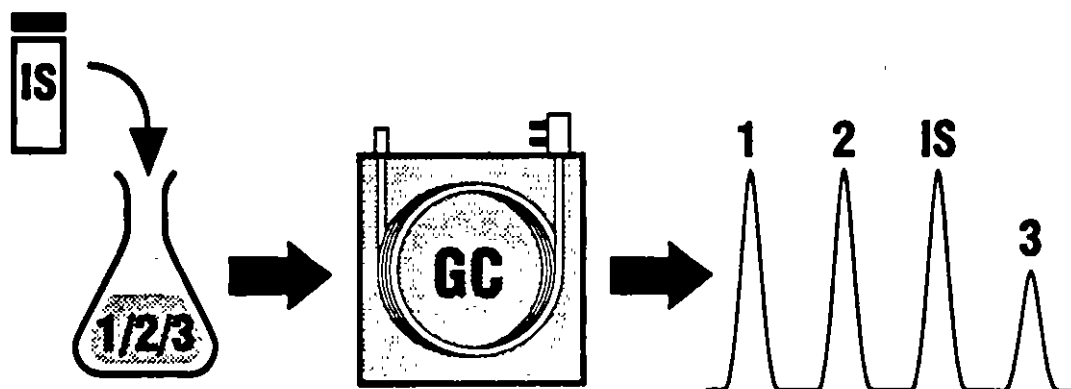
Peak	Time	Mass	Area
1	2.00	10	10,000
2	3.00	10	5,000
IS	4.00	1.00	10,000
3	5.00	5	10,000

$$\text{RRF} = f_1 = \frac{10}{10,000} \times \frac{10,000}{1.0} = 10$$

$$\text{RRF} = f_2 = \frac{10}{5,000} \times \frac{10,000}{1.0} = 20$$

$$\text{RRF} = f_3 = \frac{5}{10,000} \times \frac{10,000}{1.0} = 5$$

## Example: Calculating sample mass using the relative response factors



Peak	Time	Mass	Area
1	2.00	?	8,000
2	3.00	?	8,000
IS	4.00	1.00	8,000
3	5.00	?	4,000

$$\text{mass}_1 = \frac{8,000 \times 10 \times 1.0}{8,000} = 10$$

$$\text{mass}_2 = \frac{8,000 \times 20 \times 1.0}{8,000} = 20$$

$$\text{mass}_3 = \frac{4,000 \times 5 \times 1.0}{8,000} = 2.5$$

# Normalized Percent

- Calculates the percent composition of each component.
- Response factors with respect to a reference compound are calculated for each component.
- Prepare mixture of known amounts of components, run chromatogram, assign one peak as reference.

$$f_i = \frac{\text{amount}_i}{A_i} \times \frac{A_{\text{ref}}}{\text{amount}_{\text{ref}}}$$

where

$f_i$  = response factor for  $i^{\text{th}}$  peak

$A_i$  = integrated area of  $i^{\text{th}}$  peak

$A_{\text{ref}}$  = integrated area of  
chosen reference peak

$\text{amount}_{\text{ref}}$  = weight or concentration  
of the reference

- Response factors are used to calculate normalized area percent for peaks.
- Each peak is calculated separately with its response factor.
- Solvent peak area may be excluded.

$$\text{Area}\% = \frac{A_i \times f_i}{\sum_{n=1}^n (A \times f)_n} \times 100\%$$



# Integration

Conversion of the chromatographic peak to numbers which relate to the amount of sample.

- Peak height:
  - Measurement from baseline to peak maximum.
  - Constant carrier gas flow rate, temperature and well-shaped peaks needed.

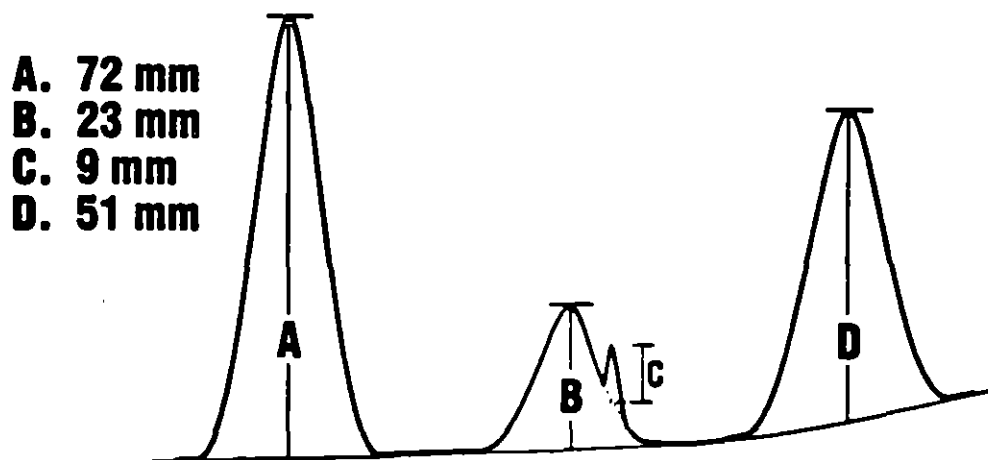
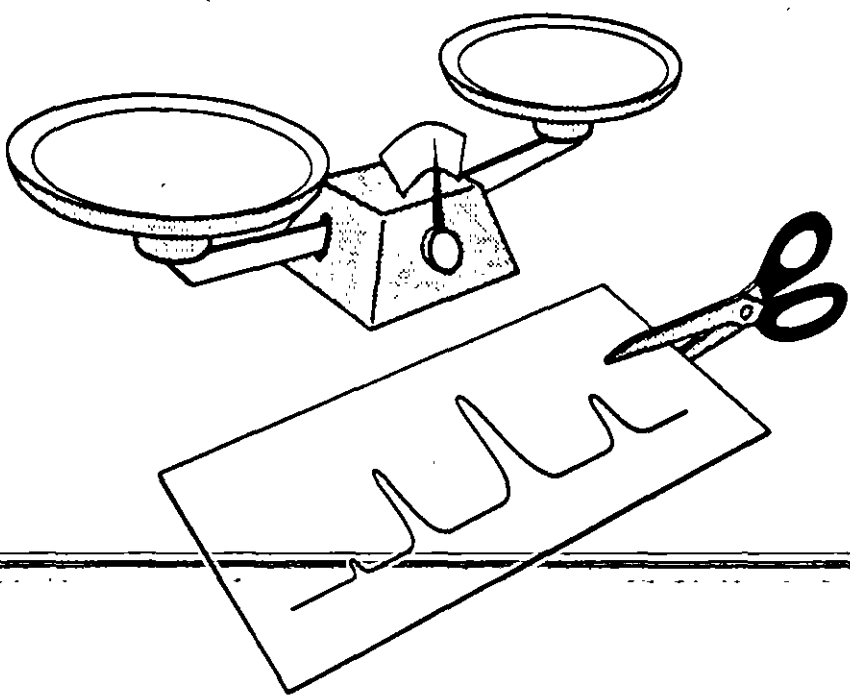


Figure 6-8: Peak height measurement

- Cutting and weighing:
  - Time consuming.
  - Outdated.
  - Chromatogram is destroyed.
  - Thickness and moisture of paper must be constant.



**Figure 6-9:** Cut and weigh integration

- **Triangulation:**
  - Area of triangle is calculated.
  - Time consuming.
  - Reasonable precision.

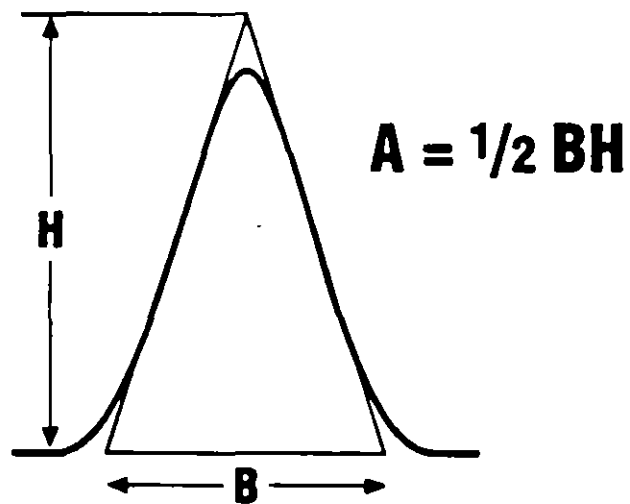


Figure 6-10: Triangulation

- Height times width at half height:
  - Use width at half height to avoid error due to peak leading and tailing.
  - Rapid and simple.
  - Fast recorder speed gives narrower peaks; easier to measure.

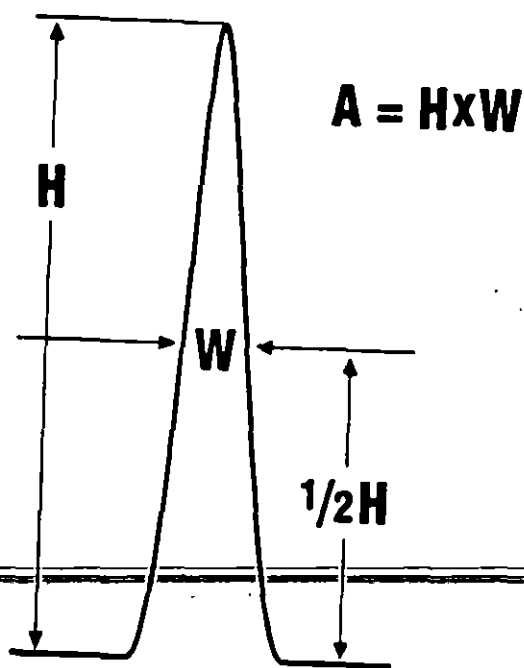


Figure 6-11: Height x width at half height

- Measuring overlapping peaks:
  - Drop line from valley to baseline.

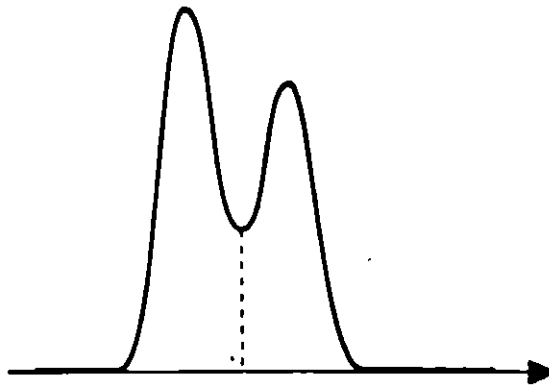


Figure 6-12: Quantitation of overlapping peaks

- Measuring trace components on tail:
  - Try changing elution order — column, temperature.
  - Spiking with more of component.

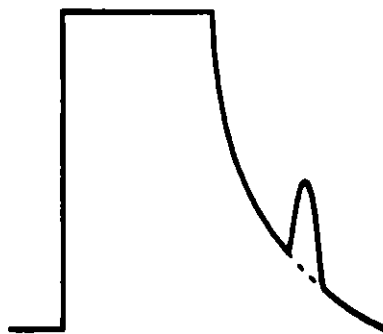
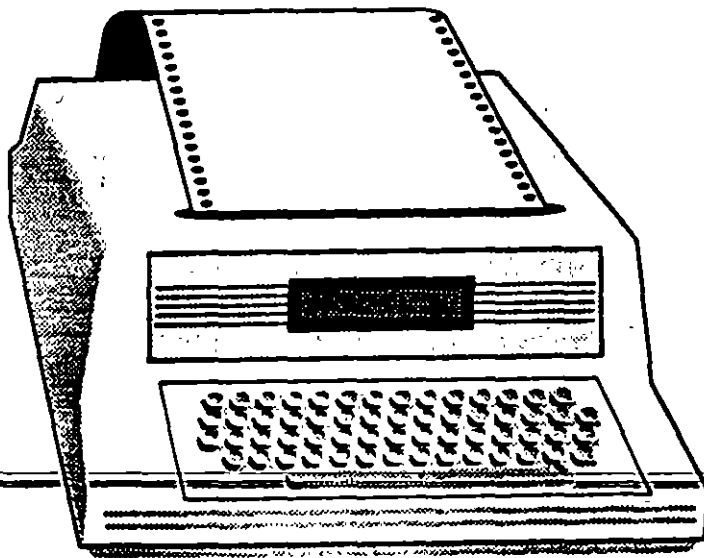


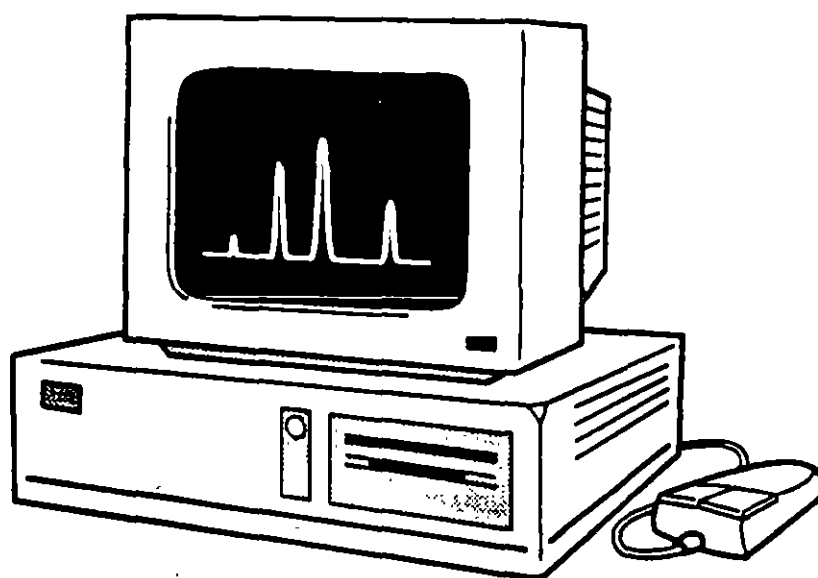
Figure 6-13: Trace analysis

- 85
- **Electronic digital integrator:**
    - Chromatographic input signal is fed into voltage to frequency converter.
    - Generates an output proportional to peak area.
    - Very precise.
    - Fast.



**Figure 6-14:** Model 4400 integrator

- Workstation:
  - Control of GC.
  - Peak processing and integration.
  - Fast clock to collect multitude of data.
  - Uses algorithm for peak detection.
  - Data reprocessing and recalculation.



**Figure 6-15: Workstation data handling**

**varian** 

# **INTRODUCCION CG/EM**



## 2. ESPECTROMETRIA DE MASAS

### 2.1 Introducción

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para la identificación, clasificación y cuantificación de estructuras químicas.

La determinación de la estructura está basada en patrones de fragmentación característicos (Diap.2-1).

La espectrometría de masas comenzó con el trabajo de los físicos en 1908. En 1918 la técnica creció y fue utilizada para mostrar los isótopos de neón de masas 20 y 22.

Esta información revolucionó el concepto de masa atómica química. Hacia 1942 los espectrómetros de masas fueron disponibles comercialmente para llevar a cabo el análisis de mezclas de gases con excelente velocidad y exactitud <sup>(7)</sup>.

En la actualidad la espectrometría de masas es considerada como una de las principales disciplinas con amplia aplicación en la química analítica y en la investigación científica.

Un espectrómetro de masas es un instrumento rico en información que provee una "huella digital", la cual es única para un compuesto individual, lo que permite identificación positiva de este compuesto. La técnica implica la fragmentación en iones de las moléculas de un componente en una cámara de vacío, y la subsecuente separación y detección de los iones individuales. Los iones son separados de acuerdo a su proporción masa/carga, generando un patrón de iones de intensidades variables de distintas masas. El patrón de fragmentación se representa gráficamente considerando la abundancia de los iones con respecto a su relación masa carga ( $m/z$ ), y se conoce como espectro de masas (Diap. 2-2).

La espectrometría de masas se divide en dos procesos separados:

~~(i) ionización de moléculas de muestra en iones y fragmentos neutros y (ii) la separación y detección de los iones positivos principalmente,~~ normalmente la ionización es realizada por electrones de alta energía (Impacto Electrónico) o por iones reactivos (Ionización Química), mientras que la separación de iones se logra comúnmente por campos eléctricos o magnéticos.

## 2.2 Fundamentos

### 2.2.1 Ionización por Impacto Electrónico (IE)

Existen diferentes técnicas de ionización (Diap. 2-3), siendo la ionización por impacto electrónico la técnica mas común. La Diap. 2-4, muestra en forma esquemática una cámara de ionización la cual puede ser utilizada para describir los principios y características de ionización por impacto electrónico. La cámara inicialmente esta a una baja presión ( $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  Torr). Los electrones de un filamento de alambre caliente (como Renio) se enfocan a través de una cámara de ionización, éstos tienen una energía promedio de 70eV, la cual es suficiente para romper cualquier enlace en la mayoría de las moléculas orgánicas<sup>(1)</sup>. La ionización consiste en que las moléculas de la muestra se acercan a un electrón energético, perdiendo un electrón de su capa externa para formar un ion molecular y después someterse a una serie de reacciones de fragmentación, un ejemplo de ionización y fragmentación se muestra en la Diap. 2-5.

La abundancia relativa de los iones formados por IE depende principalmente de dos variables: la energía de los electrones ionizantes y la temperatura a la cual ocurre la ionización.

En la Diap. 2-6 puede observarse la abundancia de los iones molecular y fragmento (eficiencia de la ionización), como una función de la energía de los electrones ionizantes expresada en eV.

La energía se incrementa de cero, hasta un valor de cerca de 10eV en el cual el ion molecular comienza a aparecer. Este punto es conocido como el potencial de ionización. Conforme la energía del electrón aumenta, la abundancia de este ion molecular se incrementa hasta que su proporción llega a ser relativamente constante cerca de los 70eV. Entre 10 y 15 eV los iones fragmento comienzan a aparecer y siguen curvas de abundancia como se muestra en esta diapositiva.

La curva de eficiencia muestra que cuando se utilizan electrones ionizantes con una energía de 70 eV, pequeños cambios en la energía tienen poco efecto en la eficiencia de la ionización, esto genera un espectro creado en un punto estable en la formación de iones y da espectros de masa que son reproducibles y característicos de la molécula ionizada<sup>(2)</sup>.

El potencial de ionización de diferentes moléculas orgánicas es menor a 15eV, la Diap. 2-7 presenta una tabla comparativa con los potenciales de ionización para diferentes substituyentes en un hidrocarburo saturado.

Dependiendo de la energía de los electrones ionizantes será el grado de fragmentación un ejemplo de ello es la ionización por IE para el etilbenceno utilizando 7-15 eV y de 50-70eV (Diap. 2-8).

En espectro de masas obtenido por IE muestra un alto grado de fragmentación, y en muchas ocasiones el ion molecular es débil sobre todo en hidrocarburos de cadenas largas, por lo que se pierde la información del peso molecular, cuando se utiliza esta forma de ionización (Diap.2-9).

### 2.2.2 Trayectoria Libre Promedio ("Mean Free Path")

En el Sistema GC/MS, el flujo máximo de gas de acarreo permitido hacia el espectrometro de masas es usualmente determinado por el "MFP" de los iones dentro del espectrometro.

El "MFP" de una partícula gaseosa representa la distancia promedio que un átomo o molécula viaja antes de interactuar con otra partícula<sup>(7)</sup>.

La colisión puede ser importante del tipo de bola de billar resultando en una reacción química lo cual puede generar espectros de masas no identificables, o bien puede ser una desviación modesta debida a la aproximación de las dos partículas en una distancia propicia para la interacción.

El "MFP" de una partícula depende del diámetro de colisión y la concentración de las partículas involucradas. En un gas neutro puro no depende de la velocidad. De la teoría cinética de las moléculas, el MFP, de un gas puro esta dado por:

$$MFP = \frac{1}{\sqrt{2} \pi n \sigma^2}$$

$n$  = Número de moléculas/cm<sup>3</sup>

$\sigma$  = Diámetro de colisión

Si el diámetro de colisión es conocido, el MFP, puede ser calculado en función de la presión, ya que el diámetro de colisión de la mayoría de los gases no difiere lo suficiente para afectar los cálculos, es conveniente utilizar la ecuación aproximada dada :

$$MFP (cm) = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{P}$$

donde *P* es la presión en Torr (Diap. 2-10). Esto significa que las moléculas y iones formados se conducirán independientemente y no golpearán uno con otro, solo con las paredes de la cámara<sup>(7)</sup>.

Esto permite la separación y detección de iones sin los efectos de perturbación por colisión y reacción, además asegura que se produzcan espectros reproducibles. La mayoría de los espectrómetros de masas utilizan una combinación de bombas de alto y bajo vacío para lograr la presión necesaria, por ejemplo una bomba mecánica de bajo vacío genera una presión de aproximadamente 10<sup>-1</sup> torr, mientras una de difusión o una turbo molecular produce un alto vacío de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-7</sup> Torr.

### 2.3 Instrumentación

Un espectrómetro de masas consiste de una fuente de iones, un analizador másico de iones, un detector de iones, y un sistema de vacío (Diap.2-11)

Los espectrómetros de masas son clasificados de acuerdo al principio usado para separar los iones (Diap. 2-12). Los espectrómetros de masas usados comúnmente son del tipo sector magnético, cuadrupolo y trampa de iones, (Diap. 2-13) cualquiera de ellos puede ser acoplado a un cromatógrafo de gases.

#### 2.3.1 Analizadores de Masas

Una de las principales características del espectrometro de masas es el método utilizado para obtener la separación de los iones producidos en la cámara de ionización.

El principal parámetro determinado por el analizador es el poder de resolución<sup>(7)</sup>. Para la mayoría de las aplicaciones en química orgánica, la resolución *R* esta definida por:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

*M* = masa del primer pico

$\Delta M$  = es la diferencia en masa entre dos picos

La resolución del 10% valle es comúnmente utilizada y significa que dos picos graficados de aproximadamente igual intensidad son resueltos o separados cuando la altura del valle entre ellos es 10% de la altura del pico

La definición práctica de resolución es ilustrada en las Diaps. 2-14 y 2-15.

Ejemplo:

Si:  $M1 = 500 (C_{34}H_{60}O_2)$

$M = 501$

la resolución necesaria para separar la masa 500 de 501 es  $R = 500$

Si ahora

$M1 = 99$  considerada como masa nominal de  $C_8H_{11}O$

$M1 = 99.08098$  uma

$M2 = 99.11737$  uma de  $C_7H_{15}$

Por lo que la resolución requerida para ambos iones sería:

$$R = \frac{M}{\Delta M} = 2800$$

### 2.3.1.1 Espectrómetro de Masas de Sector Magnético.

Los instrumentos de este tipo surgen en los años 1800's.

Un magneto es utilizado para separar los iones para su subsecuente detección. Los iones formados en la fuente son acelerados hacia un campo magnético homogéneo.

Los iones que dejan la fuente tienen una energía cinética común, para iones con una carga electrónica  $z$  y una masa  $m$ , la energía cinética esta relacionada al voltaje de aceleración por la ecuación:

$$Ve = 1/2 mv^2$$

Donde:

$v$  = velocidad del ion, y  $Ve$  es el voltaje de aceleración. y  $m$  es la masa.

Cuando los iones entran al campo magnético  $H$  experimentan una fuerza octagonal al campo la cual resulta en una curvatura de la trayectoria del ion. Esta fuerza de aceleración,  $HeV$  es balanceada por la fuerza centrípeta como:

$$HeV = \frac{mv^2}{R}$$

Donde  $R$  es el radio de la curvatura. La eliminación del termino de velocidad representa que iones de una carga unitaria son afectados por el campo magnético de acuerdo a la ecuación:

$$m/e = H^2 R^2 / 2V$$

Donde  $m$  es la masa del ion,  $e$  es la carga,  $H$  es la fuerza del campo magnético en gauss,  $R$  es el radio de la curvatura, y  $V$  es el voltaje de aceleración aplicado a los iones<sup>(7)</sup>. Un barrido de masas puede ser realizado variando  $H$  o  $V$ . Para la mayoría de las aplicaciones,  $H$  es modificada mientras  $V$  se mantiene constante. Este tipo de instrumento es mostrado en la Diap. 2-16.

Un ion es acelerado de la fuente de iones con una gran energía, utilizando una placa repelente de 2000 a 8000V. El campo magnético del electromagneto es entonces barrido. La masa que pasa a través del analizador y es enfocada hacia el detector es dependiente del cuadrado de la fuerza del campo magnético.

Los iones de  $m/z$  mayor tienen trayectorias con radios mas grandes con respecto a los iones de  $m/z$  menor.

Los iones tienen velocidades iniciales ligeramente diferentes debido a la cinéticas de ionización. El campo magnético entonces enfoca los iones en un haz estrecho, pasando ellos a través de una ventana (slit) justo antes del detector.

Si solo un magneto es usado, el instrumento es llamado espectrómetro de masas de un enfoque (single focussing).

Electrodos de campo electrostático pueden ser instalados antes del magneto, pero después de la fuente de iones, para proporcionar un enfoque inicial a los iones que salen de la fuente y eliminar el efecto de sus velocidades iniciales diferentes. El instrumento es entonces llamado un espectrómetro de masas de doble enfoque (double focussing). El haz de iones es enfocado dos veces para obtener una espectrometria de masas de alta resolución.

### 2.3.1.2 Espectrómetro de Masas Cuadrupolo

El analizador de masa del tipo cuadrupolo convencional es ilustrado en la Diap. 2-17, en este espectrómetro la separación de iones se realiza pasando el haz iónico a través del centro de cuatro barras arregladas en forma paralela en las cuales se aplica un campo específico de radiofrecuencia. La forma teórica de una sección de ellas representa una hipérbola. Esto proporciona un campo eléctrico adecuado en el centro de las cuatro barras. Los iones son formados por IE o IQ y acelerados utilizando un pequeño voltaje, las barras son conectadas eléctricamente, por dos componentes uno c.d., U y un componente de radio frecuencia,  $V \cos \omega t$  ( $V_0$ ) en barras adyacentes

Diap 2-18.

Examinando un par de barras 2 y 3 de esta última diapositiva y asumiendo que son conectadas solo por el voltaje c.d. Si la barra 3 tiene un potencial positivo con respecto a la barra 2, los iones positivos sufren atracción hacia esta última, siendo los iones de baja energía cinética los que son desviados más fácilmente (Diap 2-19). Considerando el efecto de la variable de la radio frecuencia en el potencial entre las barras 2 y 3 es una fuente c.a. la cual alterna a  $10^8$  Hz, si ahora es conectado a las barras 2 y 3, el efecto de los iones que pasan a través de las barras 2 y 3, será que los iones positivos sentirán una atracción hacia la barra 2 cuando la polaridad de rf es la misma y una atracción hacia la barra 3 cuando cambie la polaridad, los cambios en polaridad están ocurriendo a una proporción muy alta y si a esto se le adiciona el potencial fijo de c.d., los iones describirán una ruta errática.

El mismo voltaje para dc y rf es aplicado para las barras 1 y 4 simultáneamente con respecto a las barras 2 y 3. Las conexiones dc son tales que 4 esta a un potencial negativo con respecto a 1, pero el rf aplicado a 1 y 4 esta  $180^\circ$  fuera de fase con relación al aplicado a 2 y 3.

Es difícil visualizar a simple vista la ruta de los iones, pero efectivamente siguen una trayectoria oscilante entre las barras. Para cualquier par de valores para los voltajes dc y rf solo iones de energía cinética particular pasan por entre las barras y llegan al detector, todos los demás iones chocan con las barras.

Si ambos valores de voltaje dc y de rf son variados juntos, mientras se mantienen en una relación constante, iones de diferente  $m/z$  pasaran entre las barras y alcanzaran el detector, en esta forma se realiza el barrido de las masas.

### 2.3.3 Espectrómetro de Masas Trampa de Iones.

La trampa de iones (Diap. 2-20) es considerada dentro de los espectrómetros de masas de tipo cuadrupolar ya que opera con un principio similar al cuadrupolo.

### 2.3.1.2 Espectrómetro de Masas Cuadrupolo

El analizador de masa del tipo cuadrupolo convencional es ilustrado en la Diap. 2-17, en este espectrómetro la separación de iones se realiza pasando el haz ionico a través del centro de cuatro barras arregladas en forma paralela en las cuales se aplica un campo específico de radiofrecuencia. La forma teórica de una sección de ellas representa una hipérbola. Esto proporciona un campo eléctrico adecuado en el centro de las cuatro barras. Los iones son formados por IE o IQ y acelerados utilizando un pequeño voltaje, las barras son conectadas electricamente, por dos componentes uno c.d., U y un componente de radio frecuencia,  $V \cos \omega t$  ( $V_0$ ) en barras adyacentes Diap 2-18.

Examinando un par de barras 2 y 3 de esta última diapositiva y asumiendo que son conectadas solo por el voltaje c.d. Si la barra 3 tiene un potencial positivo con respecto a la barra 2, los iones positivos sufren atracción hacia esta última, siendo los iones de baja energía cinética los que son desviados más fácilmente (Diap 2-19). Considerando el efecto de la variable de la radio frecuencia en el potencial entre las barras 2 y 3 es una fuente c.a. la cual alterna a  $10^8$  Hz, si ahora es conectado a las barras 2 y 3, el efecto de los iones que pasan a través de las barras 2 y 3, será que los iones positivos sentirán una atracción hacia la barra 2 cuando la polaridad de rf es la misma y una atracción hacia la barra 3 cuando cambie la polaridad, los cambios en polaridad están ocurriendo a una proporción muy alta y si a esto se le adiciona el potencial fijo de c.d., los iones describirán una ruta errática.

El mismo voltaje para dc y rf es aplicado para las barras 1 y 4 simultáneamente con respecto a las barras 2 y 3. Las conexiones dc son tales que 4 esta a un potencial negativo con respecto a 1, pero el rf aplicado a 1 y 4 esta  $180^\circ$  fuera de fase con relación al aplicado a 2 y 3.

Es difícil visualizar a simple vista la ruta de los iones, pero efectivamente siguen una trayectoria oscilante entre las barras. Para cualquier par de valores para los voltajes dc y rf solo iones de energía cinética particular pasan por entre las barras y llegan al detector, todos los demás iones chocan con las barras.

Si ambos valores de voltaje dc y de rf son variados juntos, mientras se mantienen en una relación constante, iones de diferente  $m/z$  pasaran entre las barras y alcanzaran el detector, en esta forma se realiza el barrido de las masas.

### 2.3.3 Espectrómetro de Masas Trampa de Iones.

La trampa de iones (Diap. 2-20) es considerada dentro de los espectrómetros de masas de tipo cuadrupolar ya que opera con un principio similar al cuadrupolo.



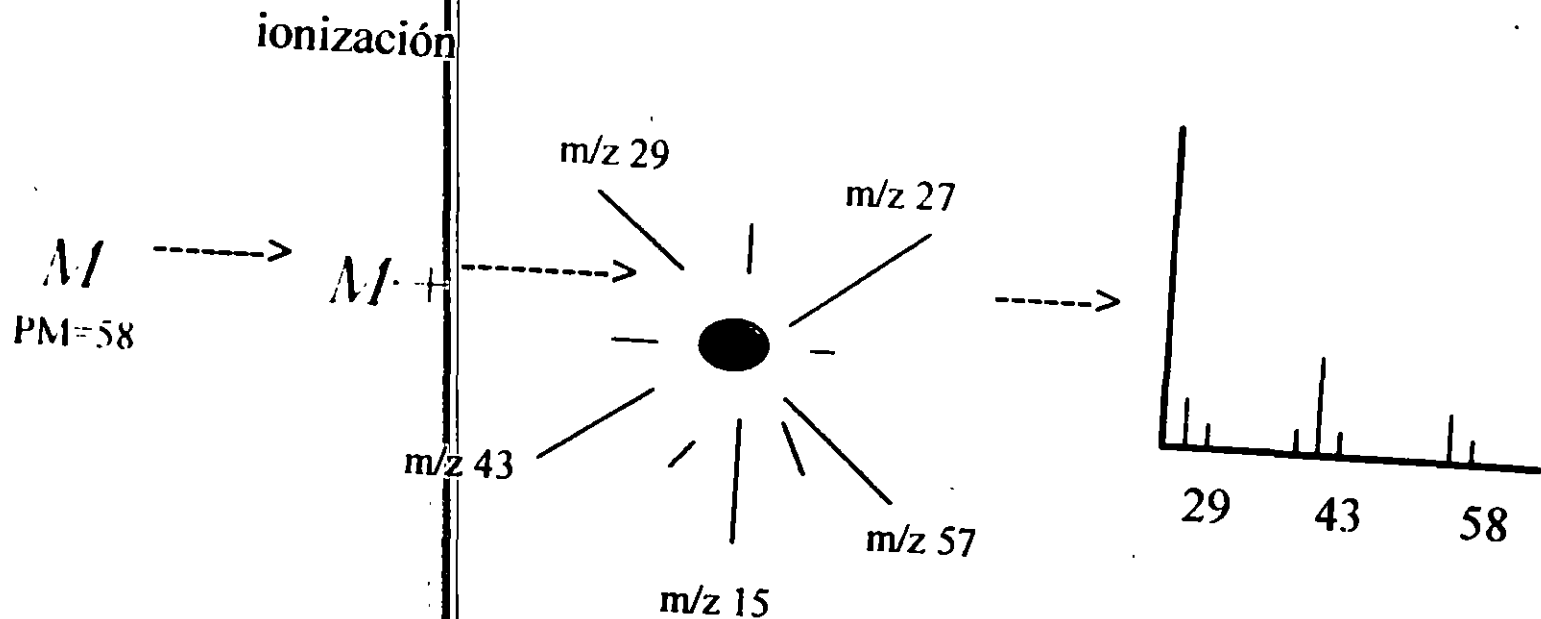
Sin embargo; más que permitir que los iones pasen a través de la trampa, está puede almacenarlos para subsecuentes experimentos. Utiliza un campo que es generado por una geometría que incluye un electrodo central en forma de anillo, y dos tapas una superior y otra inferior, las cuales incluyen superficies internas hiperbólicas. Los detalles del funcionamiento serán revisados ampliamente en otro capítulo.

# Espectrometría de Masas

Es una técnica analítica utilizada para la identificación, clasificación y cuantificación de estructuras químicas.

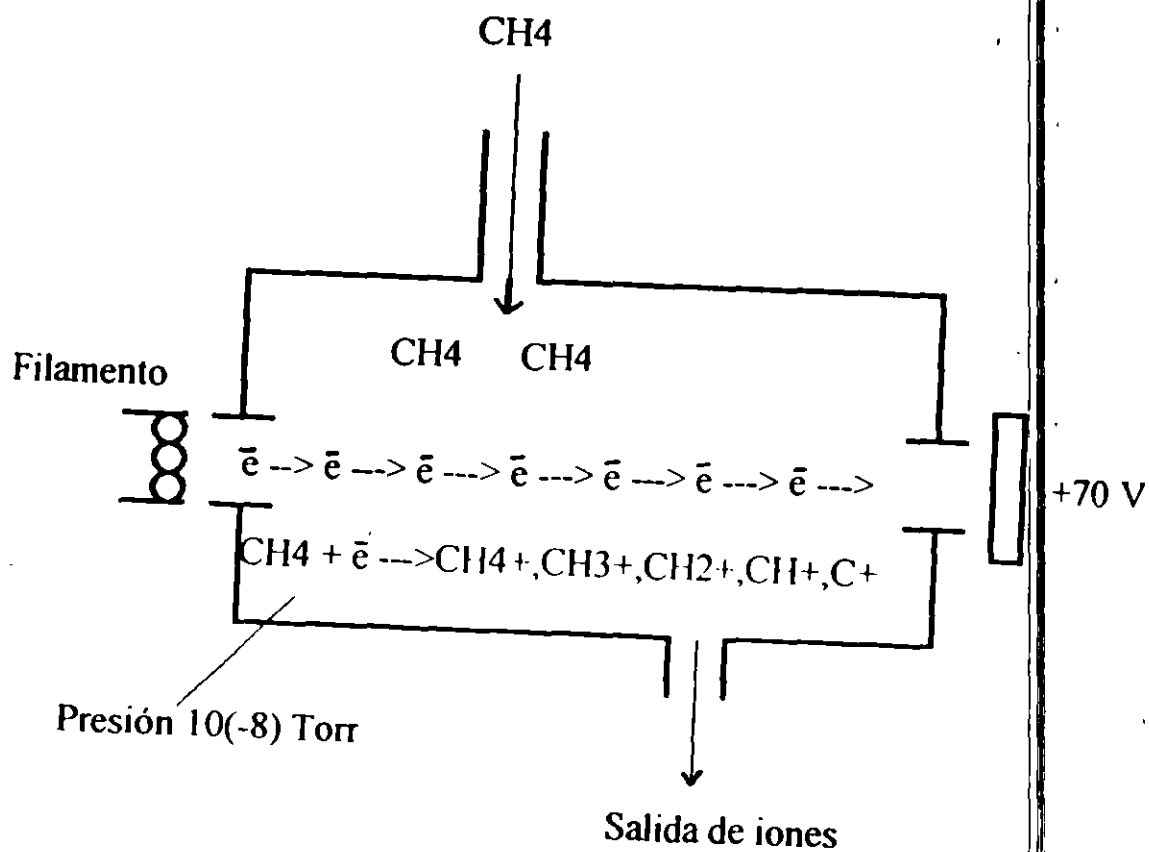
La determinación de la estructura esta basada en patrones de fragmentación característicos.

# Obtención del Espectro de Masas



# Técnicas de Ionización

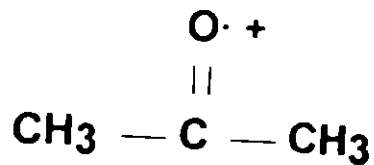
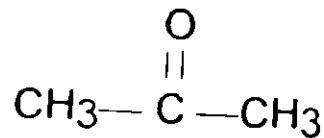
- \* Impacto electrónico
- \* Ionización química
- \* Ionización por campo
- \* Ionización-desorción laser
- \* Bombardeo atómico(FAB)



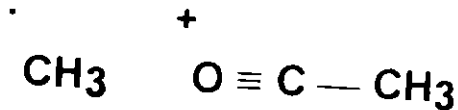
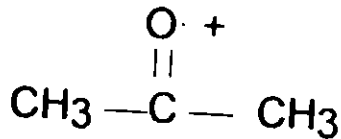
Ionización del Metano por Impacto Electrónico

# Ionización y Fragmentación (Acetona)

Fragmentación de  $M^+ \cdot$

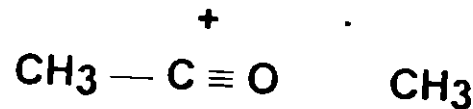
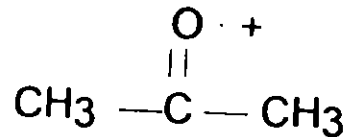


$m/z$  58



$m/z$  15

$m/z$  43

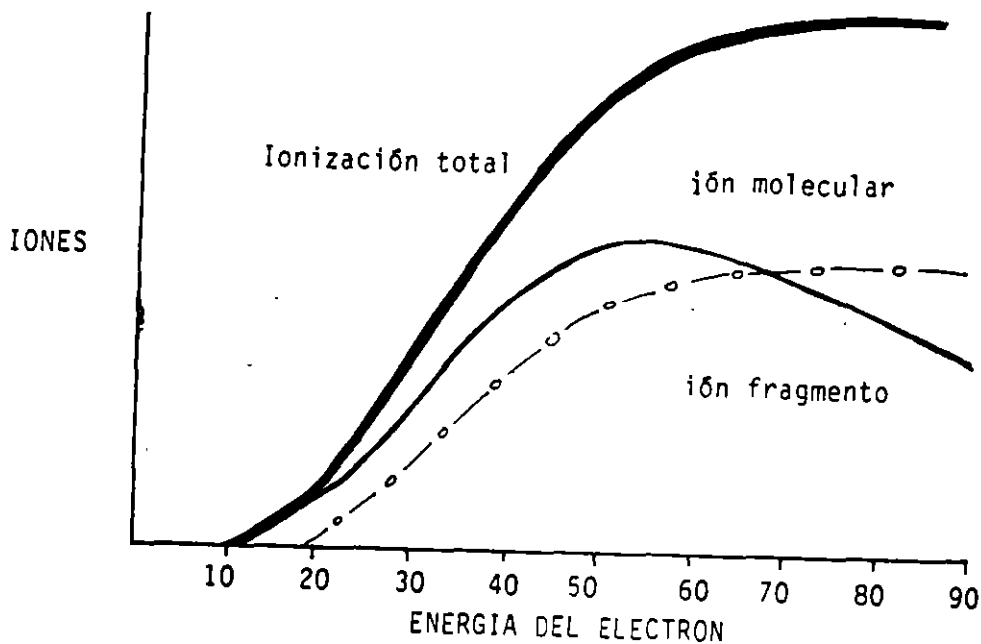


$m/z$  43

$m/z$  15

# Ionización Electrónica

Energía utilizada 70eV



En general, un ión molecular comenzará a fragmentarse en forma característica conforme la energía se incrementa

# Potenciales de Ionización (eV) para $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$

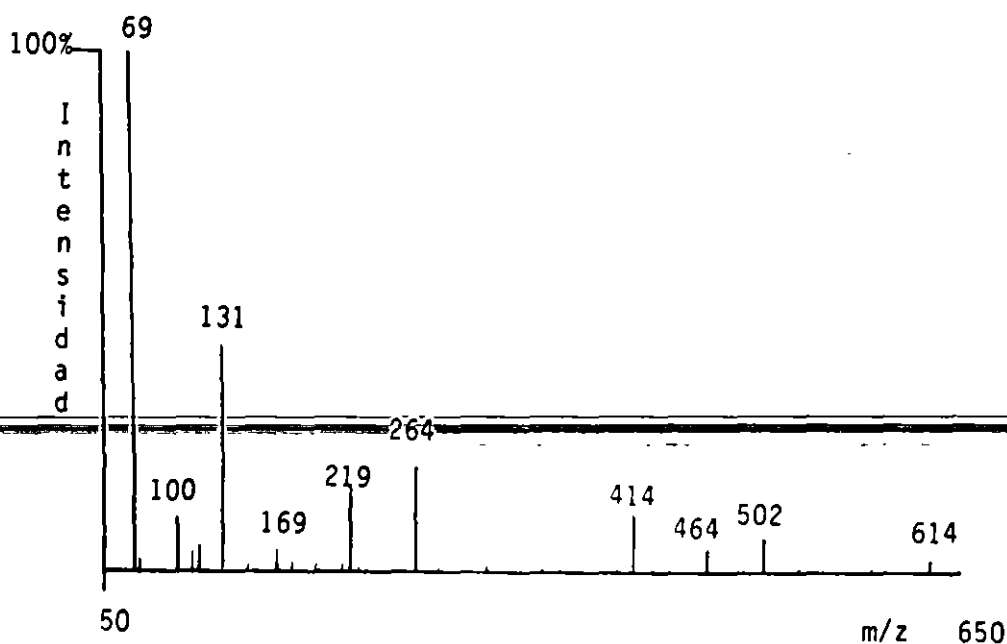
X	Potencial de ionización
H	11.07
$\text{CH}_3$	10.63
$\text{C}_2\text{H}_5$	10.34
OH	10.17
CHO	9.86
$\text{CH}=\text{CH}_2$	9.5
$\text{COCH}_3$	9.34
$\text{NH}_2$	8.78





# Características del Espectro de masas Obtenido por IE

- \* Alto grado de fragmentación, la información estructural e identificación se basa en espectros
- \* El ión molecular es débil o no se obtiene, por lo que se pierde la información del peso molecular.



Espectro de masas de Perfluorotributilamina

# Trayectoria Libre Promedio

"Mean Free Path"

El MFP de una partícula gaseosa representa la distancia promedio que un átomo o molécula viaja antes de interactuar con otra partícula.

$$\text{MFP} = \frac{1}{\sqrt{2}\pi n\sigma^2}$$

$n$  = Número de moléculas

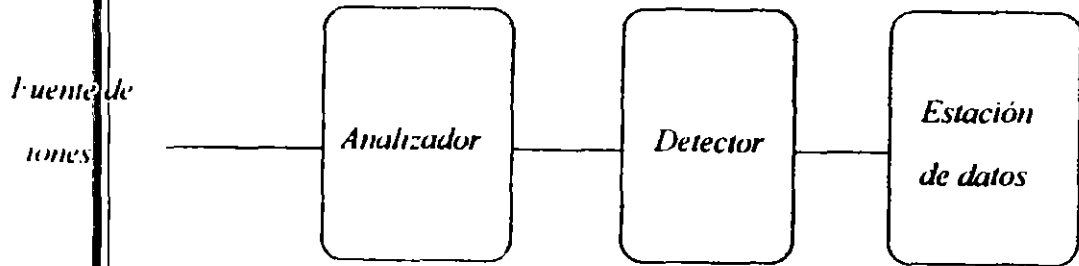
$\sigma$  = Diámetro de colisión

$$\text{MFP (cm)} = \frac{5 \times 10^{-3}}{P}$$

$P$  = Presión en Torr

---

# Espectrometro de Masas



# **Análisis Másico de Iones**

**Un Espectrometro de Masas  
es clasificado de acuerdo a la  
técnica usada para separar  
los iones.**

# TIPOS DE SEPARADORES IONICOS

SECTOR MAGNETICO

CUADRUPOLO

---

TRAMPA IONICA

# Poder de Resolución

La capacidad de un analizador de medir en forma satisfactoria una  $m/z$  definida.

$$Pr = \frac{m}{\Delta m}$$

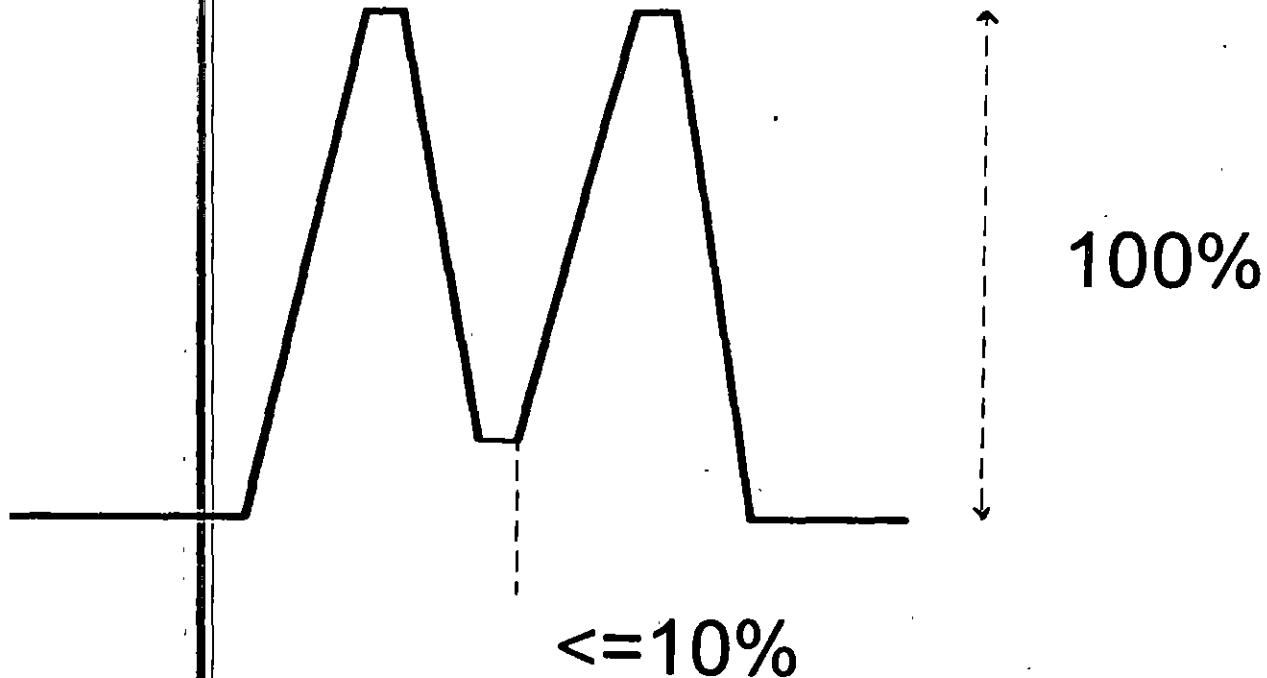
Pr = Poder de resolución

m = masa del componente por analizar

$\Delta m$  = Diferencia del intervalo de masas

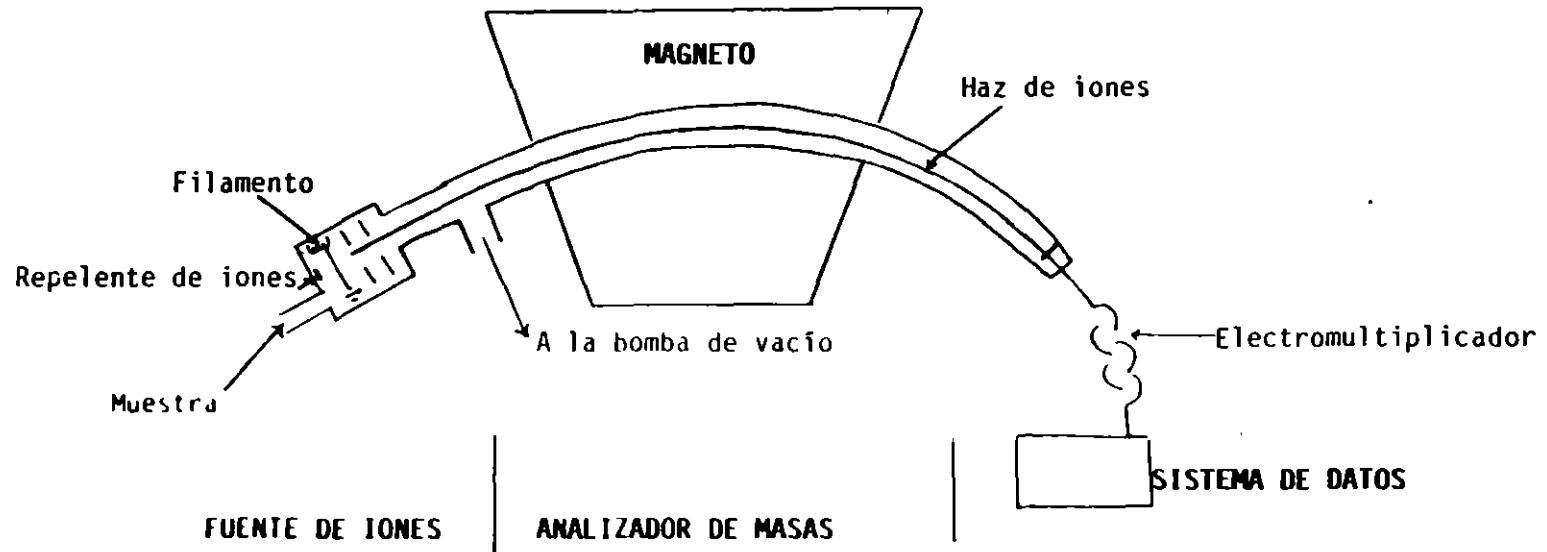
# Resolución ( % Valle)

Se considera que dos picos son resueltos, si la altura de la porción con que se sobreponen los dos picos es menor o igual al 10 %





# SECTOR MAGNETICO



## SEPARACION DE IONES

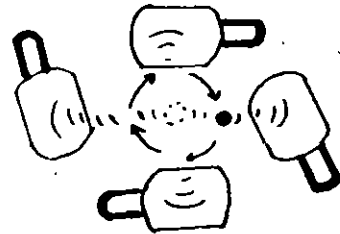
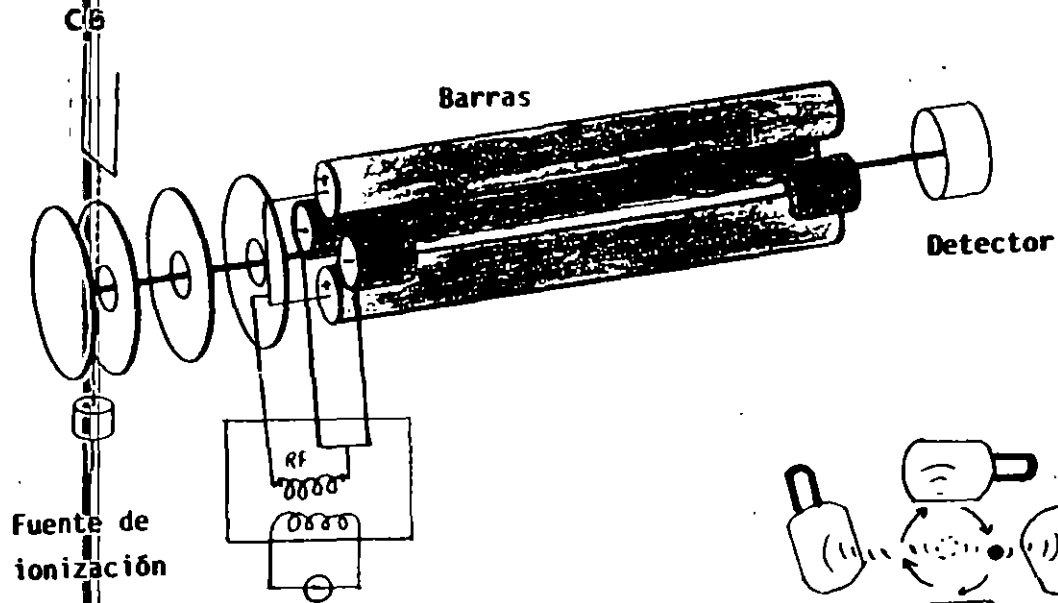
$$m/z = H^2 R^2 / 2V$$

H= Fza del campo magnético.

R= Radio de curvatura

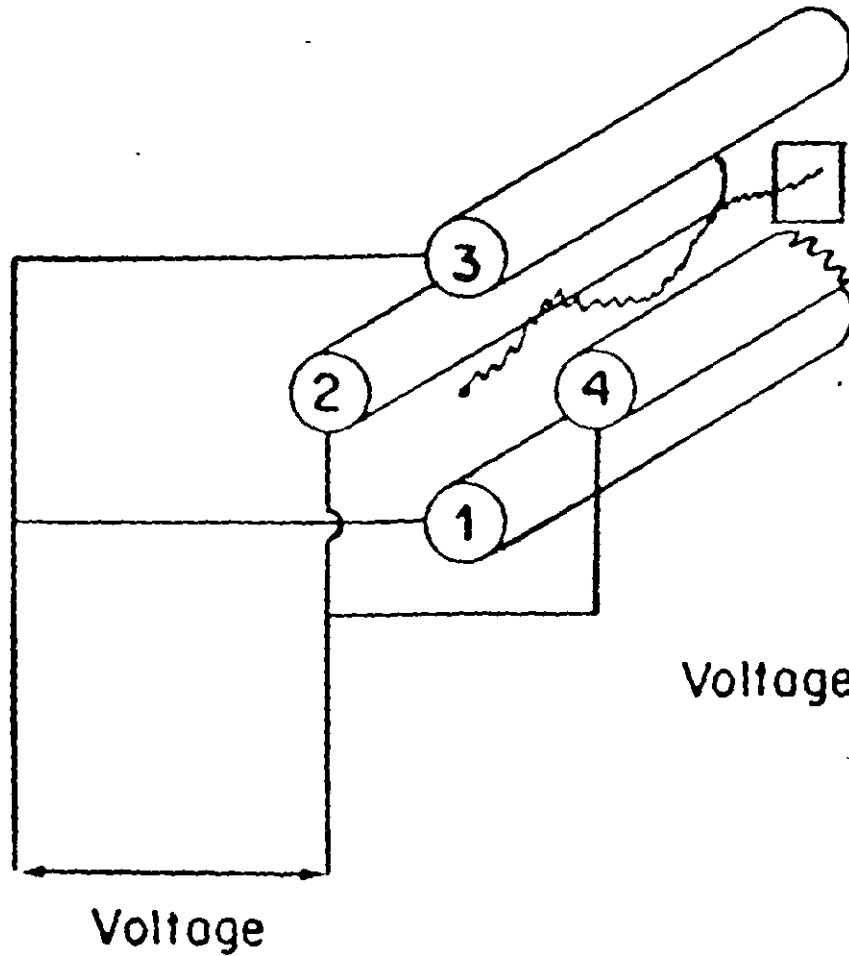
V= Voltaje de aceleración

# CUADRUPOLO



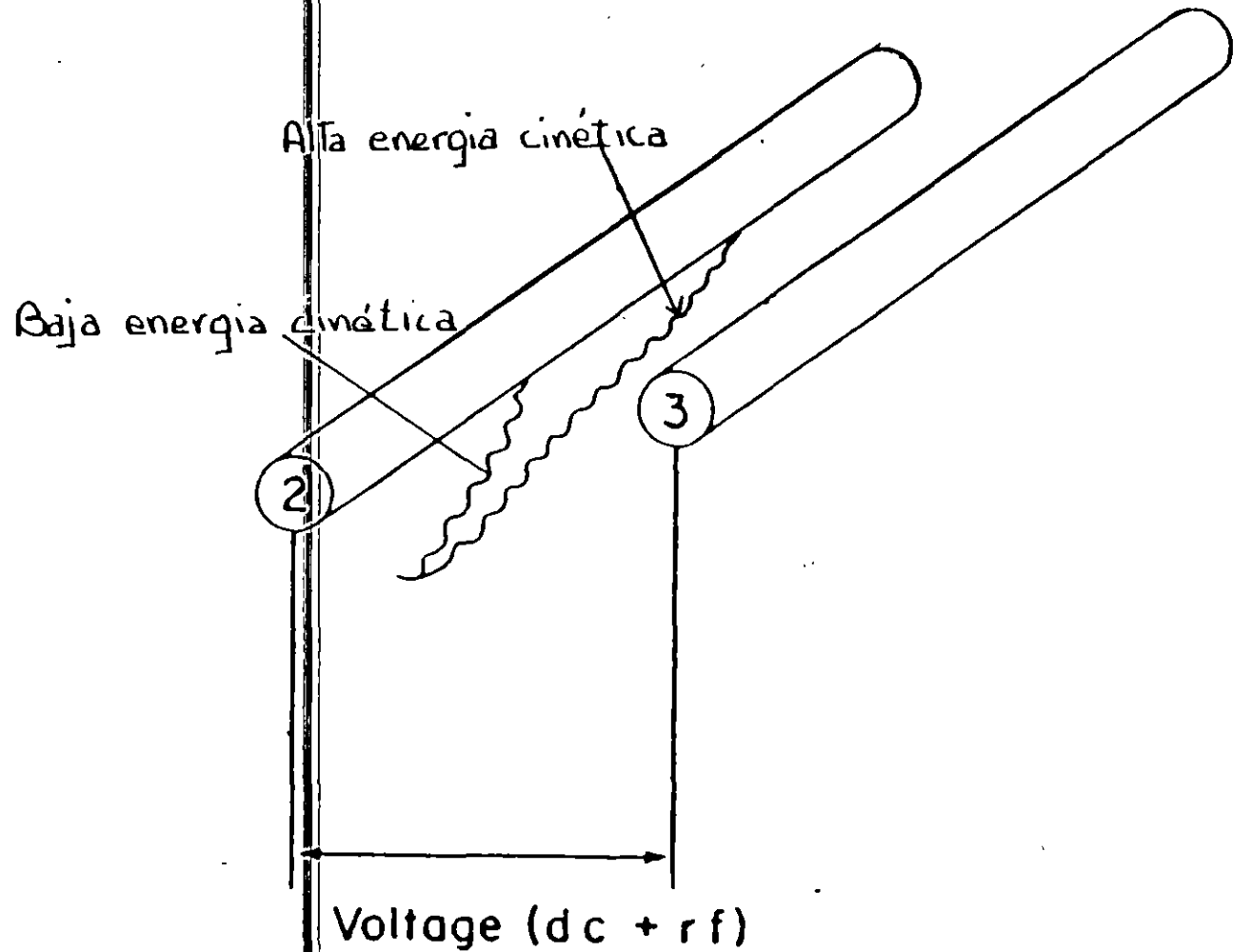
Movimiento de los iones

# Conexiones Eléctricas entre las Barras de un Analizador de Masas Cuadrupolo

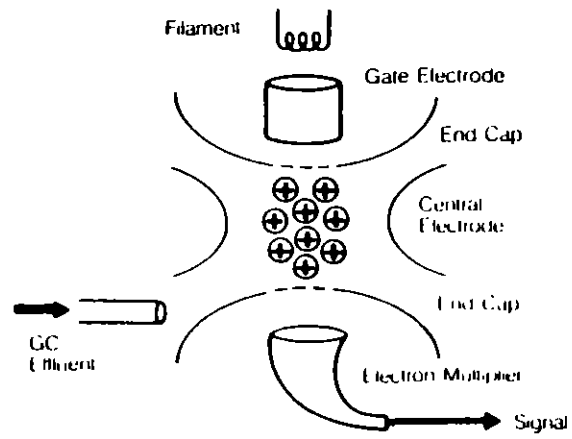


$$\text{Voltage} = U + V \cos \omega t$$

# Desviación de Iones entre las Barras a una Diferencia de Potencial variable



# TRAMPA IONICA



# COMPARACION

## **Cuadropolo convencional**

- \* Diseño Complejo
- \* Baja Sensibilidad
- \* Limpieza frecuente

## **Trampa iónica**

- \* Tecnologia Reciente
- \* Diseño Simple
- \* Alta Sensibilidad
- \* Limpieza Mínima

**varian** 

**INSTRUMENTACION**

**CG/EM**

## 4. INSTRUMENTACIÓN

### 4.1 Introducción.

El espectrómetro de masas trampa de iones (ion trap) pertenece a la familia de espectrómetros de masas cuadrupolares. En el que los iones han sido separados y analizados utilizando un campo de radiofrecuencia cuadrupolar, el cual se genera dentro de las superficies hiperbólicas de electrodos de acero inoxidable. La principal característica del espectrómetro de trampa de iones es que su fuente y el analizador están en la misma cámara, así la trampa iónica hace en tiempo lo que un espectrómetro de cuadrupolo convencional hace en espacio. Esto resulta en valores de barrido extremadamente altos, resultando en un espectro en barridos totales a valores  $<10\text{pg}$ . Incrementando el voltaje de radio frecuencia los iones de masas más altos se vuelven inestables, son expulsados de la trampa iónica y detectados cuando pegan en la superficie del electromultiplicador. Durante este barrido de radio frecuencia un voltaje suplementario llamado Modulación Axial es aplicado en los electrodos, con el fin de aumentar la eficiencia de expulsión. Un espectro de masas es generado por un barrido completo del voltaje de radiofrecuencia a través del intervalo de masas de interés.

### 4.2 Componente de la Trampa de Iones <sup>(6)</sup>

Un diagrama del sistema CG-EM es mostrado en la Diap. 4-1, siendo los componentes principales del mismo el puerto de entrada (CG), interfaz, espectrómetro de masas y sistema de datos (Diap. 4-2). Los componentes del espectrómetro de masas son mostrados mediante el diagrama de bloques en la Diap. 4-3. El analizador de trampa iónica consiste del ensamble del filamento, lentes, una compuerta para electrones, tres electrodos y un detector (Diap. 4-4), la trampa combina las funciones de ionización y análisis de masas en una misma región.

#### 4.2.1 Ensamble del Filamento

El ensamble del filamento consiste de dos filamentos de renio y una placa repelente. Ver Diap. 4-5. Los filamentos son montados en forma paralela, solo un filamento es utilizado a la vez. Durante la etapa de ionización los electrones son producidos por emisión térmica de un filamento Renio que se localiza en el ensamble del mismo, el cual se encuentra encima de la trampa iónica.



La corriente aplicada (5-100 uA) calienta el filamento lo suficiente para causar que los electrones se emitan. Los electrones son dirigidos hacia la trampa iónica por una placa de repulsión polarizada, la cual se mantiene a un voltaje negativo de -11.5 Volts (localizado directamente atrás del ensamble del filamento) y son enfocados en un rayo angosto por un lente cilíndrico que se mantiene a un potencial tierra Diap. 4-6.

#### ***4.2.2. La compuerta para Electrones.***

El flujo de los electrones en la trampa iónica está controlado por una compuerta, la cual está conformada por un electrodo cilíndrico.

Cuando los electrones no son necesarios para la ionización, la compuerta es mantenida a -150 Vcd. El potencial negativo previene que los electrones emitidos del filamento caliente, penetren a la cavidad de la trampa.

Cuando los electrones se requieren en la cavidad de la trampa, el potencial en la compuerta se cambia a +150 Vcd. La compuerta es mantenida a un potencial positivo durante un periodo de tiempo variable (de 10 useg a 25 miliseg) Vea la Diap. 4-7. Durante esta etapa los electrones son acelerados hacia la cavidad de la trampa de iones. La tapa superior contiene un sólo orificio en su superficie, lo cual permite el flujo dirigido de electrones hacia la cámara de trampa.

#### ***4.2.3. Los Electrodo de la Trampa de Iones***

La trampa de iones contiene tres electrodos de acero inoxidable:

- Electrodo Superior
- Electrodo Inferior
- Anillo Central

Las superficies internas de los tres electrodos son hiperbólicas. Juntas forman una cavidad en la cual la ionización, fragmentación, almacenamiento y análisis de masas ocurren (Diap. 4-8).

### ***4.3. Teoría de la Trampa de Iones.***

Los espectrómetros de masas de trampa iónica, esencialmente constan de un arreglo tridimensional de tres electrodos, con superficies internas hiperbólicas y simetría rotacional a lo largo de eje vertical z.

Una vez que los electrones entran en la trampa de iones, están bajo la influencia de un voltaje de radiofrecuencia, aquí es cuando se vuelven energizados por un promedio de 70 eV y la ionización de la moléculas ocurre.

#### ***4.3.1. El Voltaje de Radiofrecuencia***

Un campo eléctrico de cuadrupolo es generado aplicando un voltaje de radio-frecuencia al anillo del electrodo. La fuerza que se aplica en este campo dicta el movimiento de las partículas cargadas, tales como los iones en las direcciones x, y, z, esto es a un cierto voltaje conocido como voltaje de almacenamiento, el cual es fijado durante la ionización.

Los iones en el intervalo completo de operación del sistema (10 - 650 u) serán confinados a órbitas estables dentro de la cámara de trampa iónica.

Después comienza la rampa de VRf rápida para iniciar el análisis de masas. Durante el análisis de masas, el VRf va de bajo a alto voltaje.

Las Diap. 4-9 y 4-10 resumen los principios del Voltaje de Radiofrecuencia.

El voltaje al cual el ion es expulsado de la trampa se define como Voltaje de Resonancia.

Debajo de este voltaje los iones viajan en órbitas estables (Diap. 4-11)

El voltaje de radio frecuencia aplicado al electrodo central es generado por un control Analógico entre 0 - 150 V de pico a pico, a 1.05 MHz el cual es controlado por un circuito de control de masas de tal manera que el voltaje correcto es aplicado dentro del intervalo de masas especificado. La salida del control Analógico va a un auto transformador de radio frecuencia el cual aumenta el voltaje hasta aproximadamente 0 - 6750 V pico a pico (se mantiene la misma frecuencia).

El voltaje de la radio frecuencia puede ser modulado a través de todo el intervalo de masas (10 - 650u) ~~ajustando la barra de afinación en la parte superior de la caja del autotransformador.~~

### 4.3.2. Estabilidad de los Iones dentro de la Trampa.<sup>(3)</sup>

El movimiento de los iones en el campo del cuadrupolo tridimensional, se describe matemáticamente por las soluciones a una ecuación diferencial de segundo orden conocidas como las ecuaciones de Mathieu. La mayoría de los campos cuadrupolares consisten de radio frecuencias y potencial DC aplicados a estas soluciones matemáticas, las cuales contienen una expresión para el potencial de voltaje de radio frecuencia ( $V \cos \omega t$ ) y de potencial de DC ( $U - V \cos \omega t$ ).

Los parámetros actuales usados para definir la influencia combinada de potencial de campo, la masa de los iones atrapados y el radio de la cámara que los contiene son  $a_u$  y  $q_u$ ; donde  $a_u$  representa la influencia cd y  $q_u$  representa la influencia de radio frecuencia ( $u$  representa cualquier dirección). Cuando las coordenadas de Mathieu <sup>(2)</sup>  $a_z = -8zU/mr_0^2\omega^2$  y  $q_z = 4zV/mr_0^2\omega^2$  de la ecuación Mathieu son graficadas, la resultante se le conoce como un diagrama de estabilidad y representa las áreas en  $a$  y  $q$  en el espacio donde los iones son estables o inestables.

La estabilidad radial, expresada en términos de  $a_r$  y  $q_r$ , deberá ser mantenida simultáneamente con la estabilidad en la dirección  $z$ .

La región en la trampa correspondiente a la estabilidad simultánea en ambas direcciones  $r$  y  $z$ . El diagrama mostrado en la Diap. 4-12 puede ser considerado como una zona de confinamiento de los iones. Los iones de una  $m/z$  dada (400) puede ser movido de un punto a otro cambiando los voltajes aplicados cd y rf ( $U$  y  $V$ ) y permanezcan en trayectorias estables. Las coordenadas  $a$  y  $q$  reflejan el potencial dc ( $U$ ) y rf ( $V$ ) aplicado, la frecuencia angular  $\omega$  del rf y las dimensiones de la trampa ( $r_0$  y  $z_0$ ), así como la  $m/z$  del ion atrapado. En el diagrama los círculos indican los puntos ocupados por los iones con  $m/z$  400 cuando los voltajes cd y rf son cambiados, respectivamente, a los niveles indicados por los números mostrados en paréntesis.

Iones de diferente  $m/z$  pueden habitar la zona de estabilidad simultáneamente, y si  $U$  y  $V$  son fijos estos iones serán encontrados en diferentes puntos de esa zona. Un ion con una  $m/z$  alta llega a ser inestable a valores de amplitud rf mas alta que una  $m/z$  baja. En un barrido de voltaje de radio frecuencia es barrido hacia arriba, los iones de masas mas altos se hacen inestables en el eje direccional (hacia arriba o abajo) y se mueven a lo largo de eje  $q$ . La trayectoria u oscilación de los iones atrapados, en la dirección  $z$  y  $r$  se representa por  $\beta_z$  y  $\beta_r$  en el diagrama de estabilidad. La línea  $q_z$  y  $\beta_z$  se interceptan en inestabilidad selectiva de masas, los iones son movidos a lo largo del eje  $q_z$ , cuando  $q_z = 0.908$  este es el punto en el cual los iones se hacen inestables y su trayectoria en la dirección  $z$  excede el limite del campo de atrapamiento y ellos son expulsados en la dirección  $z$ .

157

La Diap. 4-13 representa una muestra el movimiento de los iones a largo del eje  $q$  (iones de masas más pequeños son expulsados primeramente) y el cambio en la frecuencia y amplitud de movimiento cuando los iones se acercan a la expulsión.

De esta forma conforme el voltaje rf se incrementa, conforme aumenta la  $m/z$  de los iones, estos son sacados en secuencia y pueden ser detectados.

#### 4.3.3. *Movimiento de los Iones.*

Experimentos de simulación dentro de la trampa de iones proporcionan información valiosa del movimientos de los iones. Por ejemplo en la Diap. 4-14 muestra en la parte superior el movimiento de un ion de  $m/z$  100 en una trampa de iones operada a 1.1 MHz y un Voltaje rf de 500 Volts, los cuales corresponden a un valor de  $qz = 0.4039$ , en la parte inferior de este diagrama se muestra la trayectoria del ion en las direcciones  $r$  y  $z$ . Los iones no son encontrados en el centro de la trampa donde forman un espacio en forma de "donna". Las colisiones con el gas de acarreo amortiguan el movimiento de los iones, reduciendo su velocidad y causando que la "dona" se contraiga hacia el centro de la trampa.

Los experimentos muestran también que los iones atrapados tienen frecuencias características de movimiento en las direcciones  $r$  y  $z$  estas son de 78 y 160 kHz respectivamente para las condiciones mostradas en la Diap. 4-14.

La Diap. 4-15 muestra las tres dimensiones del campo cuadrupolar generado dentro de la trampa iónica. La uniformidad de este campo es crítico para atrapar eficientemente los iones; por ejemplo, cualquier imperfección en las superficies de los electrodos puede producir campos de ionización u otros problemas. La tolerancia de fabricación de estas partes son por lo tanto muy estrictas, así como el requisito de un manejo cuidadoso.

#### 4.3.4 *Modulación Axial* <sup>(6)</sup>

~~El número de iones almacenados en la cavidad de la trampa de iones es proporcional al tiempo de ionización y la corriente de emisión del filamento. Aunque la máxima capacidad de almacenamiento de los iones en la trampa es aproximadamente de  $10^6$  a  $10^7$  iones, la repulsión por carga espacial ocurre cuando el número de iones excede  $10^4$  a  $10^5$ . Las interacciones por carga espacial causan pérdida de resolución másica unitaria. Para corregir esta limitación, un pequeño voltaje ac, el voltaje de la modulación axial, es aplicado a los electrodos superior e inferior, Diap. 4-16.~~

El voltaje de Modulación Axial es generado en la tarjeta electrónica SAP (Procesador de Adquisición de Barridos) a una frecuencia fija (485 kHz) y un voltaje variable (0 -12 V pico a pico), éste es suministrado directamente a los electrodos de la tapa a un voltaje fijo (3 - 5 V) durante el análisis.

El voltaje suplementario de la modulación axial provoca la expulsión resonante de los iones debido a su influencia en el movimiento de estos últimos en la dirección z. La dirección r no es afectada por la modulación axial. La Diap. 4-17 muestra un experimento mostrando el efecto de la modulación axial para el ion m/z 100 con un voltaje suplementario de amplitud de 12 Volts y una frecuencia de 160 kHz, para igualar la frecuencia del movimiento-z del ion, después de varios ciclos de aplicación de este voltaje el ion es sacado de la trampa, pasando a través de los orificios de la tapa inferior.

En la operación normal de la trampa de iones, el voltaje rf de la modulación axial es casi la mitad del voltaje de rf (485 kHz). Solo cuando el ion es casi expulsado de la cavidad de la trampa de iones entra en resonancia con esta frecuencia, y se mueve lejos del centro de la trampa, donde el campo generado por el voltaje rf es cero (y los efectos de carga espacial son fuertes), hacia una región donde el campo generado por el voltaje rf es fuerte (y los efectos de carga espacial son pequeños). Como resultado, la expulsión del ion se facilita, y la resolución másica es significativamente mejorada.

La Diap. 4-18 muestra la evidencia de la carga espacial y la pobre resolución a tiempos de ionización de 20 msec comparado al espectro superior a un tiempo de 1 msec (éste es el equivalente a inyectar una muestra más concentrada). El espectro de abajo muestra la resolución normal con la adición de la modulación axial.

#### 4.3.5. Presión de Helio dentro de la Trampa de Iones <sup>(6)</sup>

Un aspecto importante del almacenamiento de los iones en la trampa es la influencia del gas de acarreo de bajo peso molecular como Helio o Hidrógeno (Diap. 4-19). La presencia de helio a presiones de aproximadamente  $10^{-3}$  Torr, mejora significativamente la resolución de las masas y el límite de detección de la trampa iónica. El efecto conocido como amortiguación ("damping") en que las colisiones frecuentes entre los iones atrapados y las moléculas de gas ligero, que se mueven lentamente causan que las órbitas de los iones se colapsan al acercarse al centro de la trampa. Esto los mantiene alejados de la superficie de los electrodos donde pueden ser afectados por imperfecciones en el campo y también los mantiene en una órbita radial más apretada, del tal manera que cuando se hacen inestables, serán expulsados como un rayo más enfocado.

El dramático efecto amortiguador del helio en la señal de los iones generada por inestabilidad selectiva de masa, es ilustrado en la Diap. 4-20. En ausencia de gas, la forma del pico para el ion m/z 69,  $CF_3^+$  de la PFTBA, tiene una resolución de 70. Virtualmente no hubo señales para el ion m/z 502, también de la PFTBA.

La resolución del instrumento para el ion  $m/z$  69 fue incrementada a 185 mientras una resolución de 1700 fue observada para el ion de  $m/z$  502<sup>(3)</sup>.

El analizador de trampa de iones ha sido cuidadosamente diseñado de tal forma que el flujo de la columna del cromatógrafo de gases provee la cantidad requerida para la amortiguación. El flujo óptimo de Helio en la trampa iónica para mantener la máxima resolución está entre 0.75 y 2 mL/min.

#### ***4.4 El Electromultiplicador***<sup>(6)</sup>

El electromultiplicador está colocado debajo de la tapa inferior de la trampa y detecta los iones positivos que son expulsados de la trampa. El multiplicador es un dinodo cónico continuo, recubierto en el interior con un material activo y tiene voltajes negativos entre -800 y -3000 V, los cuales son suministrados a su superficie superior. Cuando un ion energético golpea la superficie interior de multiplicador, los electrones son dislocados y entonces acelerados hacia abajo del cono por un gradiente de un potencial positivo (la salida de este cono está a un potencial a tierra.) cuando los electrones continúan pegando en las paredes producen una cascada de electrones. El multiplicador está normalmente fijado con una ganancia de  $10^5$  (esto ajustando el voltaje proporcionado) por ejemplo, por cada ion que pegue en la superficie, 100,000 electrones son producidos Diap. 4-21 y 4-22. Cuando los electrones salen del cono multiplicador ellos son colectados en un ánodo y la señal resultante se manda al electrómetro / integrador en la tablilla Analógica. Hay varios factores que pueden afectar la vida de los multiplicadores:

el acondicionamiento adecuado de un multiplicador nuevo, la operación del sistema con un fondo grande de aire / agua, dejar el multiplicador encendido durante la salida del disolvente, etc. (Diap. 4-23). La vida promedio de un multiplicador en la trampa iónica es aproximadamente 12 meses. Cuando el multiplicador alcanza 2500 V, debe ordenarse un multiplicador nuevo, ya que éste alcanzará rápidamente 2500 - 3000 V (aproximadamente 4 - 6 semanas), como lo muestra la Diap. 4-24.

#### ***4.5 Componentes Electrónicos***<sup>(6)</sup>

Los componentes electrónicos del sistema de Trampa De Iones incluyen:

- Tarjeta de Interconexión
- Tarjeta de Control de la Fuente de Poder
- Tarjeta de Control Analógica
- Tarjeta Procesador de la Adquisición de Barrido
- Generador de RF

La Diap. 4-25 contiene un diagrama funcional de bloques del sistema electrónico.

#### 4.6 Componentes Mecánicos.

- Controles e Indicadores
- Ventiladores
- Sistema de Vacío
- Línea de Transferencia

La Diap. 4-26 muestra un diagrama del sistema de vacío de la Trampa De Iones

##### 4.6.1 Sistema de Alto Vacío (2)

El espectrómetro de masas opera al alto vacío para:

- Asegurar que los filamentos no sean quemados, por oxidación en presencia de aire.
- Ayuda a vaporizar muchas de las muestras que son analizadas.
- Previene que los iones, una vez formados, sean perdidos por colisión con gases atmosféricos.



- Elimina muestra después del análisis, antes de que una nueva muestra sea introducida. Como la muestra esta en fase de vapor el vacío es esencial (Diap 4-27)

- Aumenta el "Mean Free Path" (MFP)

El MFP es la distancia promedio que una partícula gaseosa viajará antes de que choque con otra (Diap. 4-28)

$$\text{MFP(cm)} = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{\text{P(Torr)}}$$

#### 4.6.1.1. Bomba Turbo molecular<sup>(6)</sup>.

El alto vacío puede ser proporcionado mediante bombas de difusión o bombas turbo moleculares (Diap. 4-29). Bajo condiciones de operación normal, esta última proporciona aproximadamente  $10^{-5}$  Torr, con un flujo de 60 L/seg.

#### 4.6.1.2. Bomba de Aspas Rotatorias.

Esta bomba establece el vacío necesario para la propia operación de la bomba turbo molecular. La bomba tiene una capacidad de 90 L/min y mantiene un vacío de menos de 0.05 Torr. La bomba de aspas esta conectada a la turbo molecular mediante un tubo de Tygon de 2.1 metro .

#### 4.6.2. Gas de Calibración.

El sistema está calibrado usando Perfluorotributilamina (PFTBA o FC-43) el cual está contenido en un frasco de vidrio y se permite que pase a la trampa iónica encendiendo o apagando una válvula de solenoide (controlado por el software). El flujo de gas de calibración al sistema es controlado por una válvula de alta resolución.

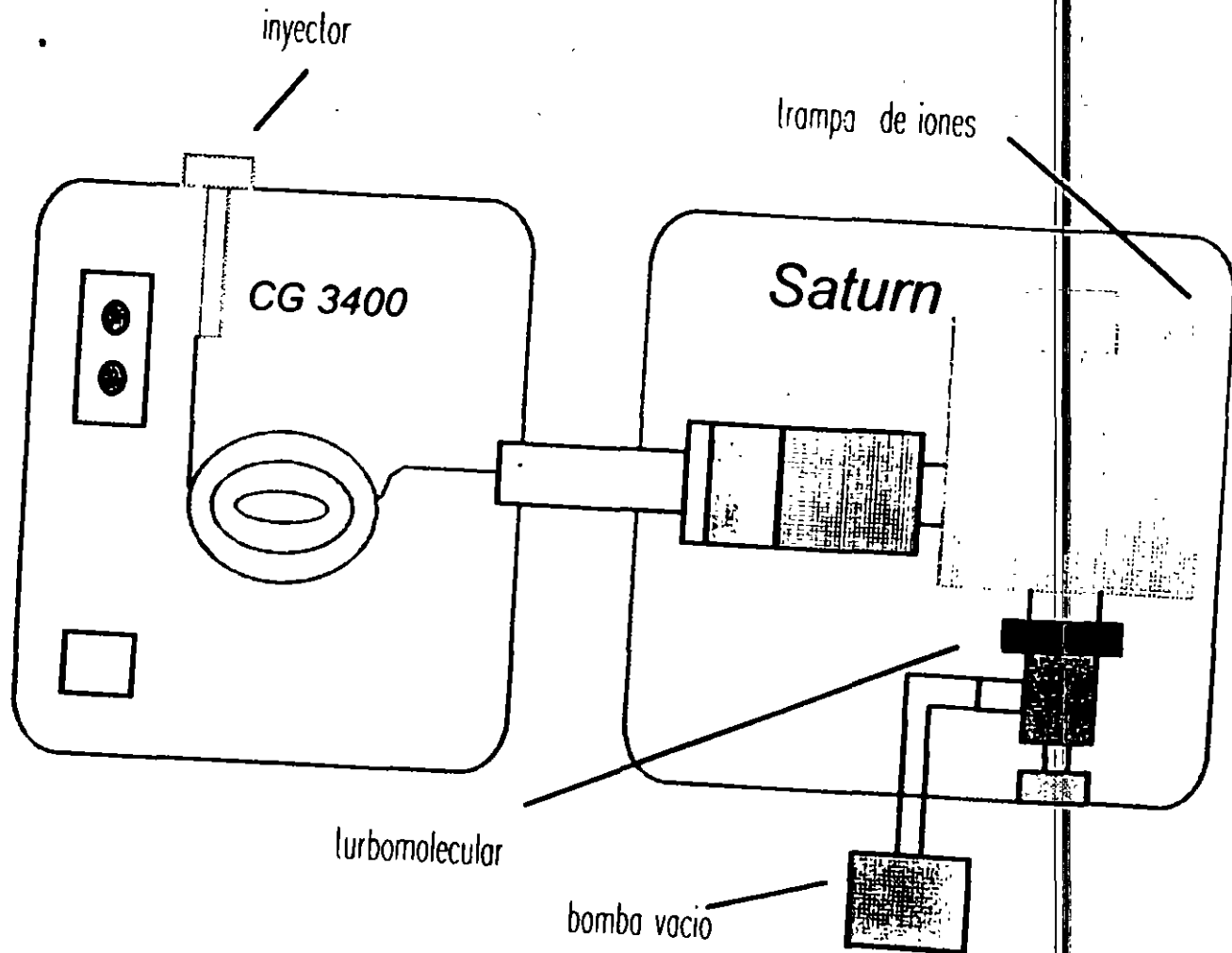
~~La Diap. 4.30 es un esquema neumático de la plomería de gas de calibración. Observe~~  
que hay un solenoide de tres direcciones que sirve para mantener una evacuación constante del gas de calibración en la plomería. Esto evita que una gran cantidad de este gas entre al analizador cuando la valvula de solenoide sea encendida, también que cualquier vapor de agua o aire pueda acumularse en la plomería cuando no esté en uso. Si la presión de gas de calibración es fijada correctamente, el líquido en el frasco debe durar aproximadamente seis meses. La válvula de aguja puede cerrarse cuando no este en uso para prevenir la pérdida del compuesto de calibración. Si esto se hace, la plomería debe ser purgada por algunos minutos para remover aire/agua en las líneas antes de encender la válvula de solenoide.



#### **4.7 Línea de Transferencia.<sup>(6)</sup>**

La línea de transferencia tiene 22 cm de longitud y 4.1 cm de diámetro. Es un tubo de acero inoxidable que directamente se acopla al CG con el espectrómetro de masas (Diap. 4-31). Un extremo de la línea de transferencia es insertado dentro de un orificio del CG y se extiende hacia el horno del CG. El otro extremo es insertado en el ensamble de la Trampa de Iones. El propósito de la línea de transferencia es mantener la columna del CG caliente cuando entra al espectrómetro de masas.

SISTEMA CROMATOGRAFO DE GASES - ESPECTROMETRO DE MASAS

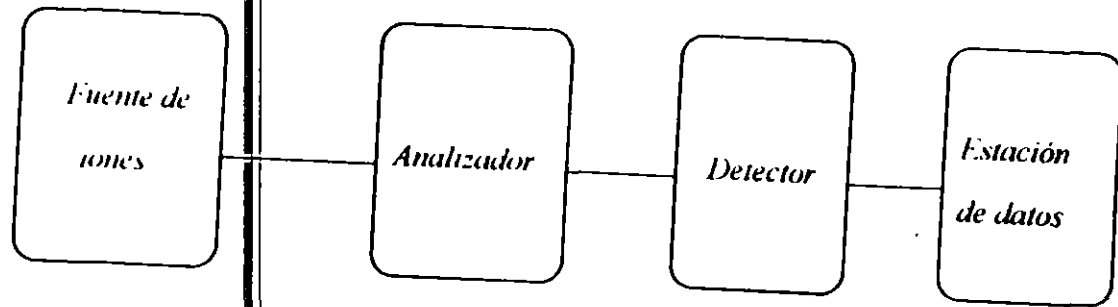


# **Principios de CG-EM**

## **Componentes del SistemaCG-EM**

- \* Puerto de entrada (CG)
- \* Interface
- \* Espectrometro de Masas  
Ionizador, Analizador, Detector
- \* Sistema de Datos

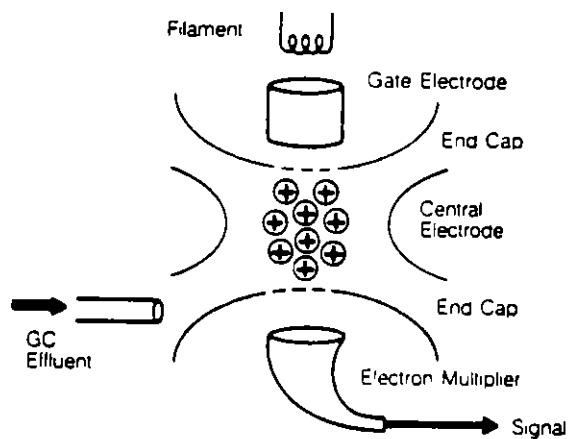
# Espectrometro de Masas



# Trampa iónica

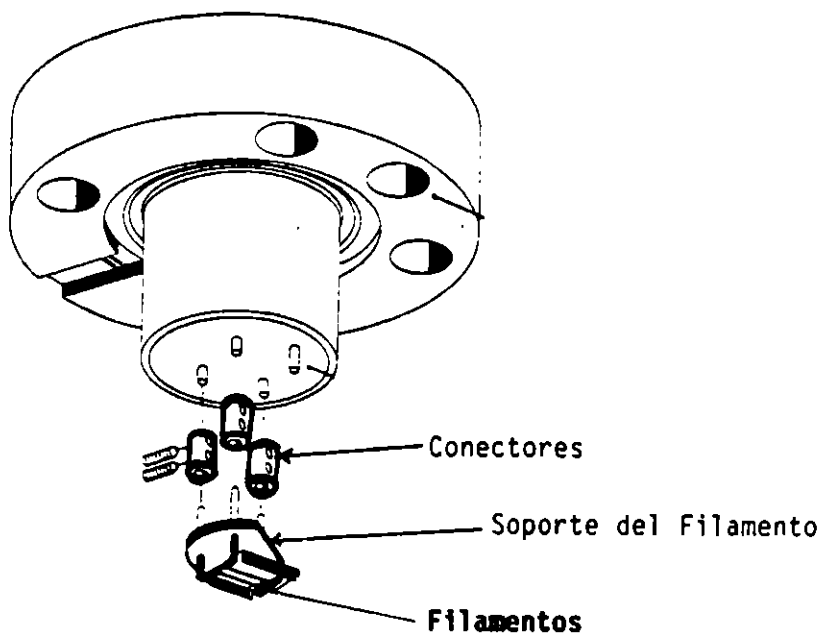
Componentes:

- \* Filamento
- \* Compuerta para electrones
- \* Tres electrodos
- \* Detector (electromultiplicador)



# Corriente de Emisión

La corriente producida por emisión termoiónica de un filamento de renio

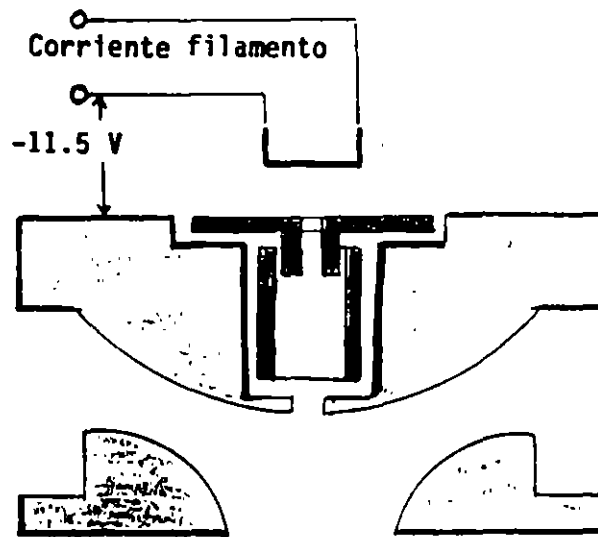


CORRIENTE DE EMISION DE 5-100 uA

# Filamentos

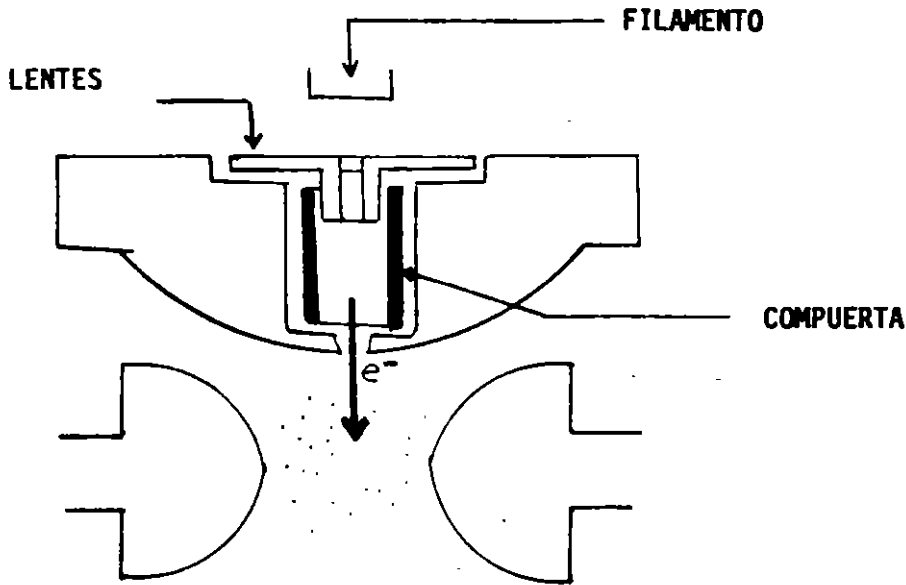
Corriente de emisión

10-100  $\mu\text{A}$



- \* Los electrones son creados por emisión térmica de un filamento de renio
- \* Un segundo filamento sirve como repuesto del primero
- \* El ensamble del filamento es polarizado a -11.5 V, para proporcionar un campo eléctrico que acelera los electrones

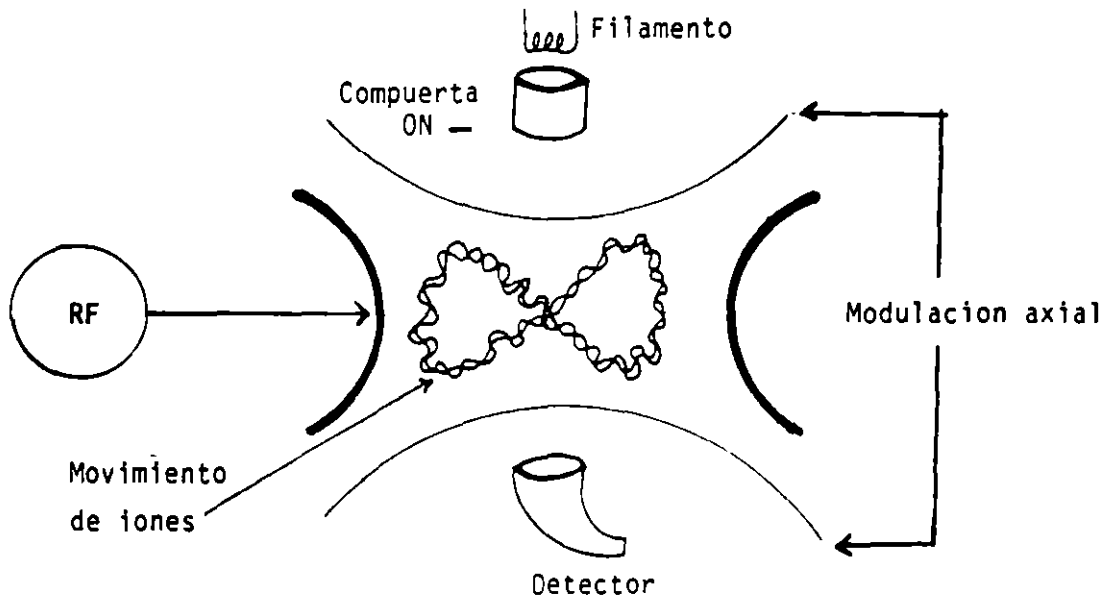
# Compuerta para Electrones



- La compuerta es un electrodo cilíndrico que controla la entrada de los electrones en la cavidad de la trampa
- Apagada (-150V): los  $e^-$  no entran en la trampa
- Encendida (+150V): los  $e^-$  son acelerados (10  $\mu$ seg a 25 mseg)



# Rampa de Radiofrecuencia



Orbitas de los iones dentro de la trampa



Separación de iones debido a la rampa de RF aplicada en el anillo central de la trampa.

# **RAMPA DE RADIOFRECUENCIA**

El voltaje de RF es aplicado en el anillo central de la trampa.

Durante la ionización el RF es fijado en el **VOLTAJE DE ALMACENAMIENTO**.

Después comienza la rampa de RF rápida para iniciar el análisis de masas.

Durante el análisis de masas, el RFV va de bajo a alto voltaje.

El voltaje en el cual el ión es expulsado de la trampa se define como **VOLTAJE DE RESONANCIA**

Debajo de este voltaje los iones viajan en orbitas estables. Conforme el RFV se incrementa, la amplitud de las oscilaciones también, en la dirección vertical, como resultado los iones son expulsados de la trampa hacia el EM.

---

# **Trampa de Iones**

## **Principios de Operación**

### **Voltaje de Radiofrecuencia (RF)**

Es el voltaje aplicado al electrodo central

(0-6750 V a 1.05 MHz)

Durante la ionización de las moléculas de la muestra el RF se fija en un voltaje inicial-

"**voltaje de almacenamiento**". Este voltaje es apropiado para almacenar o atrapar los iones de interés

Las unidades utilizadas son DAC.

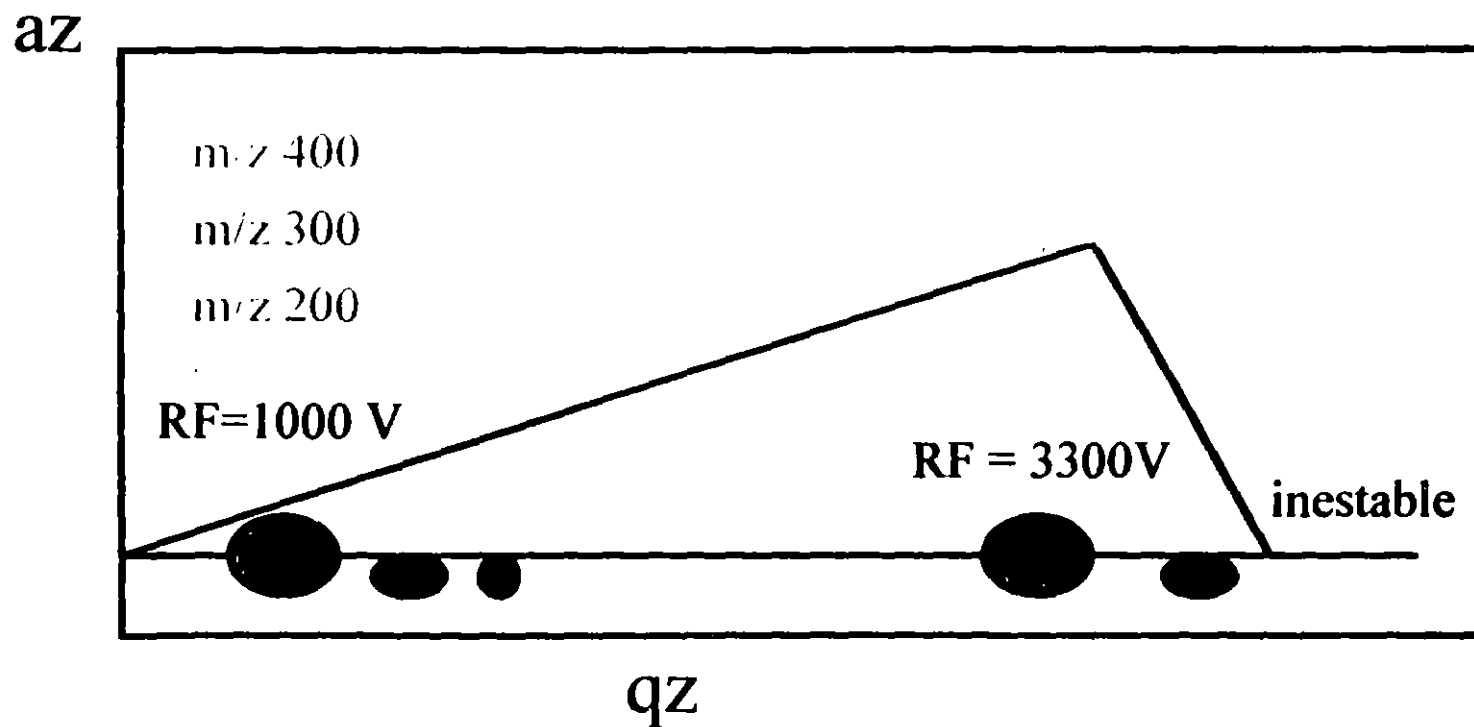
## **Conversión**

6.3 DACs/ amú

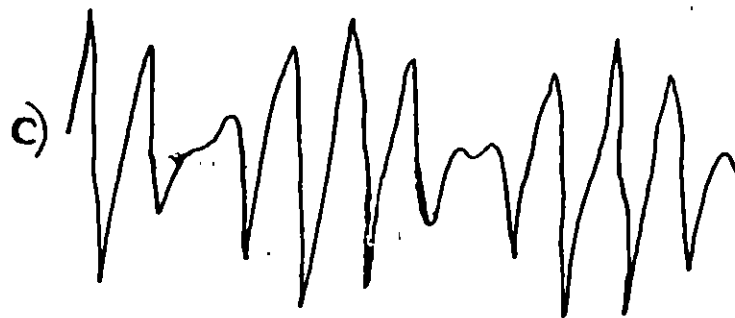
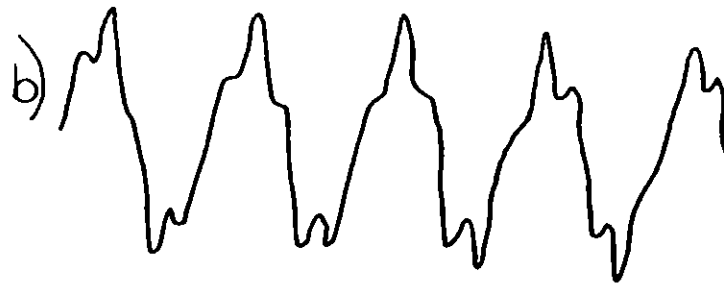
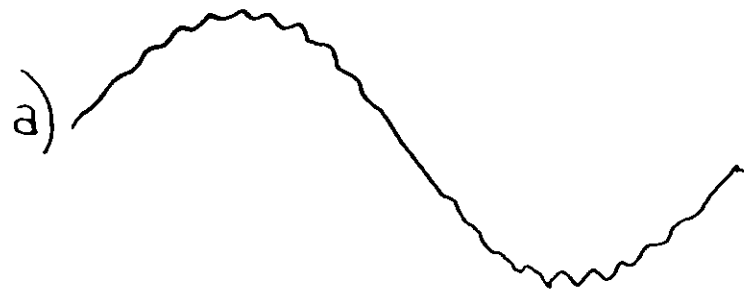
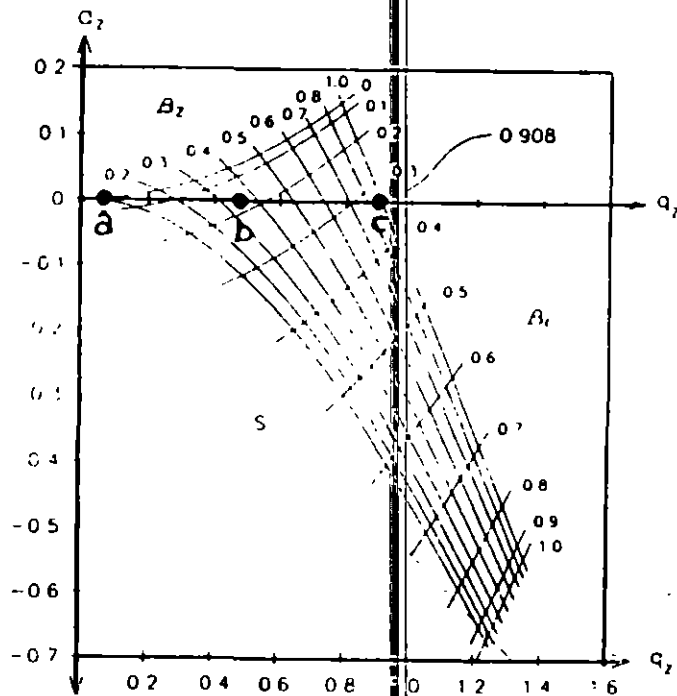
... 125 DACs = 20 amu

(todos los iones con  $m/z > 20$  serán atrapados)

# Posición de los Iones en el Diagrama de Estabilidad al aumentar el Voltaje

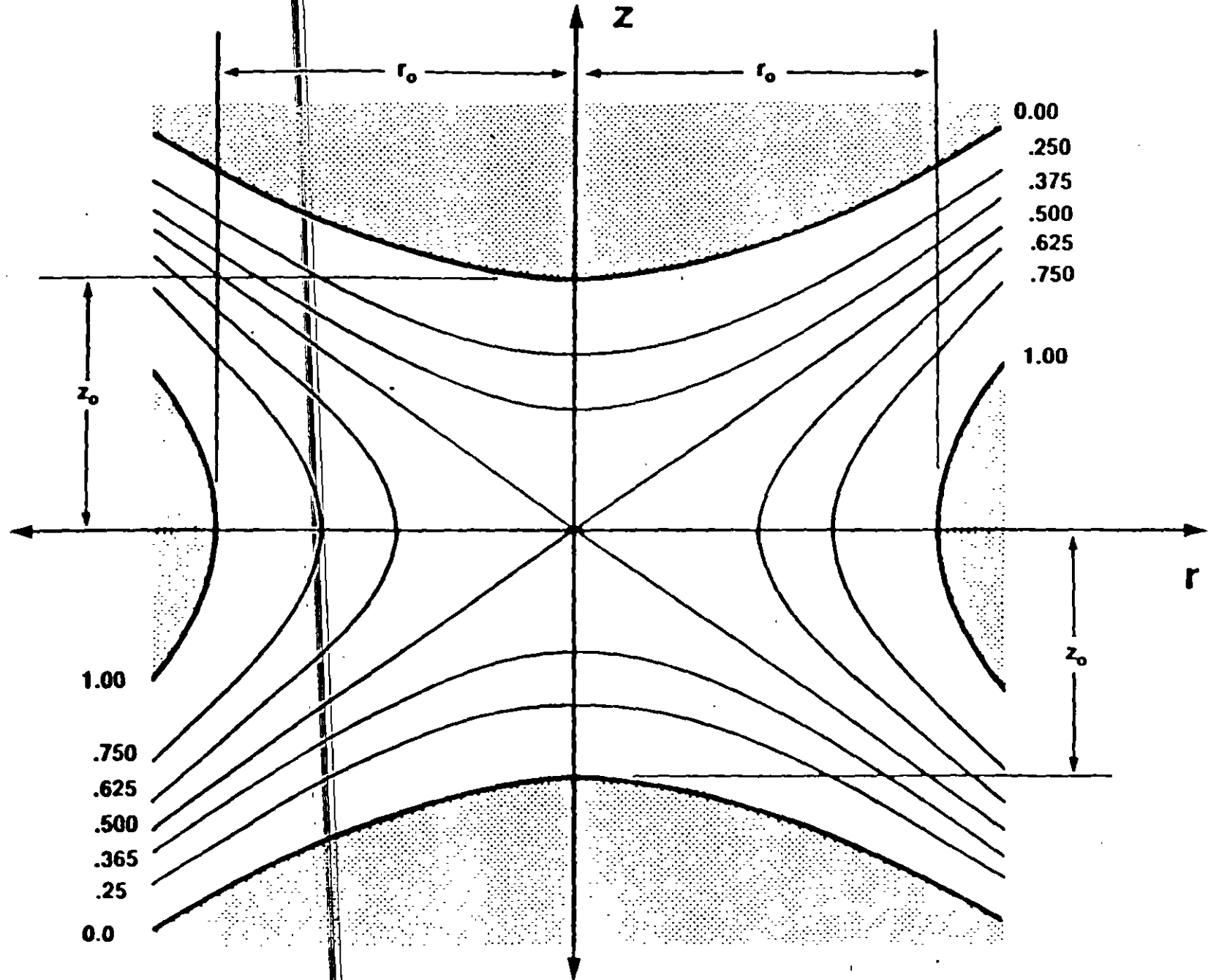


# Movimiento del ión

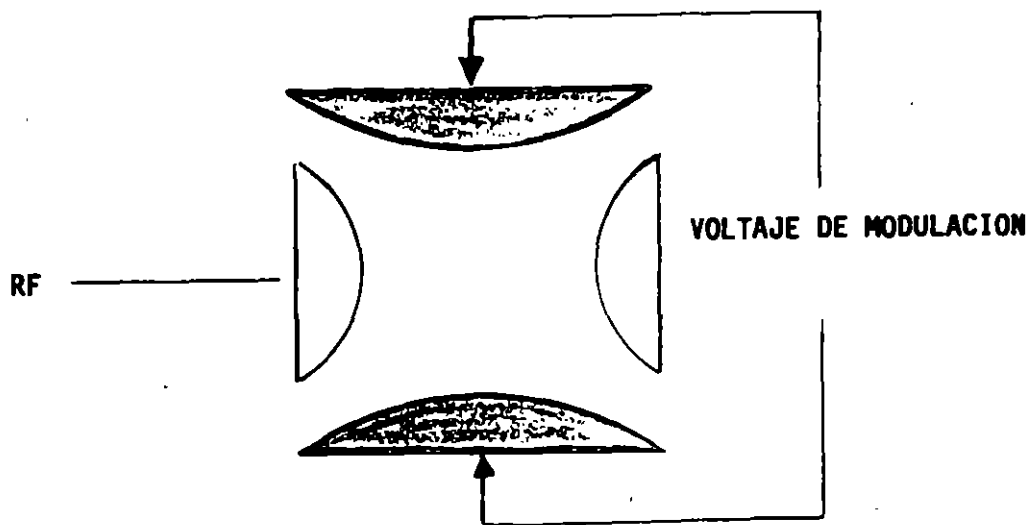




# Equipotential Lines for Three Dimensional Quadrupole Ion Trap



# Modulación Axial



VOLTAJE M/A; 485 KHz (el voltaje M/A puede ser cambiado en Instrument Control)  
Valor prefijado en 4V

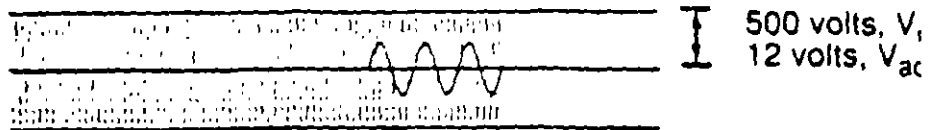
La modulación Axial facilita la expulsión de los iones positivos minimizando el efecto de

**"carga espacial".**

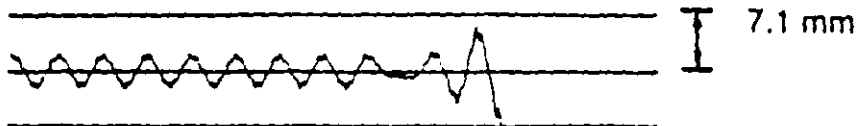
Mejora significativamente la resolución másica



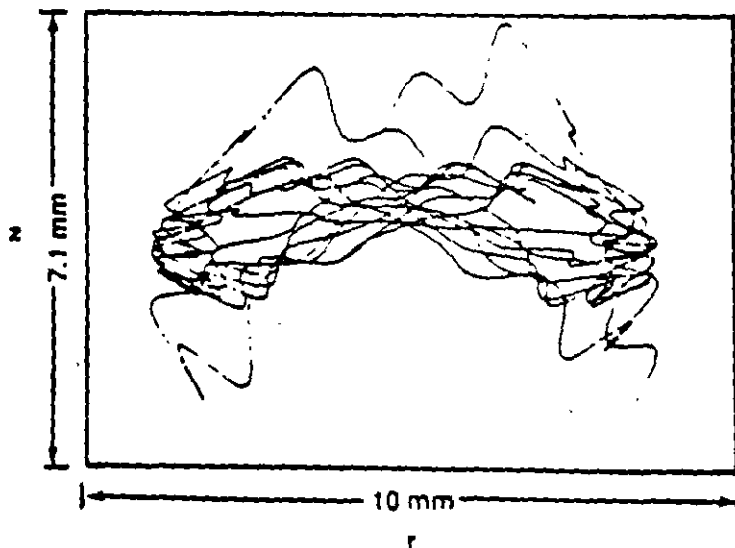
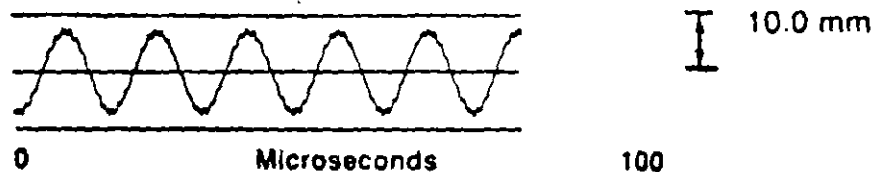
### Amplitude of rf and supplementary ac signals



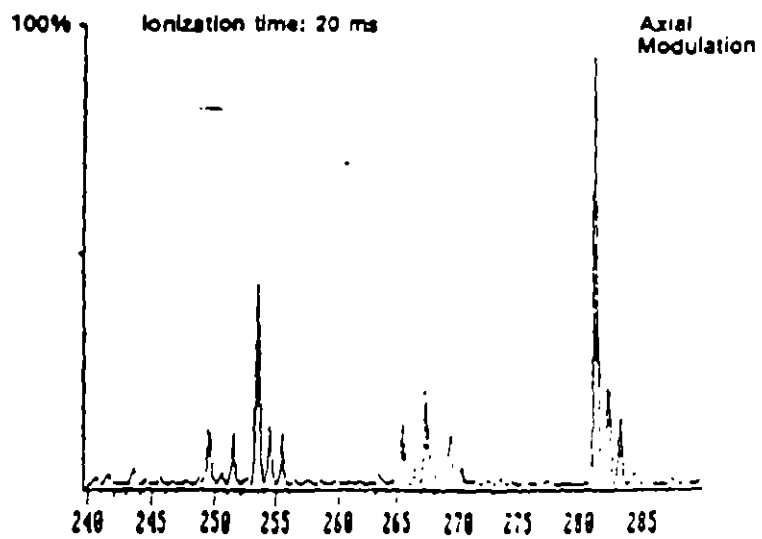
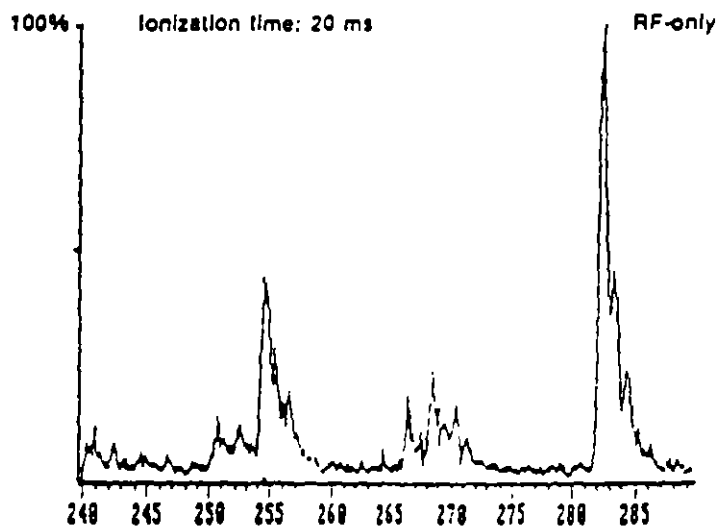
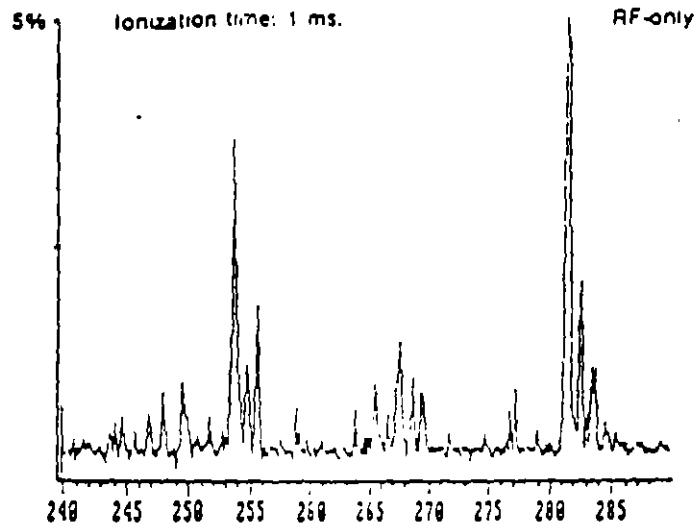
### Ion motion in z direction



### Ion motion in r direction



# Axial Modulation



$$\text{MFP(cm)} = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{\text{P(Torr)}}$$

#### 4.6.1.1. Bomba Turbo molecular<sup>(6)</sup>.

El alto vacío puede ser proporcionado mediante bombas de difusión o bombas turbo moleculares (Diap. 4-29). Bajo condiciones de operación normal, esta última proporciona aproximadamente  $10^{-5}$  Torr, con un flujo de 60 L/seg.

#### 4.6.1.2. Bomba de Aspas Rotatorias.

Esta bomba establece el vacío necesario para la propia operación de la bomba turbo molecular. La bomba tiene una capacidad de 90 L/min y mantiene un vacío de menos de 0.05 Torr. La bomba de aspas está conectada a la turbo molecular mediante un tubo de Tygon de 2.1 metro.

#### 4.6.2. Gas de Calibración.

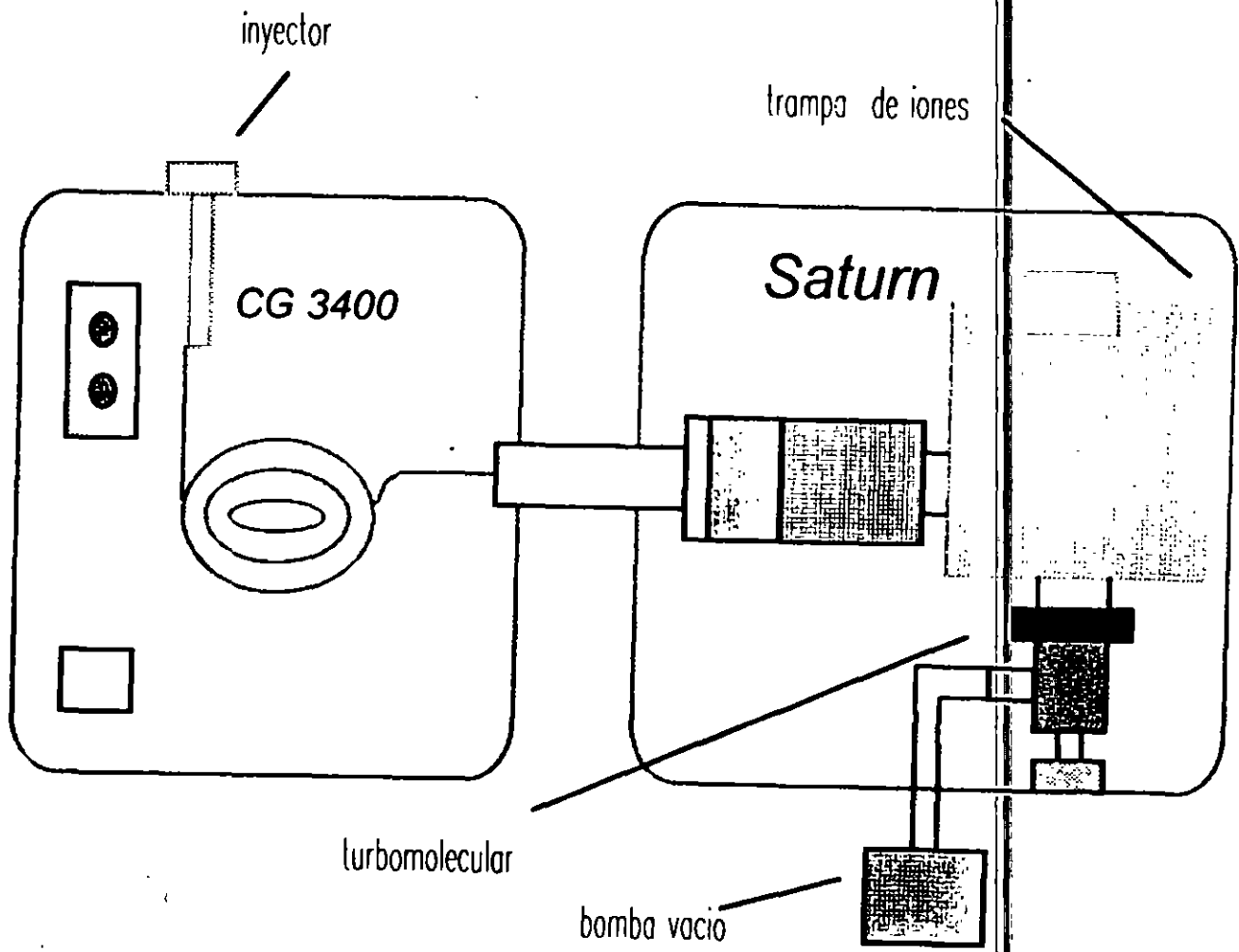
El sistema está calibrado usando Perfluorotributilamina (PFTBA o FC-43) el cual está contenido en un frasco de vidrio y se permite que pase a la trampa iónica encendiendo o apagando una válvula de solenoide (controlado por el software). El flujo de gas de calibración al sistema es controlado por una válvula de alta resolución.

~~La Diap=4-30 es un esquema neumático de la plomería de gas de calibración.~~ Observe que hay un solenoide de tres direcciones que sirve para mantener una evacuación constante del gas de calibración en la plomería. Esto evita que una gran cantidad de este gas entre al analizador cuando la válvula de solenoide sea encendida, también que cualquier vapor de agua o aire pueda acumularse en la plomería cuando no esté en uso. Si la presión de gas de calibración es fijada correctamente, el líquido en el frasco debe durar aproximadamente seis meses. La válvula de aguja puede cerrarse cuando no este en uso para prevenir la pérdida del compuesto de calibración. Si esto se hace, la plomería debe ser purgada por algunos minutos para remover aire/agua en las líneas antes de encender la válvula de solenoide.

#### **4.7 Línea de Transferencia.<sup>(6)</sup>**

La línea de transferencia tiene 22 cm de longitud y 4.1 cm de diámetro. Es un tubo de acero inoxidable que directamente se acopla al CG con el espectrómetro de masas (Diap. 4-31). Un extremo de la línea de transferencia es insertado dentro de un orificio del CG y se extiende hacia el horno del CG. El otro extremo es insertado en el ensamble de la Trampa de Iones. El propósito de la línea de transferencia es mantener la columna del CG caliente cuando entra al espectrómetro de masas.

SISTEMA CROMATOGRAFO DE GASES - ESPECTROMETRO DE MASAS

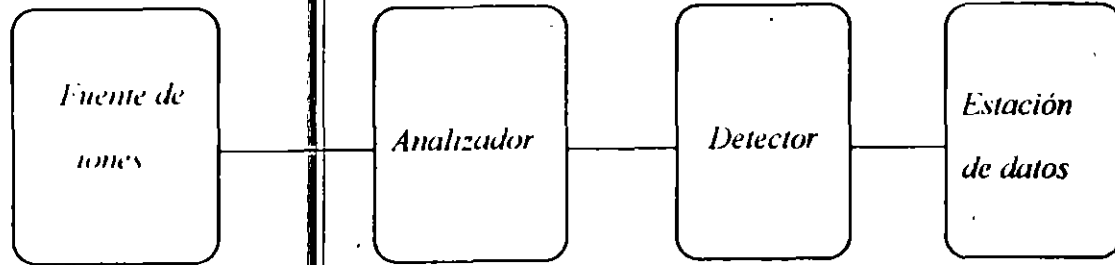


# Principios de CG-EM

## Componentes del SistemaCG-EM

- \* Puerto de entrada (CG)
- \* Interface
- \* Espectrometro de Masas  
Ionizador, Analizador, Detector
- \* Sistema de Datos

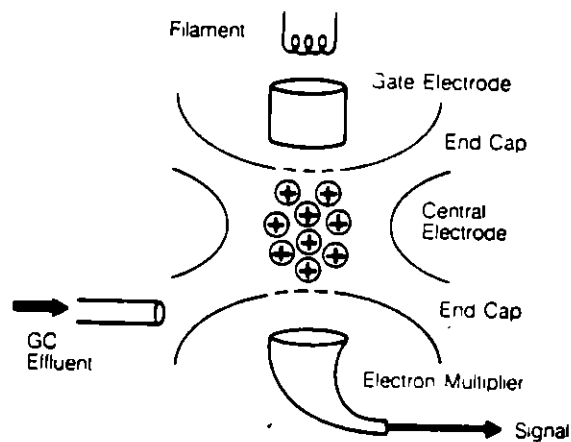
# Espectrometro de Masas



# Trampa iónica

Componentes:

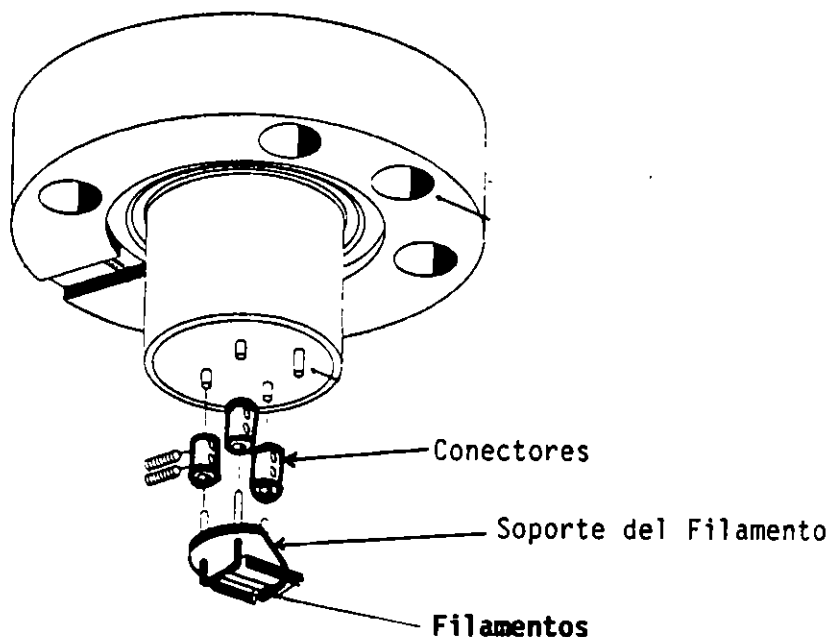
- \* Filamento
- \* Compuerta para electrones
- \* Tres electrodos
- \* Detector (electromultiplicador)





# Corriente de Emisión

La corriente producida por emisión termoiónica de un filamento de renio

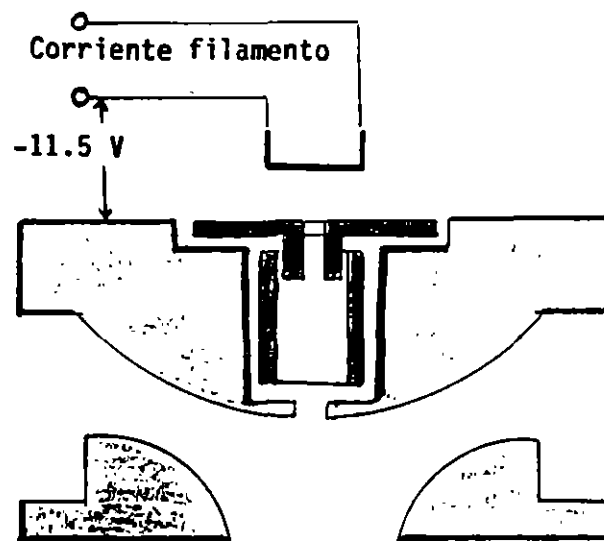


CORRIENTE DE EMISION DE 5-100 uA

# Filamentos

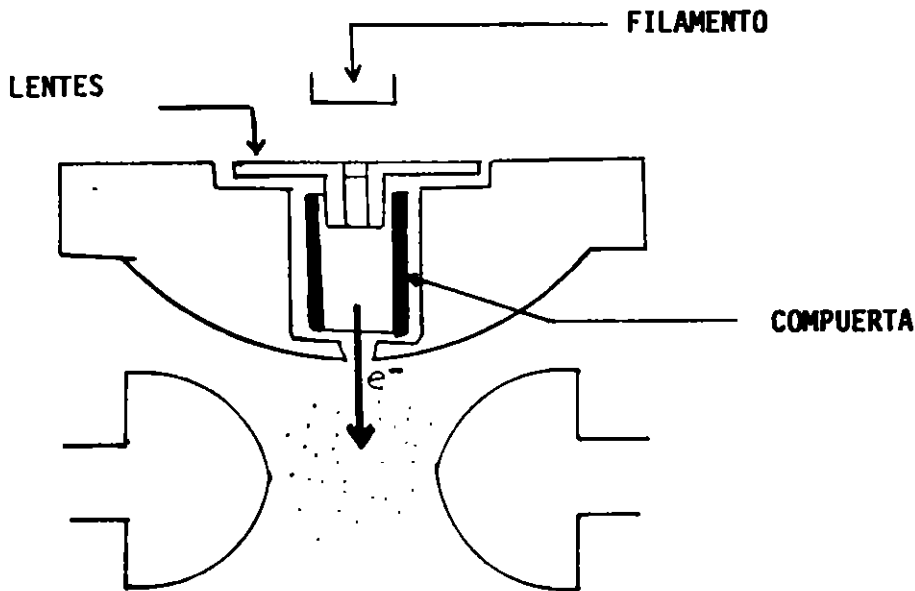
Corriente de emisión

10-100  $\mu\text{A}$



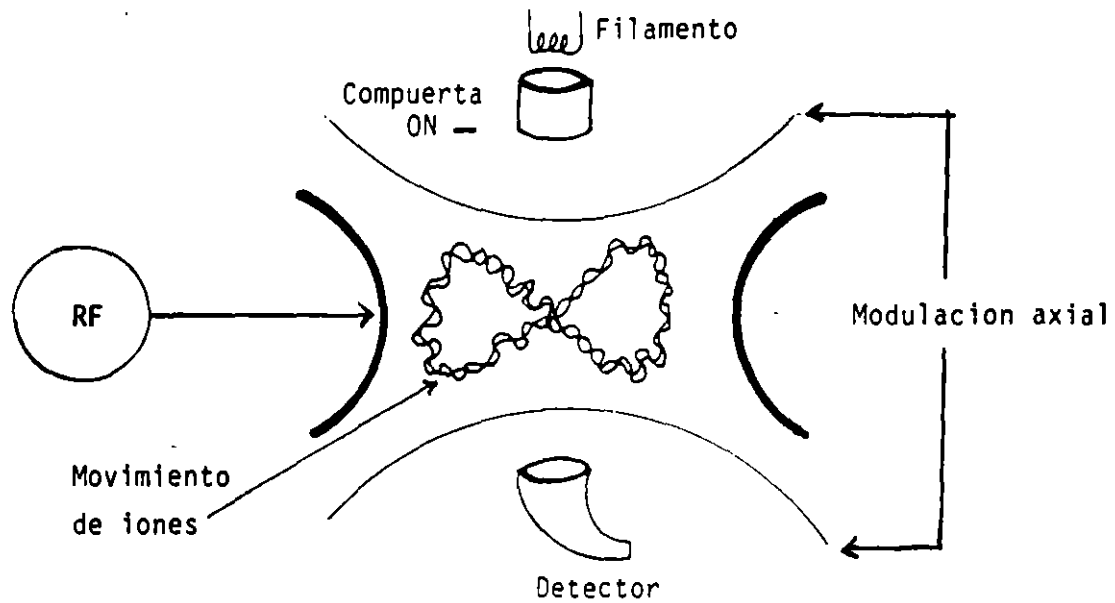
- \* Los electrones son creados por emisión térmica de un filamento de renio
- \* Un segundo filamento sirve como repuesto del primero
- \* El ensamble del filamento es polarizado a -11.5 V, para proporcionar un campo eléctrico que acelera los electrones

# Compuerta para Electrones

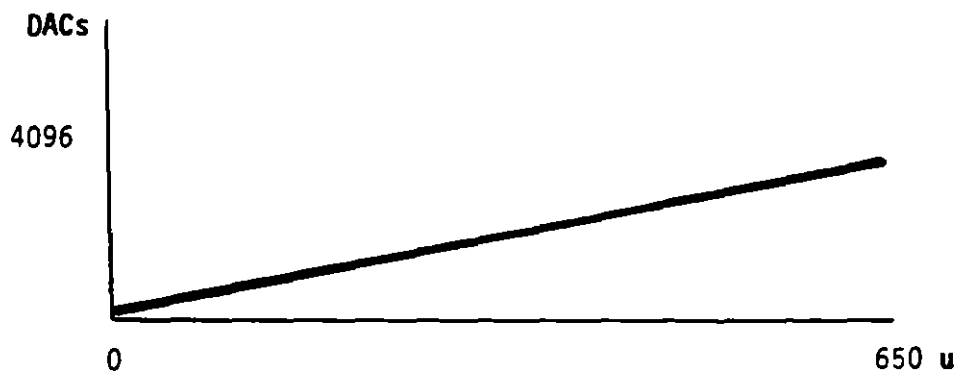


- La compuerta es un electrodo cilíndrico que controla la entrada de los electrones en la cavidad de la trampa
- Apagada ( $=-150V$ ): los  $e^-$  no entran en la trampa
- Encendida ( $+150V$ ): los  $e^-$  son acelerados ( $10\mu\text{seg}$  a  $25\text{ mseg}$ )

# Rampa de Radiofrecuencia



Orbitas de los iones dentro de la trampa



Separación de iones debido a la rampa de RF aplicada en el anillo central de la trampa.

# **RAMPA DE RADIOFRECUENCIA**

El voltaje de RF es aplicado en el anillo central de la trampa.

Durante la ionización el RF es fijado en el **VOLTAJE DE ALMACENAMIENTO**.

Después comienza la rampa de RF rápida para iniciar el análisis de masas.

Durante el análisis de masas, el RFV va de bajo a alto voltaje.

El voltaje en el cual el ión es expulsado de la trampa se define como **VOLTAJE DE RESONANCIA**

Debajo de este voltaje los iones viajan en orbitas estables. Conforme el RFV se incrementa, la amplitud de las oscilaciones también, en la dirección vertical, como resultado los iones son expulsados de la trampa hacia el EM.

# **Trampa de Iones**

## **Principios de Operación**

### **Voltaje de Radiofrecuencia (RF)**

Es el voltaje aplicado al electrodo central  
(0-6750 V a 1.05 MHz)

Durante la ionización de las moléculas de la muestra el RF se fija en un voltaje inicial-

"voltaje de almacenamiento". Este voltaje es apropiado para almacenar o atrapar los iones de interés

Las unidades utilizadas son DAC.

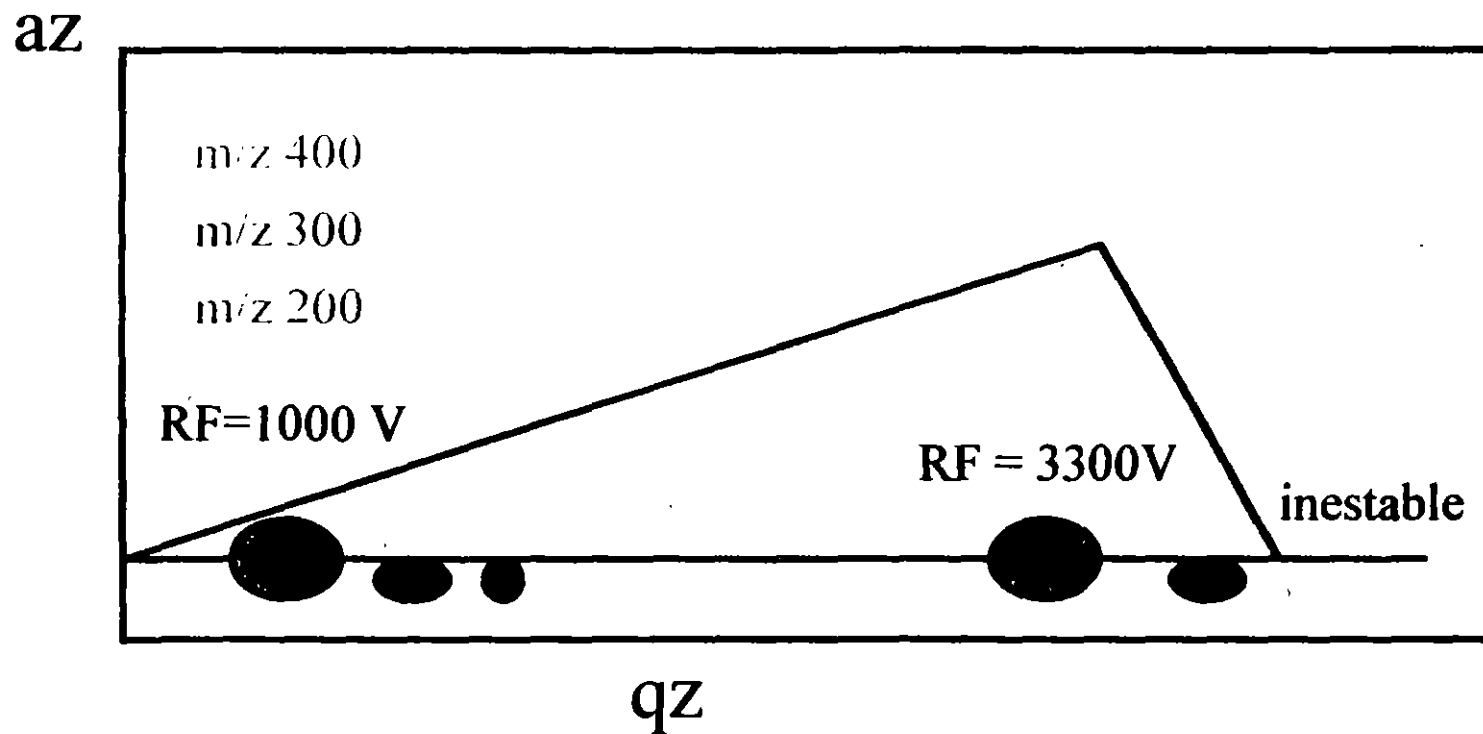
## **Conversión**

6.3 DACs/ amu

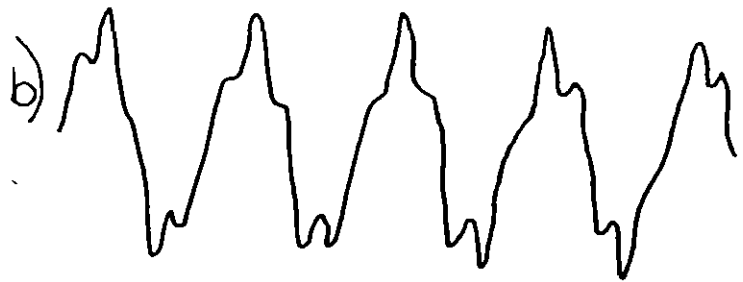
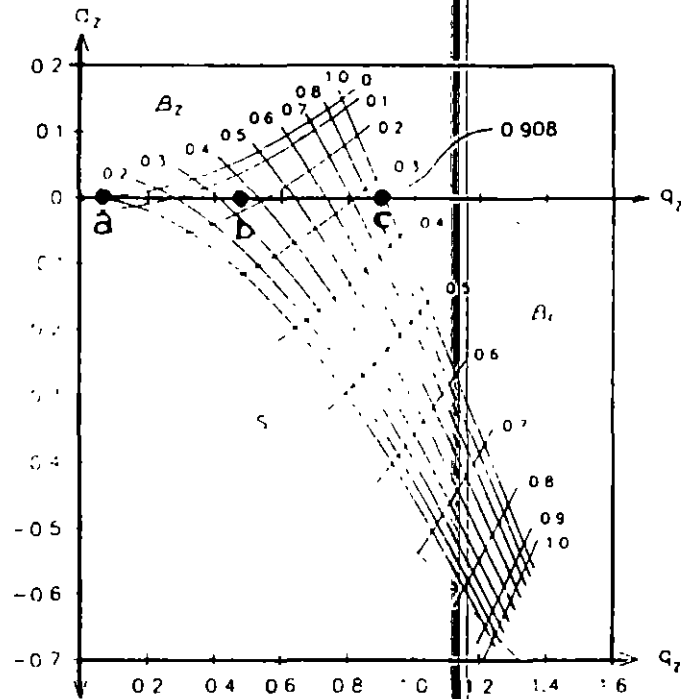
... 125 DACs = 20 amu

(todos los iones con  $m/z > 20$  serán atrapados)

# Posición de los Iones en el Diagrama de Estabilidad al aumentar el Voltaje



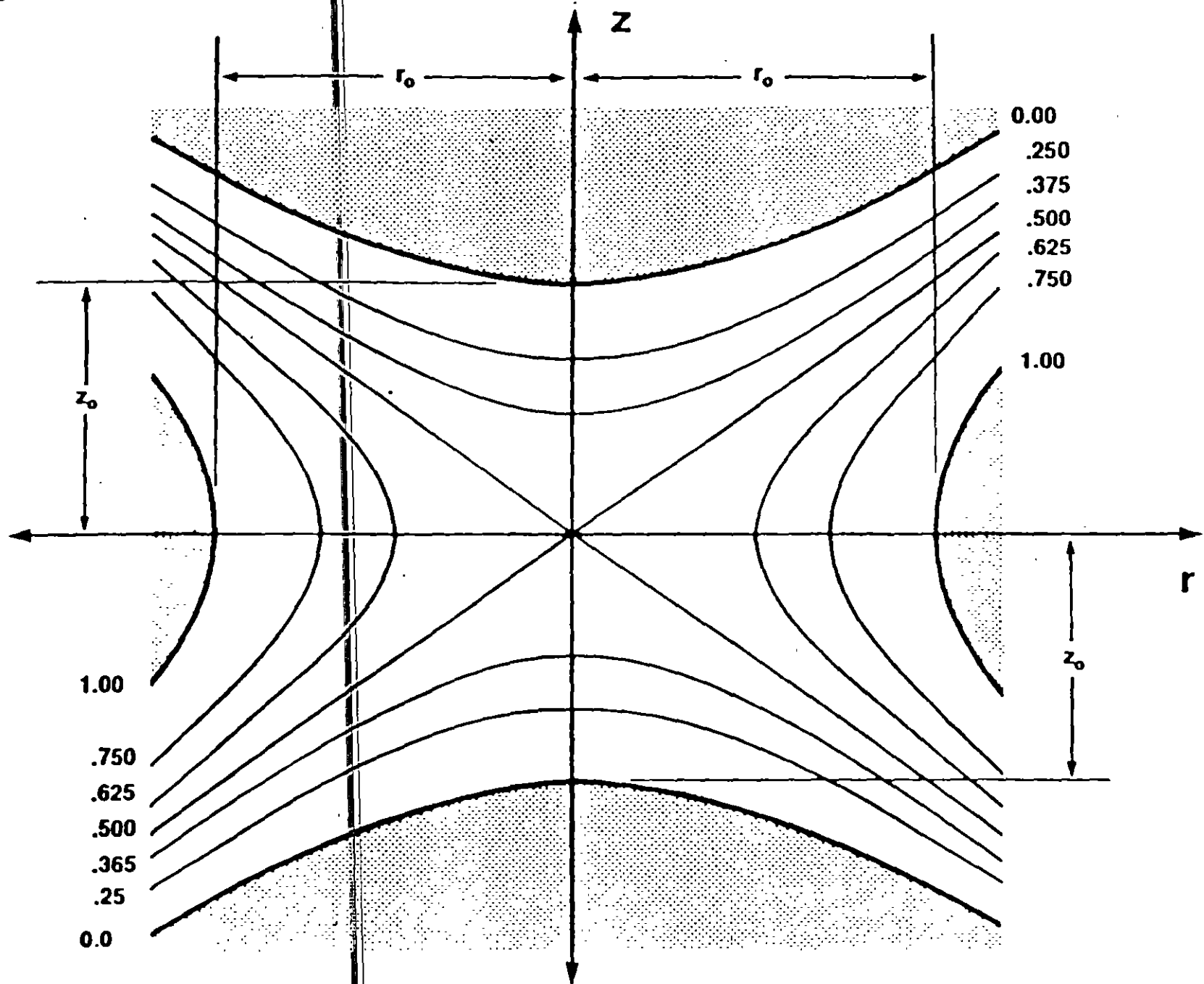
# Movimiento del lón





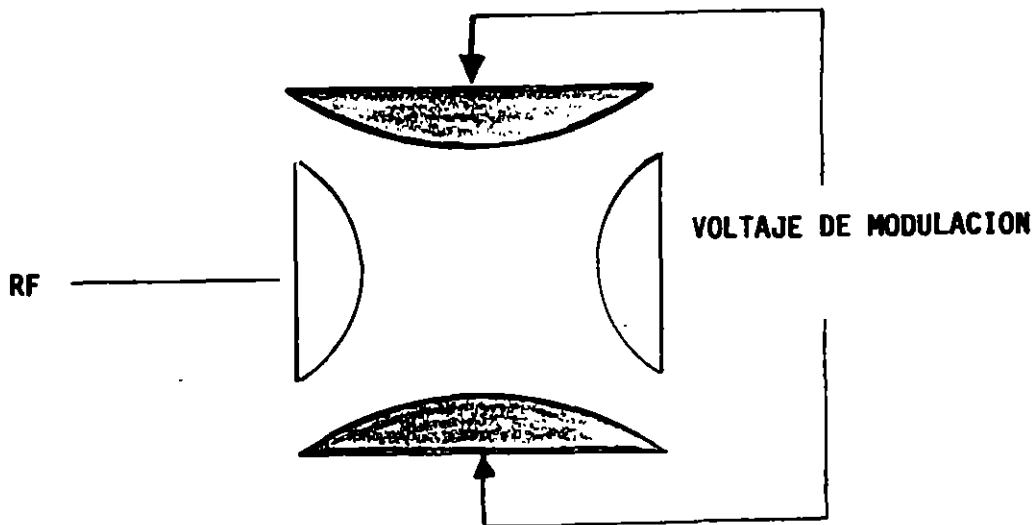


# Equipotential Lines for Three Dimensional Quadrupole Ion Trap



1.7

# Modulación Axial



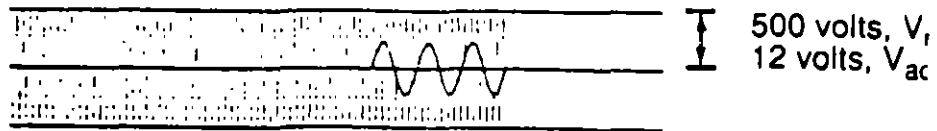
VOLTAJE M/A; 485 KHz (el voltaje M/A puede ser cambiado en Instrument Control)  
Valor prefijado en 4V

La modulación Axial facilita la expulsión de los iones positivos minimizando el efecto de

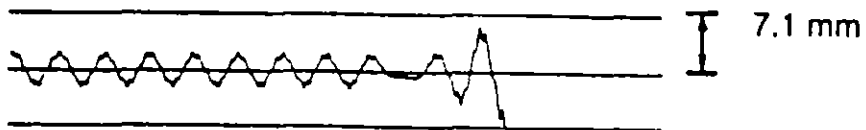
**"carga espacial".**

Mejora significativamente la resolución másica

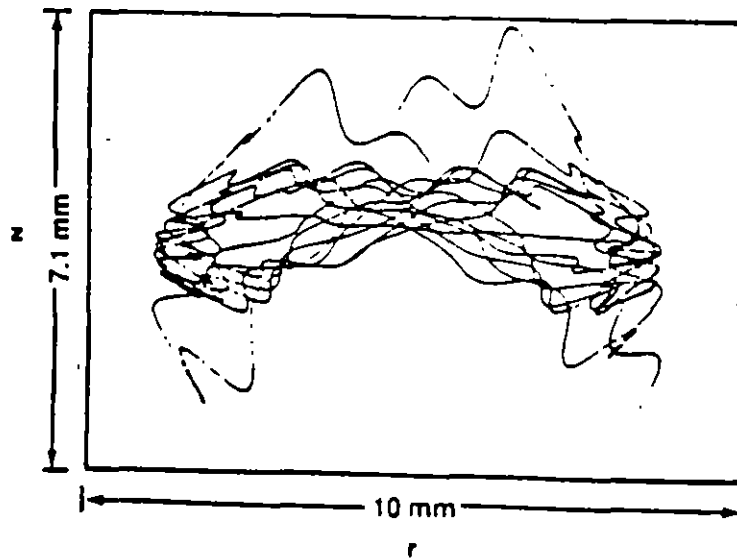
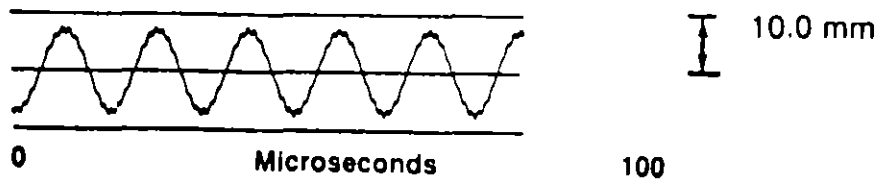
### Amplitude of rf and supplementary ac signals



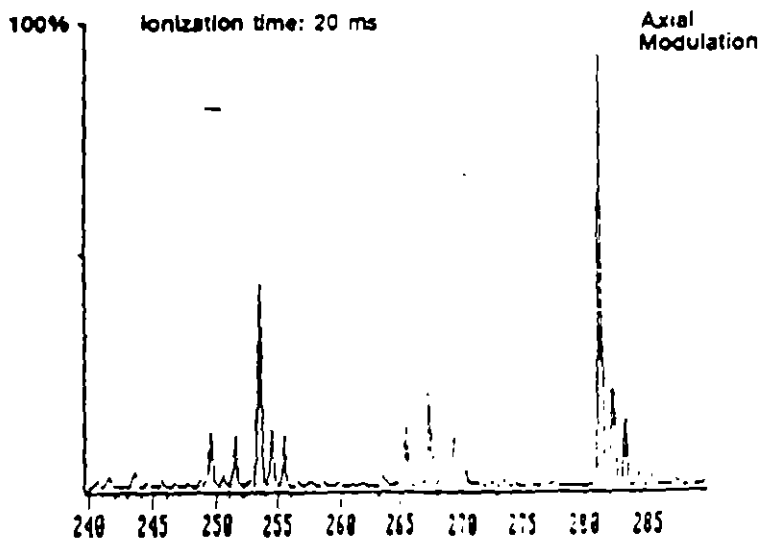
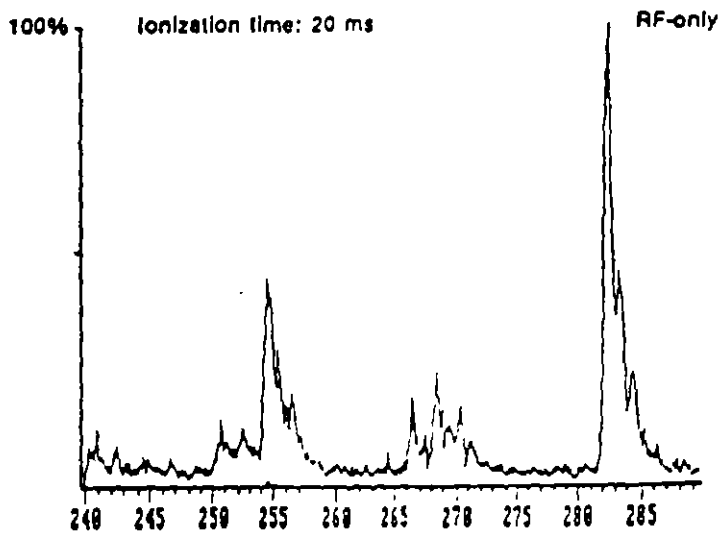
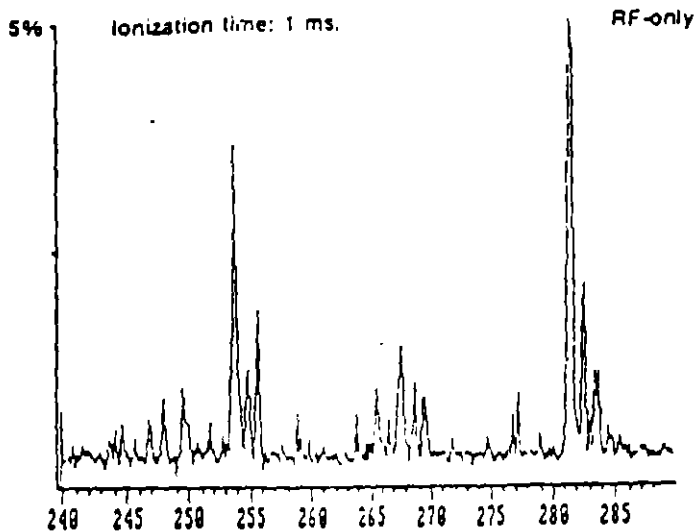
### Ion motion in z direction



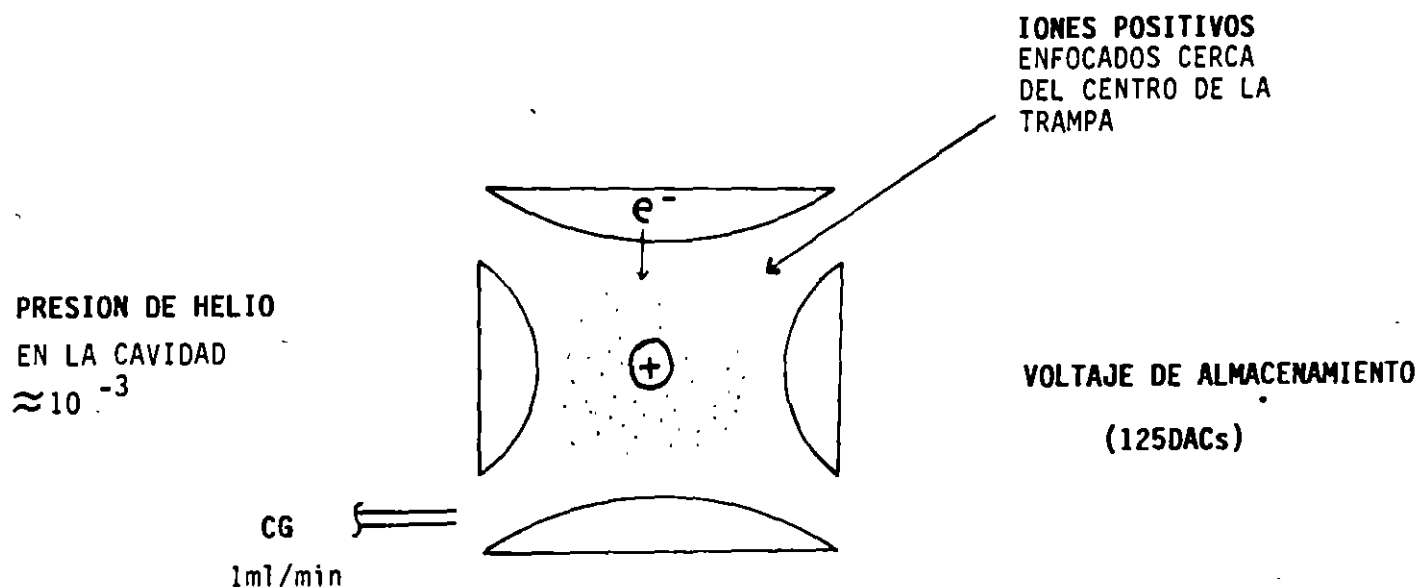
### Ion motion in r direction



# Axial Modulation



# Presión de Helio en la Trampa



EFFECTO AMORTIGUADOR DEL HELIO

~~Flujo de gas de acarreo (0.75-1.5ml/min)~~

Las colisiones con los átomos de He reducen la energía cinética de los iones y de esta manera amortigua la amplitud de sus oscilaciones.

Dando como resultado, que los iones sean enfocados al centro de la trampa.

# Espectro de Masas Resultante de IQ (Ionización Débil)

- \* Bajo grado de fragmentación, menor información estructural.
- \* Usualmente un fuerte ión pseudomolecular ( $M + 1$ ), proporciona información del Peso Molecular.

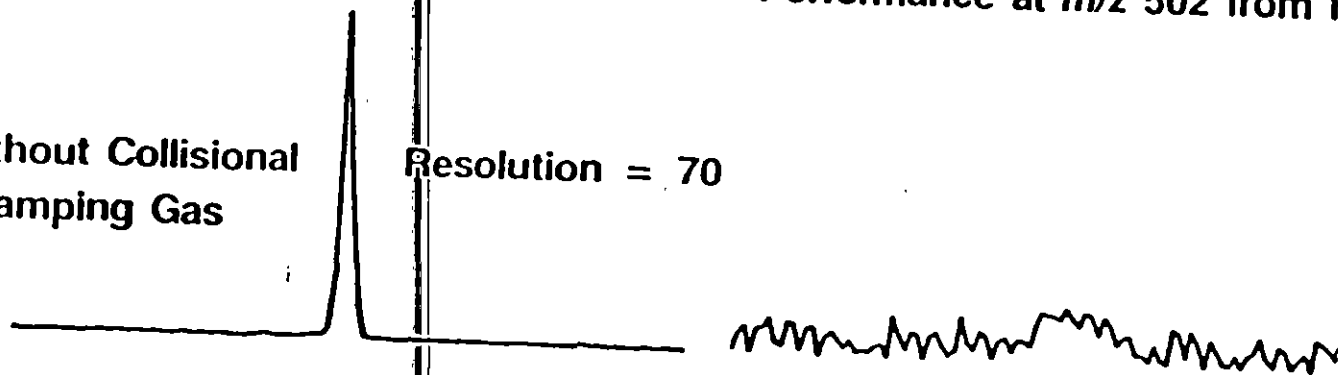
# Ion Trap Peak Shapes and Resolution

Performance at  $m/z$  69 from FC-43

Performance at  $m/z$  502 from FC-43

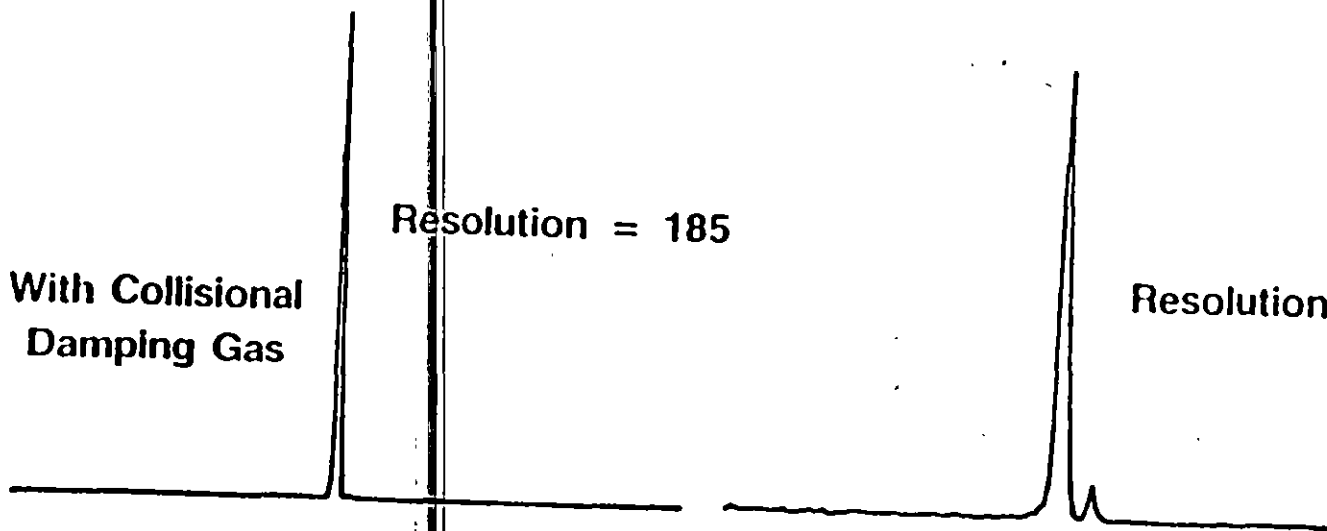
Without Collisional  
Damping Gas

Resolution = 70



With Collisional  
Damping Gas

Resolution = 185

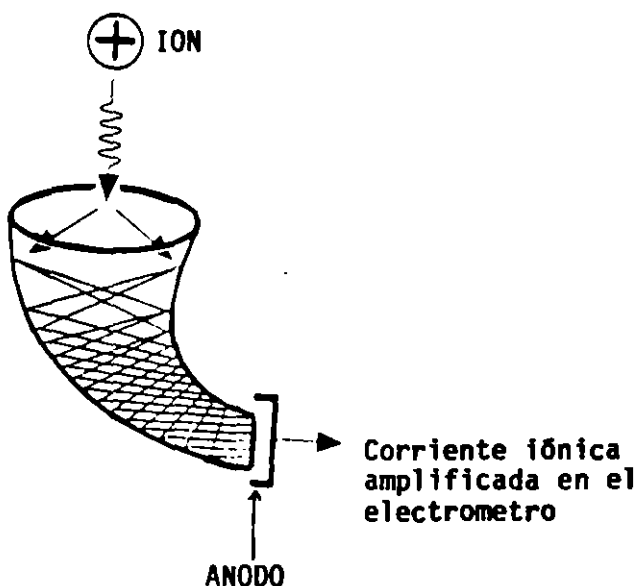


Resolution = 1700





# Detección de Iones (El Electromultiplicador)



El voltage del EM es ajustado para dar una ganancia de  $10^5$ .

Es un dinodo continuo consiste de oxido de plomo, un embudo como resistor (catodo), y una copa (anodo) en la parte terminal.

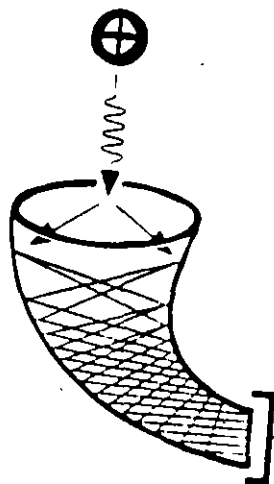
Se aplica un voltage negativo (-800 a -3000)

Los iones positivos son atraidos hacia el catodo.

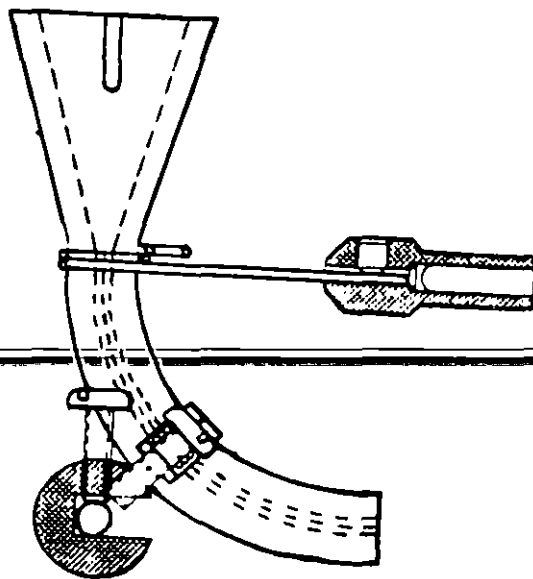
Todos los iones de  $m/z \leq 20$  amu

seran atrapados

# Detección de Iones



multiplicador de iones tipo dinodo continuo



multiplicador de electrones para el Saturn

# FACTORES

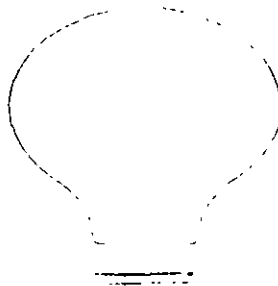
## QUE AFECTAN LA VIDA DEL DETECTOR (EM)



1. OPERAR EL SISTEMA CON ALTA CANTIDAD DE AIRE Y HUMEDAD



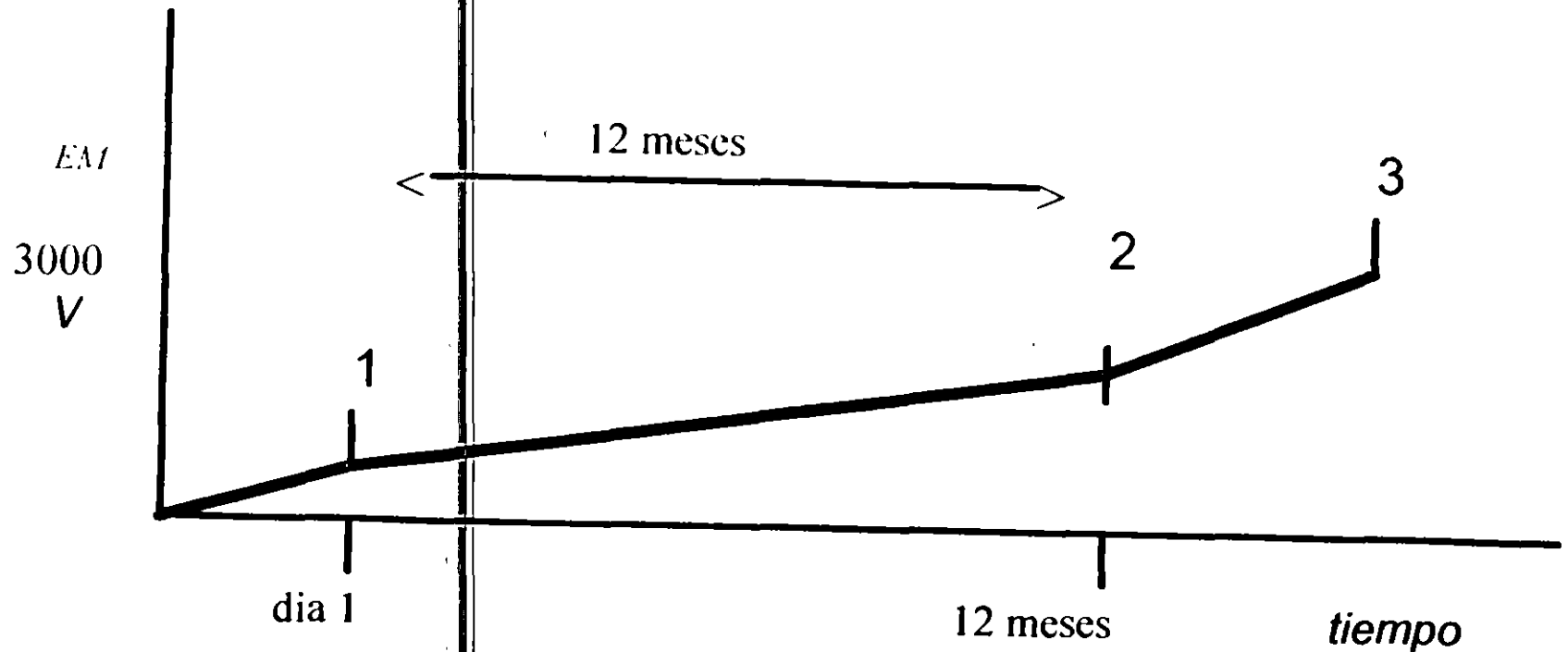
2. DEJAR EL DETECTOR ENCENDIDO DURANTE LA ELUCION DEL SOLVENTE

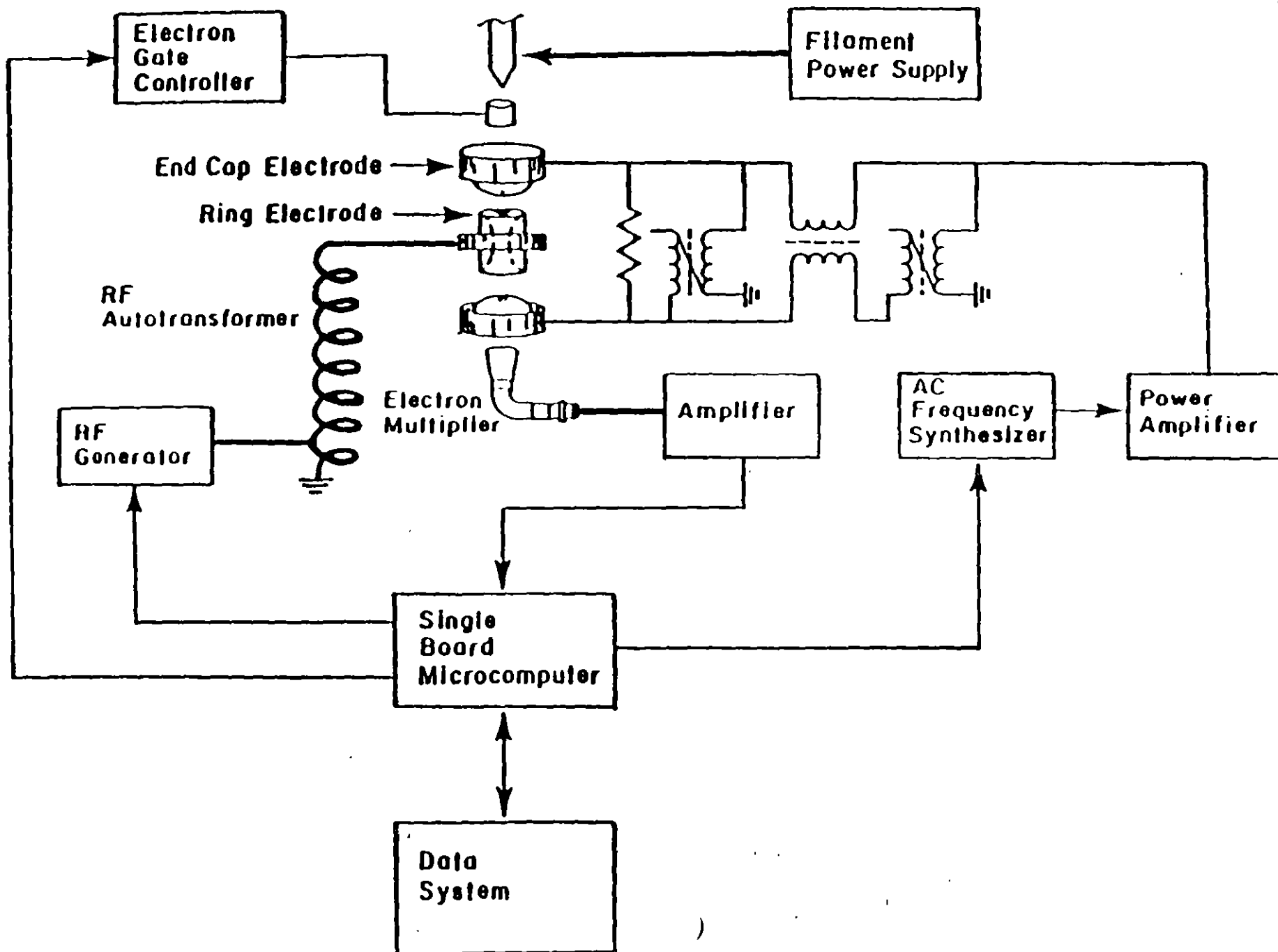


3. OPERAR EL DETECTOR A VOLTAJES ALTOS

# Voltage del Electromultiplicador

- Verificar cada dos semanas con uso frecuente el EM puede envejecer 100V/mes
- Intervalo: -800V -----> -3000V

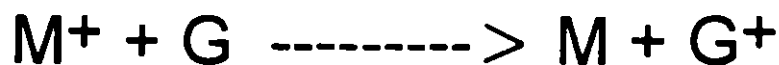






# El Vacío en el Espectrometro de Masas

- Asegura que el filamento no sea quemado
- Ayuda a vaporizar las muestras que son analizadas, disminuyendo la presión de vapor
- Previene que los iones una vez formados se pierdan por colisión con los gases atmosféricos.



Los iones tienen un gran MFP

- Elimina los residuos de la muestra

# Alto vacío proporciona

- \* Ionización unimolecular
- \* Disociación unimolecular
- \* Tener un adecuado "Mean Free Path"

Es la distancia promedio que una partícula gaseosa viajará antes de entrar en colisión con otra

$$\text{MFP (cm)} = \frac{5 \times 10^{-3}}{P(\text{torr})}$$



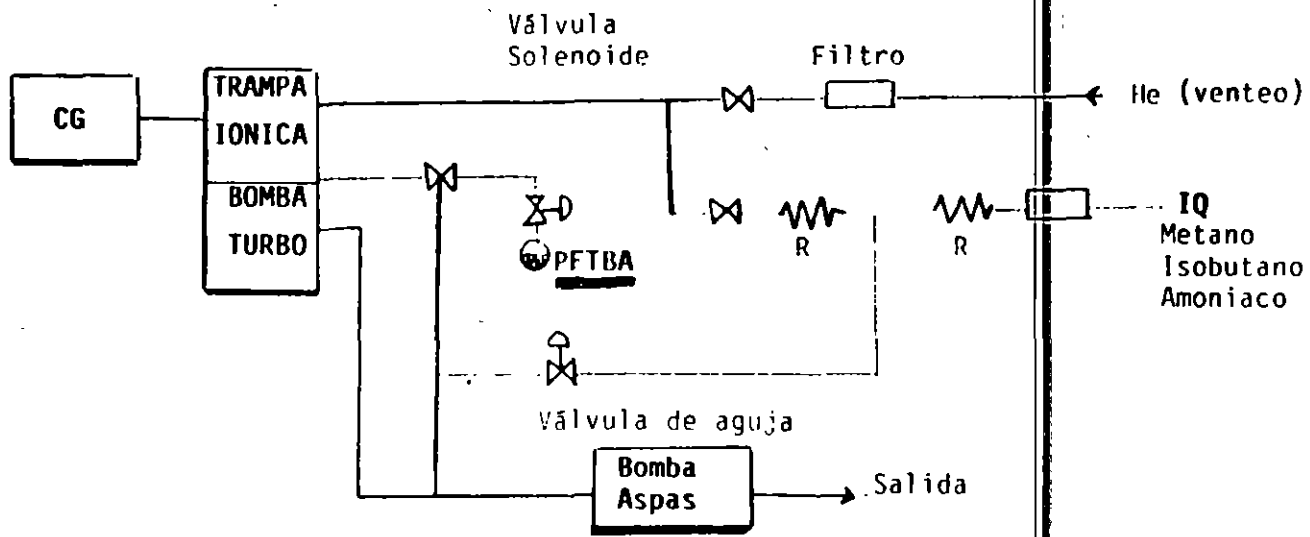
# **Bombas**

## **Bomba Turbomolecular**

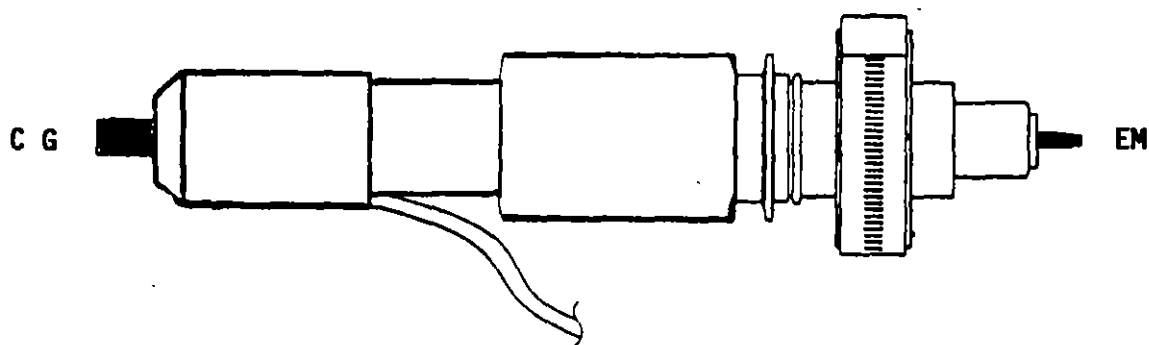
- \* Genera un vacío de aproximadamente  $10^{-5}$  Torr  
 $1 \text{ Torr} = 1/760 \text{ Atm.}$
- \* La bomba es enfriada con aire y protegida termoestáticamente
- \* La bomba trabaja entre 60-65 litros/seg

## **Bomba de aspas rotatorias**

- \* Establece el vacío necesario para la operación apropiada de la turbomolecular, tiene una capacidad de 90 litros/min y mantiene un vacío de 0.05 Torr



# Línea de Transferencia



La línea de transferencia mide 22 cm X 2.5cm de diámetro y acopla directamente el CG con el Espectrometro de Masas

**IONIZACION**

**QUIMICA**

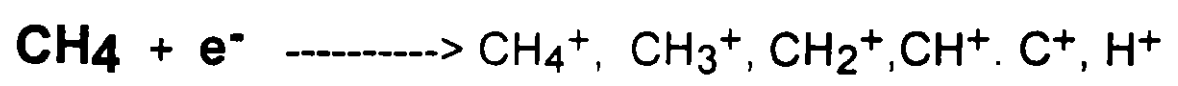
# Por que Ionización Química?

- \* La presencia del ión  $(M+1)^+$  proporciona información del PM
- \* Los patrones de fragmentación de IE y IQ juntos proporcionan una identificación más confiable.
- \* IQ es usada cuando dos compuestos diferentes dan espectros IE idénticos.

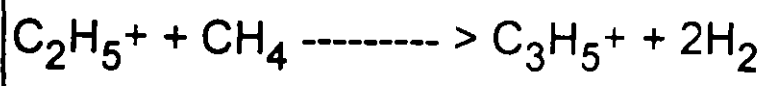
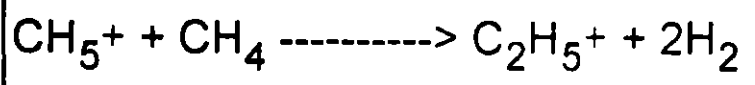
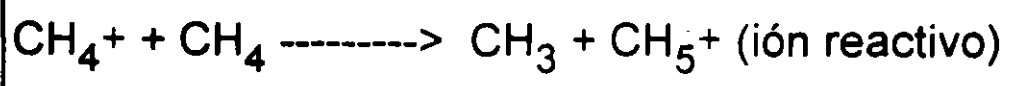
# Ionización Química

Ejemplo: **Metano** como gas de reacción

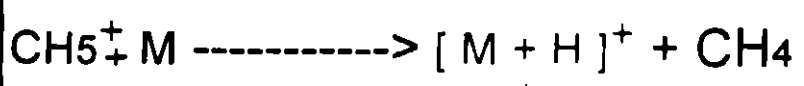
- Formación de iones reactivos en el metano  
Primera etapa por IE



Segunda Etapa/ reacciones ion molécula:



- Formación de ion pseudomolecular por transferencia de protones:



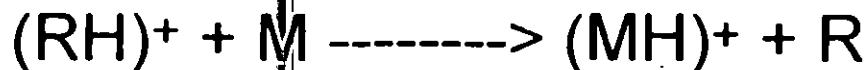
Moléculas heteroatómicas usualmente dan iones[M + 1]

# Reacciones IQ

A) Transferencia de carga



B) Transferencia de protones



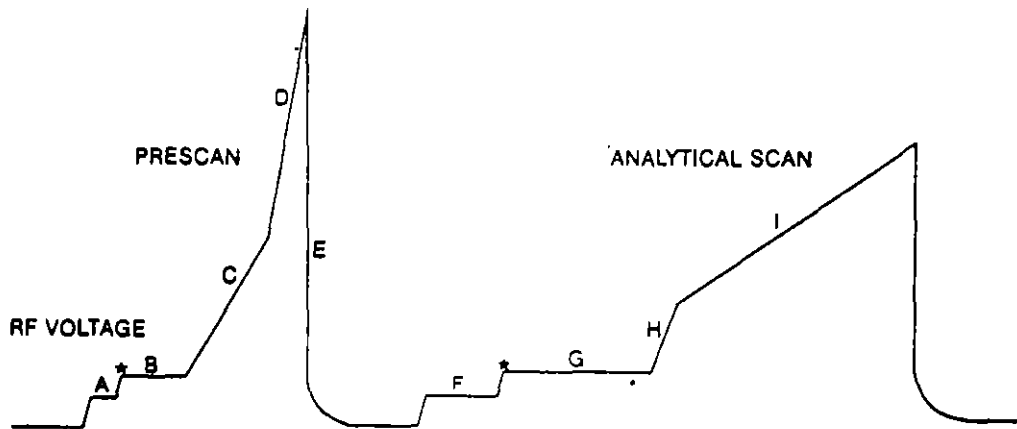
C) Remoción en hidruros



D) Asociación



# Función de Barrido en IQ



- A:** Ionización del gas de reacción
- B:** Reacción del gas de reacción con moléculas de la muestra
- C:** Eliminación de iones de  $m/z$  menor a la masa de fondo
- D:** "Prescan" de los iones  $m/z$  mayor a la masa de fondo
- E:** Medición de la señal ("prescan")
- F:** Ionización del gas de reacción (determinada por el "prescan")
- G:** Período de reacción de los iones del gas con moléculas de la muestra para formar iones.
- H:** Eliminación de moléculas del gas de reacción.
- I:** Adquisición del espectro de masas IQ

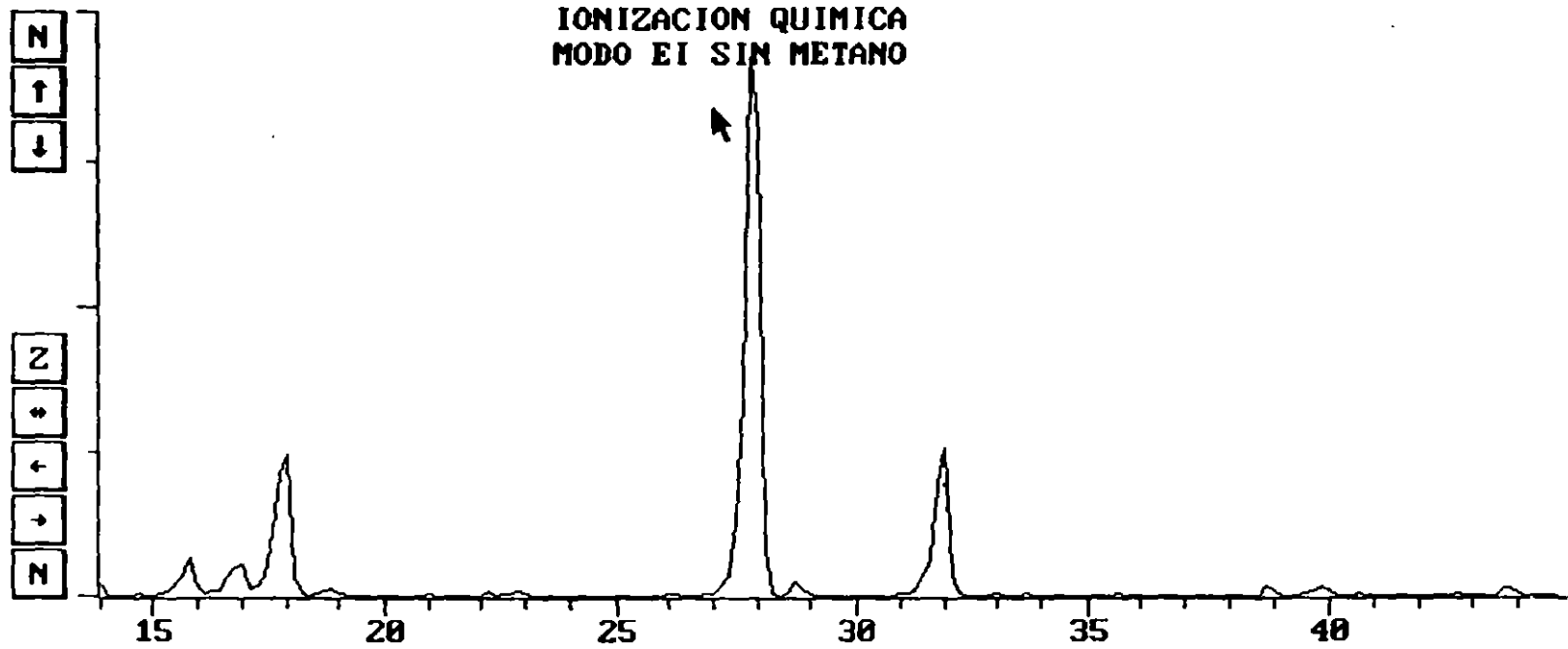


# **Espectro de Masas Resultante de IQ (Ionización Débil)**

- \* Bajo grado de fragmentación, menor información estructural.
- \* Usualmente un fuerte ión pseudomolecular ( $M + 1$ ), proporciona información del Peso Molecular.

File Control Adjustments Setup Status Ranges Exit

100% = ^187 File: C:\SATURN\M.HODS\CITUNE TIC 887 Ioniz. 305 usec EI



OK **Check Air/Water** OK

28 width 0.6 AMU  
19/18 ratio 6 %

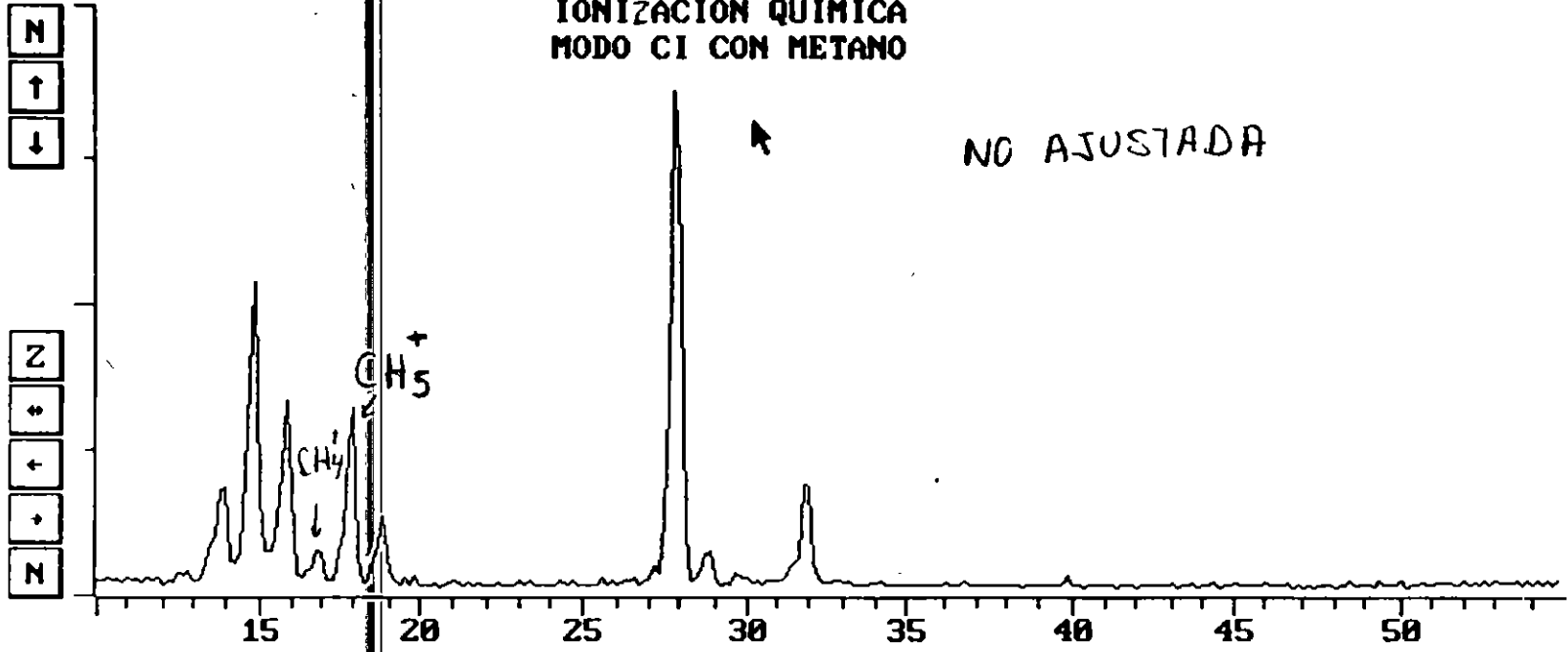
Low Air High  
Low Water High

OK

100% = 27 File: C:\SATURN\M.HODS\CITUNE TIC 351 Ioniz. 100 usec CI

IONIZACION QUIMICA  
MODO CI CON METANO

NO AJUSTADA



SELECT CI GAS

ADJUST CI GAS

SCAN RANGE

Lo mass Hi mass

10

55

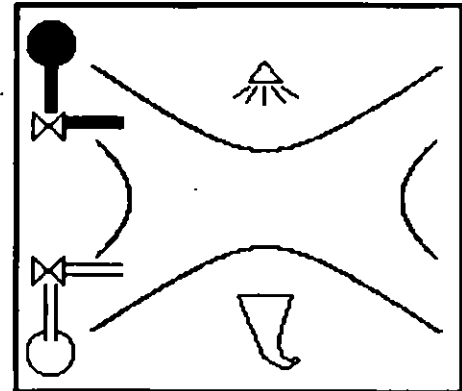
Mult

Fil

RF

CI

Cal



MULT  
2000

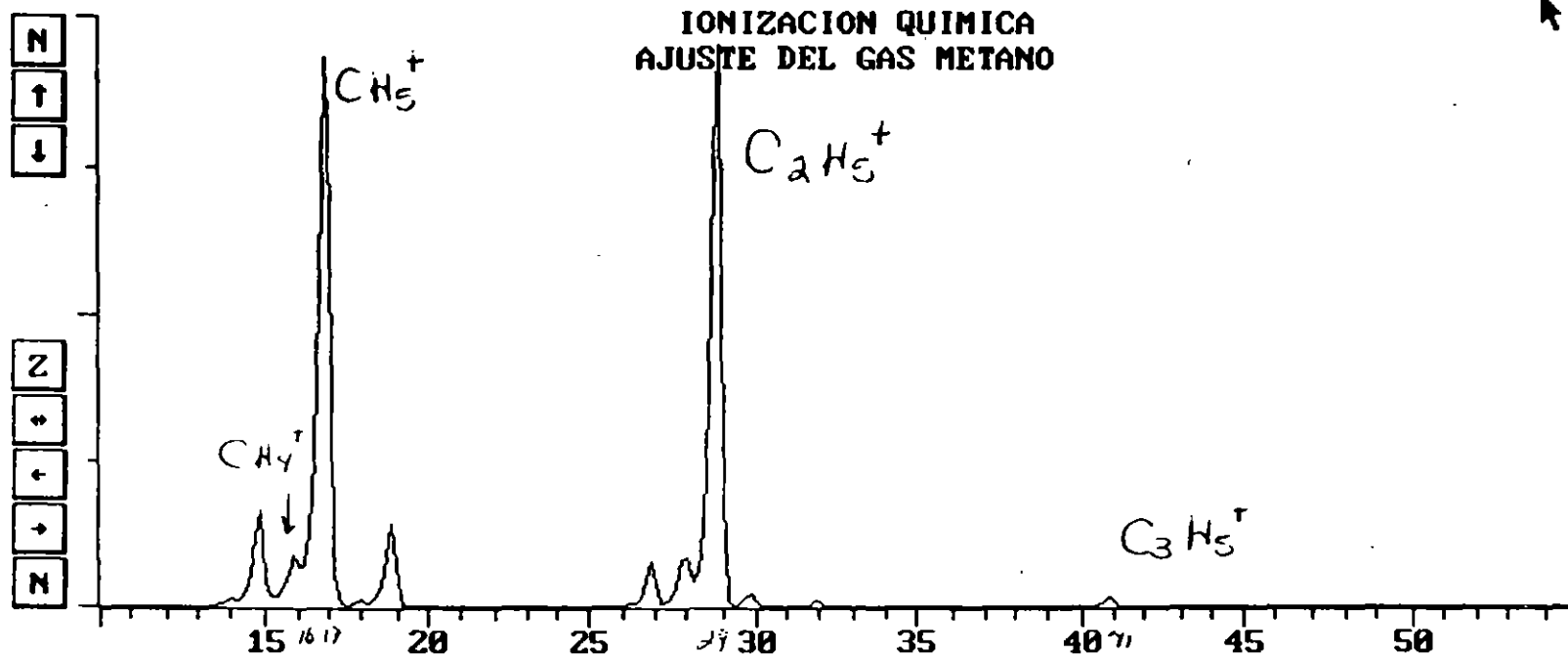
ION TIME  
100

ARC

ASUSTE APROPIADO

File Control Adjustments Setup Status Ranges Exit

100% = 988 File: C:\SATURNM.HODS\CITUNE TIC 7024 Ioniz. 100 usec CI



SELECT CI GAS

ADJUST CI GAS

SCAN RANGE

Lo mass Hi mass

10

55

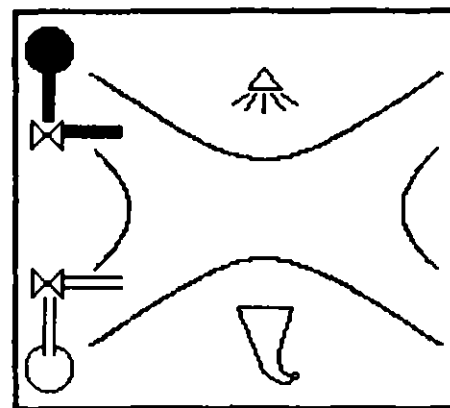
Mult

Fil

RF

CI

Cal



MULT  
2200

ION TIME  
100

ARC

112

# CI/ARC Parameters

IONIZACION QUIMICA

Reagent gas: **Methane**

Methane  Isobutane

Ammonia  User **Active Settings**

ARC ionization time (usec): 100 **100**

CI maximum ioniz. time (usec): 1000 **2000**

CI maximum reaction time (msec): 100 **40**

CI ioniz. storage level (m/z): 5.0 **5.0**

Reagent ion eject amplitude (V): 9.0 **9.0**  
(must be 0 for std CI analyses)

CI reaction storage level (m/z): 13.0 **13.0**

CI background mass (m/z): 45 **45**

**OK** **Cancel**

70 75 80 85 90 95

0 +.1 +.5 +1 +5 T  
= -.1 -.5 -1 -5 100  
ARC

↑  
1  
↓  
2  
•  
◀  
-  
↑

10

25

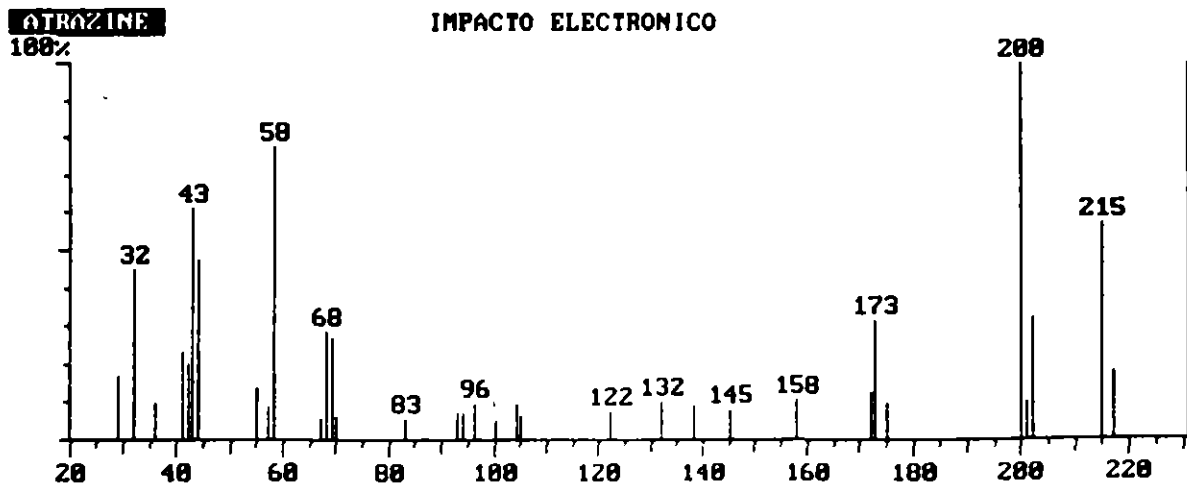
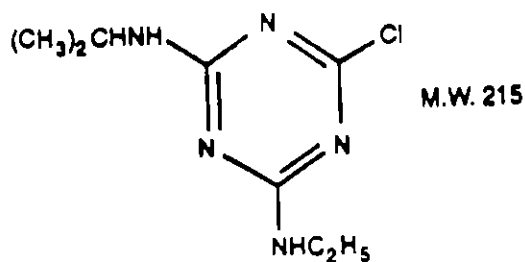
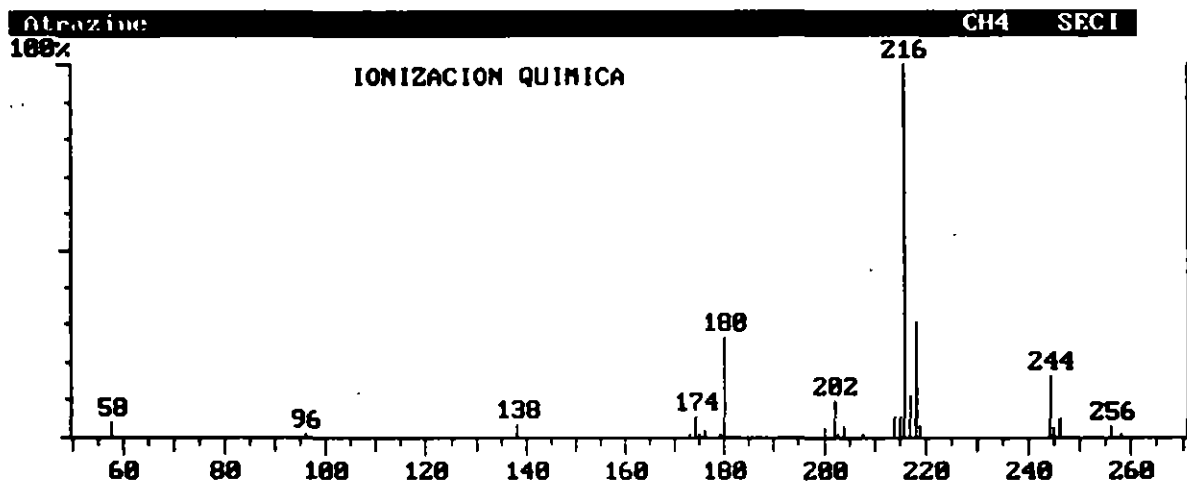
Cal



100

ARC

# Ejemplo de IQ en un Herbicida



# Defecto Másico

Es la diferencia entre la masa nominal de un átomo (o ión) y su masa exacta.

$$D_m = \frac{\text{Masa actual} - \text{Masa integrada}}{\text{Masa integrada}} \times 10^5 \text{ mu}/100\text{u}$$

Por ejemplo:

Hexaclorobenceno ( $\text{C}_6\text{Cl}_6$ )

$$(6 \times 12.0000) + (5 \times 34.9689) + (1 \times 36.9659) = 283.8104$$

Tiene un defecto másico de:

$$(283.8104 - 284) / 284 \times 10^5 = -66.76 \text{ mu}/100\text{u}$$

**varian** 

**MS/MS**



---

MS/MS

TECNICA DE MS/MS

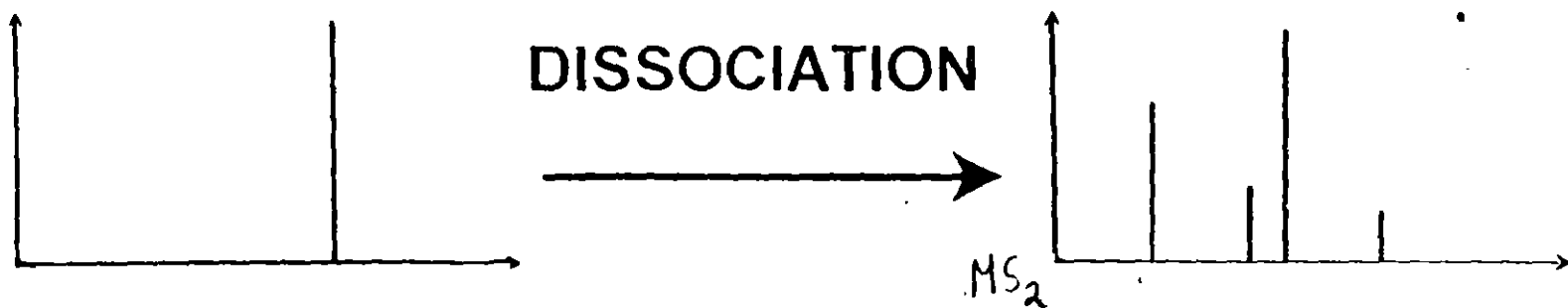
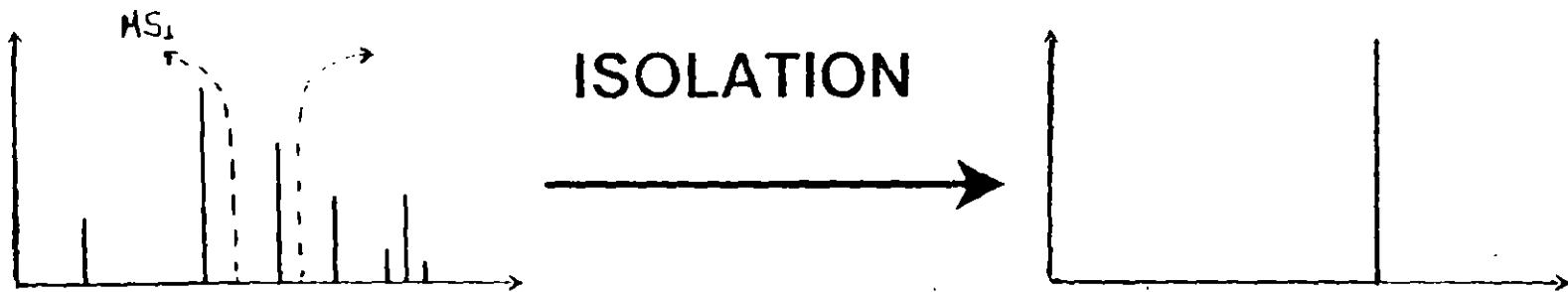
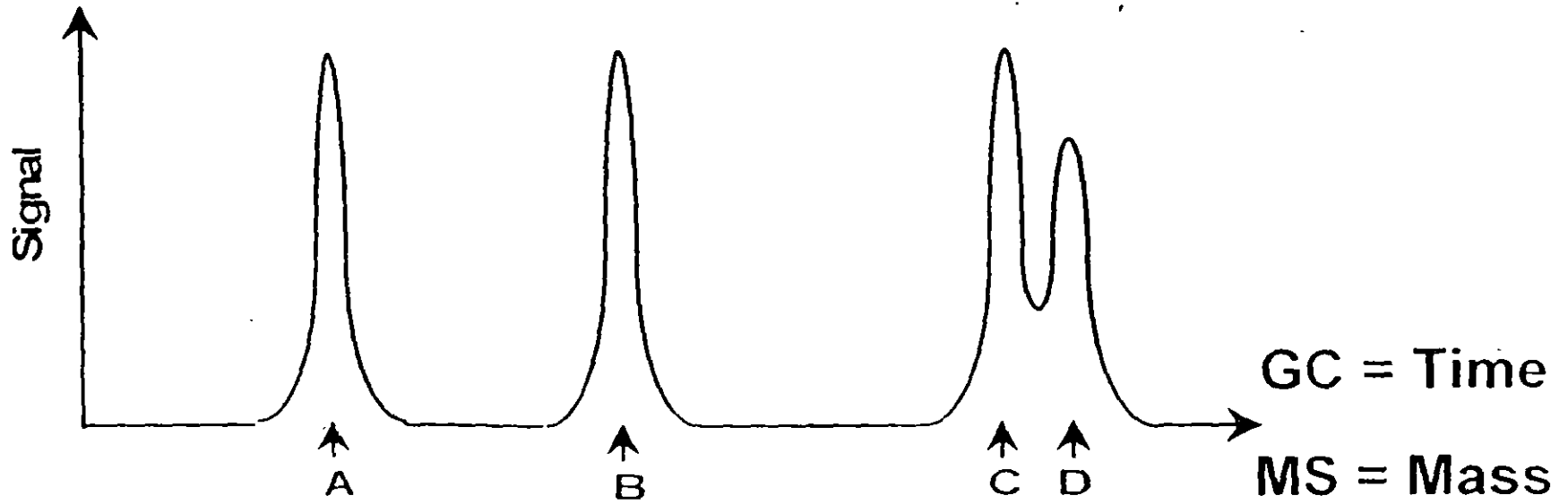
Es utilizada para aislar un analíto de compuestos presentes por contaminación de un "cromatograma" MS, proporcionando un espectro característico MS/MS del analíto.

---

# Etapas GC/MS/MS

- 1: Ionización y aislamiento grueso
  - 2: Aislamiento fino debajo del ión "target"
  - 3: Aislamiento fino arriba del ión "target"
  - 4: Disociación inducida por colisión
- 
- 5: Barrido analítico del espectro

# What is MS/MS?



# Ventajas del MS/MS

## Selectividad

Uno solo de los iones ha sido aislado de la matriz de la muestra, todos los compuestos que interfieren son eliminados del espectro

# Ventajas del MS/MS

## Cuantificación

Cuando las interferencias son eliminadas, no hay problemas asociados con el ruido de la línea base o una parcial coelución de otros componentes



# Ventajas del MS/MS

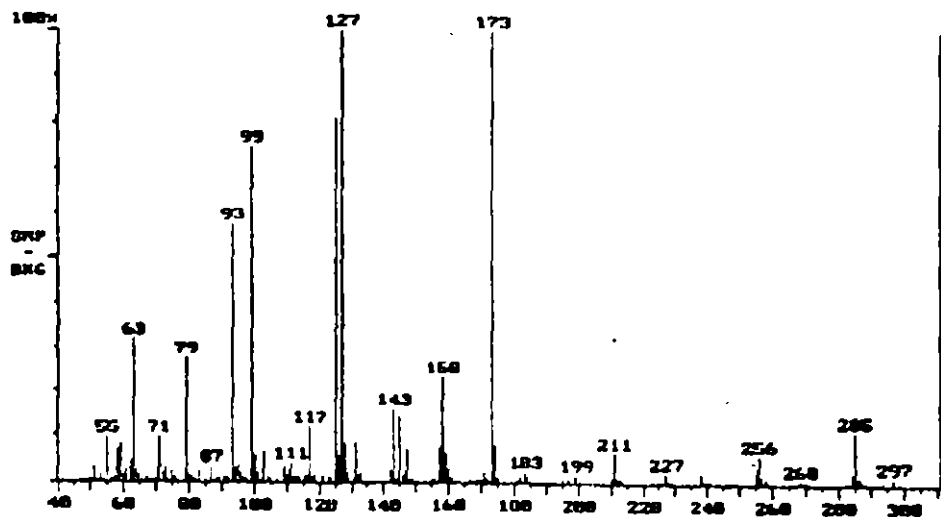
## Mejora la interpretación

El espectro de MS/MS está libre de interferencias de la matriz de la muestra. Esto permite que la comparación del espectro de una referencia y la muestra sea más clara. Hay menor subjetividad del analista.

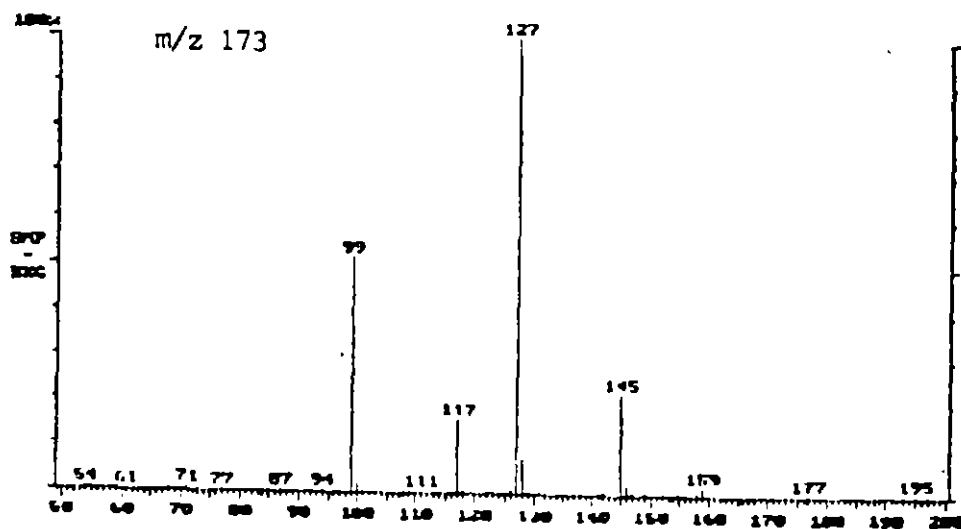
---

**varian** 

# Malatión



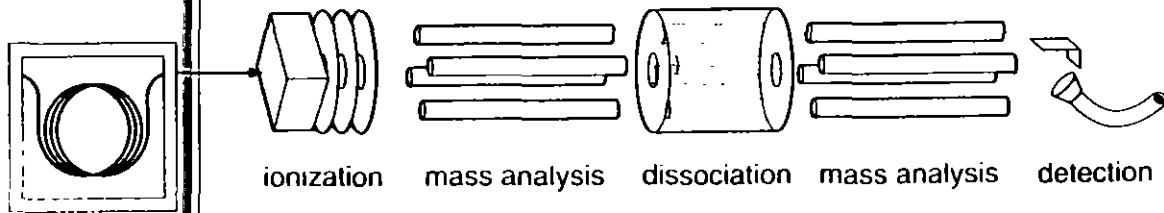
## Espectro M/S



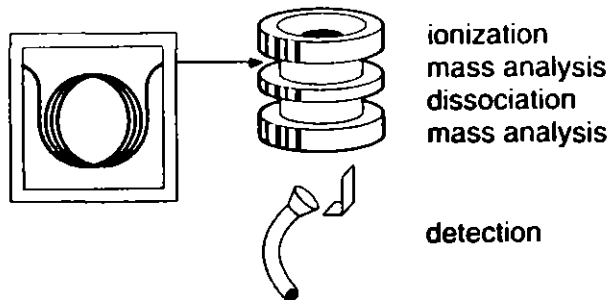
## Espectro MS/MS

# GC / MS / MS

## Tandem-in-Space



## Tandem-in-Time

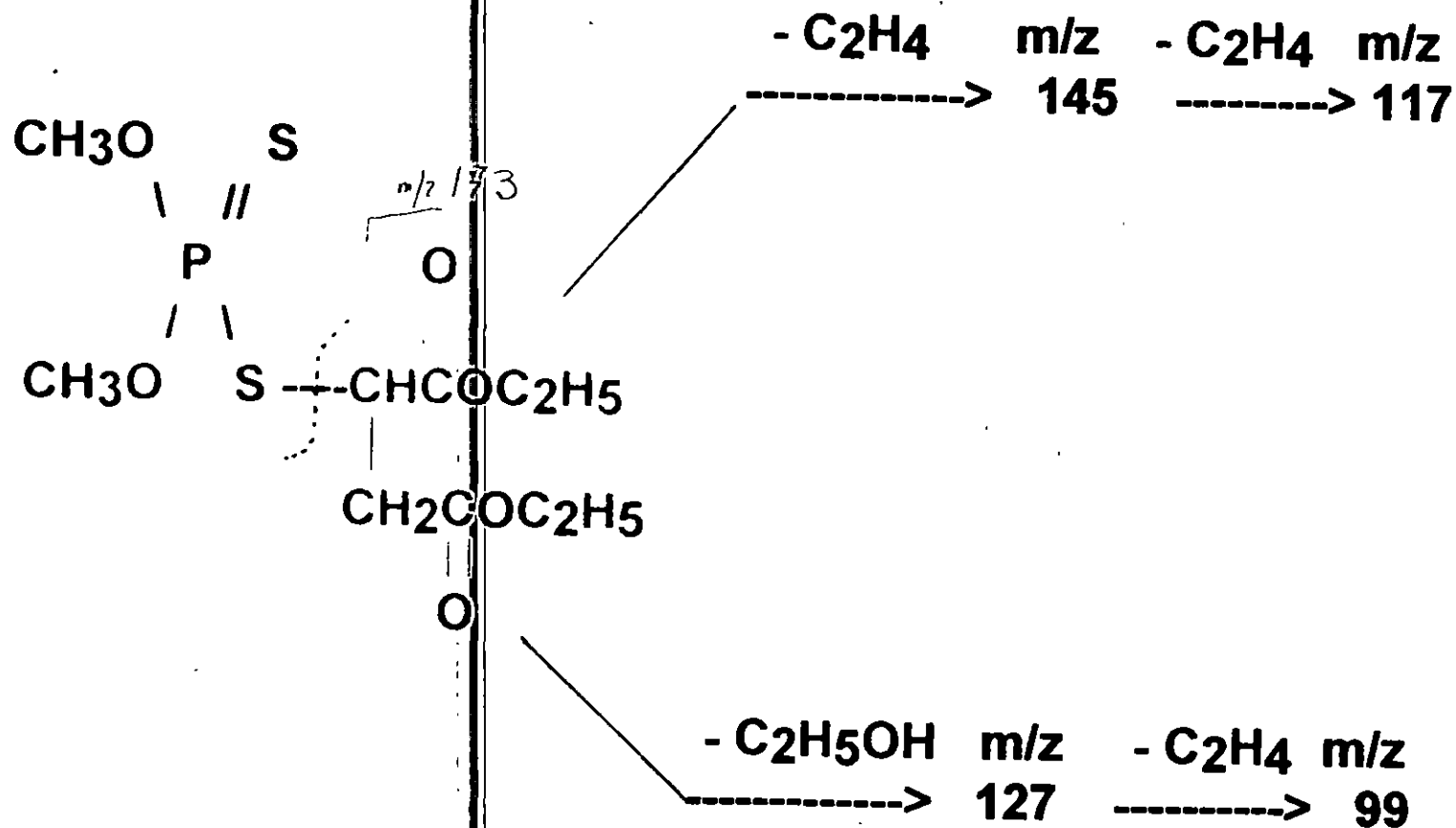




## **Que es el Sistema GC/MS/MS?**

- \*Ionización de una molécula (IE, IQ) y generación de un espectro MS**
- \*Aislamiento de un ión o grupo de iones**
- \*Fragmentación del ión aislado y generación de un espectro MS/MS**

# Fragmentación del Malatión (PM 330)



## BIBLIOGRAFIA

1. Cooks, R.G., Glish, G.L., McLuckey, S.A., Kaiser, R.E. Ion Trap Mass Spectrometry. Chemical & Engineering News, 1991, 69:26-41.
2. Davis, R., Freason, M. Mass Spectrometry Analytical Chemistry by Open Learning. ACOL, Thames Polytechnic, John Wiley & Sons, London, 1990.
3. Feser, K. y Kögler, W. The Quadrupole Mass Filter for GC/MS Applications. J. Chromatographic Science, 1979, 17:57-63.3.
4. Kasek F.W. y Clement, R.E. Basic Gas Chromatography Mass Spectrometry. Elsevier, New York, 1988.
5. March, R.E. y Hughes, R.J. Quadrupole Storage Mass Spectrometry. Wiley -Interscience, USA, 1989.
6. Varian Associates, Inc. Saturn GC/MS. Operator's Manual, USA, 1995.
7. William MacFadden. Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry. John Wiley & Sons. Wiley-Interscience Publication. USA, 1973



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

*Cuauhnáhuac No. 8532  
Col. Progreso, Jiutepec, Mor.  
C.P. 62550  
Tel. 19-40-00 ext. 357  
Fax (9173) 19-42-81*

**PRACTICA 1  
FAMILIARIZACION CON EL EQUIPO**

<i>Medición de Flujos</i>	
<i>Flujo de Venteo</i>	
<i>Flujo con/sin división</i>	
<i>Nombre del Método de análisis</i>	
<i>Temperaturas</i>	
<i>Temperatura inicial</i>	
<i>Temperatura final</i>	
<i>Temperatura del detector</i>	
<i>Temperatura del inyector</i>	
<i>Incrementos de temperatura</i>	

**OBSERVACIONES**

**INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA  
COORDINACION DE TECNOLOGIA DE TRATAMIENTO  
Y CALIDAD DEL AGUA  
SUBCOORDINACION DE CALIDAD DEL AGUA**

**DOCUMENTACION QUE SE FORMULA PARA HACER CONSTAR LA ENTREGA  
RECEPCION DE LA SUBCOORDINACION DE CALIDAD DEL AGUA, DEPENDIENTE  
DE LA COORDINACION DE TECNOLOGIA DE TRATAMIENTO Y CALIDAD DEL  
AGUA, DEL INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA, QUE HACE LA  
DRA. ANNE M. HANSEN AL A  
PARTIR DEL**

**A N E X O 3**

**MOBILIARIO.- Se anexa relación de Activo Fijo de la Subcoordinación de Calidad del Agua conteniendo: No. de inventario, resguardante, descripción e importe, existiendo los resguardos correspondientes. Contratos/Convenios , Grupos documentales e informes. Bienes resguardados por personal de la Subcoordinación de Calidad del Agua.**

**ENTREGA**

**RECIBE**

**DRA. ANNE M. HANSEN HANSEN**



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

*Cuauhnáhuac No. 8532  
Col. Progreso, Jiutepec, Mor.  
C.P. 62550  
Tel. 19-40-00 ext. 357  
Fax (9173) 19-42-81*

**PRACTICA 2  
ELABORACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO A PARTIR DE SOLUCIONES STOCK**

<i>Analito</i>	<i>Conc. Stock</i>	<i>Volumen tomado</i>	<i>Aforo</i>	<i>Disol vente</i>	<i>C. Soln. trabajo</i>	<i>Respuesta</i>	<i>T.R.</i>

**OBSERVACIONES**

**INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA  
COORDINACION DE TECNOLOGIA DE TRATAMIENTO  
Y CALIDAD DEL AGUA  
SUBCOORDINACION DE CALIDAD DEL AGUA**

**DOCUMENTACION QUE SE FORMULA PARA HACER CONSTAR LA ENTREGA  
RECEPCION DE LA SUBCOORDINACION DE CALIDAD DEL AGUA, DEPENDIENTE  
DE LA COORDINACION DE TECNOLOGIA DE TRATAMIENTO Y CALIDAD DEL  
AGUA, DEL INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA, QUE HACE LA  
DRA. ANNE M. HANSEN AL A  
PARTIR DEL**

**ANEXO 7**

**EXPEDIENTE.- Se anexa relación de los expedientes y registros de personal de la  
Subcoordinación de Calidad del Agua.**

**ENTREGA**

**RECIBE**

**DRA. ANNE M. HANSEN HANSEN**



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

*Cuauhnáhuac No. 8532  
Col. Progreso, Jiutepec, Mor.  
C.P. 62550  
Tel. 19-40-00 ext. 357  
Fax (9173) 19-42-81*

**PRACTICA 3  
REALIZACION DE MEZCLAS DE ESTANDARES**

<i>Analito</i>	<i>C. Soln. Trabajo</i>	<i>Respues ta</i>	<i>T.R.</i>	<i>Factor Normalizacion</i>	<i>C. en la mezcla</i>	<i>Disolvente</i>

**OBSERVACIONES**



8.23	-100	-100	25.8297
8.58	-100	-100	39.8216
8.88	-100	-100	58.43786
9.65	-100	-100	86.32733
8.53	-100	-100	-100.00
8.69	-100	-100	-100.00

Temperatura: 25 C (+/- 1C)



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

*Cuauhnáhuac No. 8532  
Col. Progreso, Jiutepec, Mor.  
C.P. 62550  
Tel. 19-40-00 ext. 357  
Fax (9173) 19-42-81*

**PRACTICA 4  
ELABORACION DE CURVAS DE CALIBRACION**

<i>Analito</i>	<i>C. Mezcla Stock</i>	<i>Volumen usado</i>	<i>Aforo</i>	<i>Dilución 1</i>	<i>Volumen usado</i>	<i>Aforo</i>	<i>Dilución 2</i>

<i>Analito</i>	<i>C. Mezcla Stock</i>	<i>Volumen usado</i>	<i>Aforo</i>	<i>Dilución 3</i>	<i>Volumen usado</i>	<i>Aforo</i>	<i>Dilución 4</i>

**OBSERVACIONES**



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

Cuauhnahuac No. 8532  
Col. Progreso, Jiutepec, Mor.  
C.P. 62550  
Tel. 19-40-00 ext. 357  
Fax (9173) 19-42-81

**PRACTICA 5  
EXTRACCION Y ANALISIS DE MUESTRA PROBLEMA**

<i>N. de Control</i>	<i>Volumen de Muestra.</i>	<i>Volumen Final</i>	<i>Archivo</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Factor dilución(Conc)</i>	<i>Resultado</i>

**OBSERVACIONES**

## **1. INTRODUCCION**

La Presa Silva recibe descargas tanto municipales como agrícolas y de centenas de industrias de diversos giros, principalmente peleteras, desde hace varias décadas. Esto, aunado con la sedimentación de las partículas suspendidas en el vaso, ha provocado un fondo anóxico y altamente contaminado. La Comisión Nacional del Agua (CNA) ha decidido desviar las descargas de los municipios río arriba, por lo que la presa en la actualidad recibe, sólo agua pluvial y proveniente de los escurrimientos.

El Gobierno del Estado de Guanajuato está evaluando el riesgo asociado con la remoción de un espesor de 0.5m de los sedimentos de la presa y ha solicitado al IMTA participar con las evaluaciones técnicas y las recomendaciones necesarias para decidir sobre el destino final de estos sólidos.

## **2. ANTECEDENTES**

La muerte masiva de aves migratorias se presenta con relativa frecuencia a nivel mundial. Tan sólo en Norteamérica existen más de 10 casos reportados en los últimos 5 años, involucrando más de 175,000 aves afectadas (CNA, 1995). En algunos casos, las causas de la mortandad siguen siendo desconocidas.

Cada año durante el otoño, miles de aves migratorias provenientes de Siberia, Canadá y Estados Unidos migran hacia el sur, permaneciendo temporalmente en los cuerpos de agua mexicanos. En el periodo desde octubre, 1994, hasta febrero, 1995, se presentó la muerte de un gran número de aves, en la presa de Silva, Gto. Este evento fue atribuido, en principio, a la contaminación de las aguas de la citada presa (CNA, 1995).

La Presa de Silva está ubicada en el Estado de Guanajuato, a 22 km al suroeste de la ciudad de León, y 7 km al sur del poblado San Francisco del Rincón. Recibe las aguas de una derivación del Río Turbio a través del Canal de San Roque. Sus principales influentes son una mezcla de agua pluvial y aguas residuales. En época de estiaje, recibe aguas residuales procedentes de León y San Francisco del Rincón, por medio de 2 sistemas de alcantarillado, además de la descarga de 58 industrias que efectúan actividades relacionadas con la curtiduría, tratamiento de pieles, elaboración de grenetina y algunas a la producción de sustancias químicas.

La mayor parte de la región agrícola aguas arriba de la Presa de Silva, se dedica al cultivo de maíz, trigo y sorgo, cubriendo un área de aproximadamente 5,000 Ha (CNA, 1995). Dichos cultivos son irrigados con las aguas de los ríos León y Santiago. En el mes de diciembre, la Presa de Silva tenía un espejo de agua de aproximadamente 73 Ha (CNA, 1995). El agua de la presa es utilizada para el riego de aproximadamente 1,000 Ha. En esta zona se utilizan plaguicidas clorados y fosforados y las cantidades aplicadas no están controladas, la CNA reporta que los más comunmente utilizados son el paratión, el endosulfán y el heptacloro. (CNA, 1995).

**SESIONES PRACTICAS: Lu-Vie 14:00-18:00**

1. *Familiarización con el equipo CG/ECD*
2. *Elaboración de soluciones de trabajo a partir de soluciones stock*
3. *Realización de las mezclas de estándares*
4. *Cálculo de tiempos de retención*
5. *Resolución de mezclas de estándares*
6. *Elaboración de curvas calibración*
7. *Fortificación de muestras*
8. *Extracción y análisis de fortificados*
10. *Reporte final*

**INSTRUCTORES**

*M en C Ma Teresa Leal Ascencio, IMTA*  
*M en C Evaristo Martínez Romero, IMTA*  
*I.Q. Erick Bandala González, IMTA*  
*I.Q.I. Norma Ramírez Salinas, IMTA*  
*O. Sixto Pérez Salazar, IMTA*  
*O.B.P. Amparo Romero Márques, Varian*

**EQUIPO DE APOYO QUE SE REQUIERE:**

*-Proyector de Acetatos*  
*-Proyector de Diapositivas*

**CUPO MAXIMO:**

*12 personas*



## **ANALISIS DE PLAGUICIDAS CLORADOS EN AGUA.**

### **1 OBJETIVO**

*Identificar y cuantificar plaguicidas clorados en muestras de agua.*

### **2 CAMPO DE APLICACION**

*Este método se usa para la detección y cuantificación de plaguicidas clorados en muestras de agua.*

### **3 DEFINICIONES**

*Cromatografía de gases/líquido. Técnica de análisis empleada para la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla.*

*Blanco de vidriería. Es un lavado previo que se realiza a todo el material de vidrio o plástico que será usado para realizar los análisis. El propósito del blanco de vidriería es detectar y/o eliminar posible contaminación como resultado de un inadecuado lavado del material.*

*Blanco de reactivos. Es una alícuota de una matriz libre de los componentes de interés la cual es tratada exactamente como una muestra incluyendo la exposición al material de vidrio, equipo, disolventes y reactivos que son usados en las otras muestras.*

*Muestra fortificada. Es una alícuota de una matriz libre de los compuestos de interés a la cual se le agrega una cantidad conocida de los metabolitos involucrados en el método. La muestra fortificada es analizada de la misma manera que las demás muestras y su propósito es determinar la capacidad del analista de llevar a cabo mediciones precisas a los niveles del límite de detección del mismo.*

### **4 FUNDAMENTO**

~~*Este método se basa en una extracción líquido-líquido de los plaguicidas clorados por agitación con disolventes orgánicos de polaridad media, seguido de una limpieza por cromatografía en columna usando florisil desactivado. Los compuestos de interés se eluyen en dos pasos, uno utilizando n-hexano y otro utilizando una mezcla 1:1 de n-hexano:acetato de etilo. Los extractos obtenidos son inyectados a un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones.*~~

### **5 EQUIPO**

*Cromatógrafo de Gases, Hewlett Packard modelo 5890 series II o similar.*

*Detector de captura de electrones.*

*Columna RTX-5 de 30m x 0.25 mm x 0.2543µm o similar.*

*Evaporador rotatorio Büchi, modelo RE-121 con baño de temperatura regulable entre 0 y 100°C.*



## **CONDICIONES DE OPERACION DEL EQUIPO**

*Programa de temperaturas del horno:*

*Temperatura inicial 80°C*

*Temperatura final 240°C*

*Incrementos de temperatura 5°C/min*

*Temperatura del inyector 200°C*

*Temperatura del detector 310°C*

## **6 REACTIVOS**

*Estándares de los plaguicidas de interés.*

*Acetona grado plaguicida.*

*Metanol grado plaguicida.*

*Cloruro de metileno grado plaguicida.*

*Sulfato de sodio anhidro granular grado reactivo.*

*n-hexano grado plaguicida.*

*Acetato de etilo grado plaguicida.*

*Florisil desactivado al 5%.*

## **7 PROCEDIMIENTO**

*7.1 El material de vidrio será enjuagado dos veces con el disolvente que se usará para llevar a cabo la extracción. El disolvente del primer lavado se desecha y el del segundo se recupera en un matraz, se concentra hasta un volumen final de 1 ml y se transfiere a un vial para su posterior análisis como blanco de vidriería.*

*7.2 Para la elaboración del blanco de reactivos se puede utilizar agua desionizada la cual deberá ser tratada de la misma manera que las muestras.*

~~*7.3 Para la elaboración de la muestra fortificada se utiliza la misma matriz que para el blanco de reactivos.*~~  
*Para este caso, un volumen de una solución de concentración conocida de los metabolitos es agregada a la muestra la cual debe ser tratada como todas las demás.*

*7.4 Tomar una alícuota de la muestra registrando el volumen exacto y ponerla en un embudo de separación.*

*7.5 Extraer 3 veces con 50 ml de diclorometano.*

*7.6 Los extractos se hacen pasar a través de sulfato de sodio anhidro y se reúnen en un matraz redondo. Se concentran a presión reducida teniendo cuidado de no dejar llegar a sequedad. Se debe hacer un cambio de disolvente de diclorometano a n-hexano para prevenir que el primero pueda causar interferencia en el cromatógrafo. El cambio de disolvente se realiza de la siguiente manera: una vez que la cantidad de diclorometano en el matrás es suficientemente pequeña (aproximadamente 1 ml) el matrás se retira del baño y se agregan 5 ml de n-hexano. Se reinicia el proceso de concentración. Debido a que el diclorometano es más volátil que el n-hexano, el primero se encontrará en concentración despreciable cuando el volumen sea*



**INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGIA DEL AGUA**

*nuevamente cercano a 1 ml*

*7.7 Se toma una alícuota del extracto y se inyecta en el sistema cromatográfico. En caso de que el cromatograma resultante sea complejo, se deberá hacer una limpieza con florisil desactivado al 5%.*

*7.8 La activación del florisil se lleva a cabo calentándolo a 800°C durante 4 horas. Al cabo de éste tiempo, el florisil activado se deja enfriar en un desecador y después se desactiva con agua (5 g de agua por cada 100g de florisil).*

*7.9 Aproximadamente 10 g de florisil se empacan en una columna de cromatografía descendente y se eluye previamente con 20 ml de n-hexano. La muestra se coloca en la parte superior de la columna sin permitir que esta se seque. Se eluye con n-hexano y mezcla n-hexano:acetato de etilo 1:1 vol/vol. Los volúmenes recomendados son 20 y 50 ml respectivamente.*

*7.10 Los eluatos se reciben en matraces redondos y se concentran en el rotavapor hasta aproximadamente 1 ml.*

*7.11 Se toma una alícuota de la fracción obtenida y se inyecta en el sistema cromatográfico para su análisis.*