



CURSO: “INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE RESIDUOS Y CONTAMINANTES QUÍMICOS”

MÓDULO 4

**Optimización de parámetros instrumentales
mediante diseño de experimentos**

Luisina Demonte

DISEÑOS DE EXPERIMENTOS

- Es un herramienta estadística que permite identificar una o más variables que tienen efecto en la respuesta de interés. Estas variables, que no controlamos, se deben ajustar para optimizar dicha respuesta.
- La respuesta de los analitos en función de los múltiples parámetros instrumentales de la espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) constituye uno de los aspectos más críticos de las aplicaciones cuantitativas de la técnica de LC-MS.

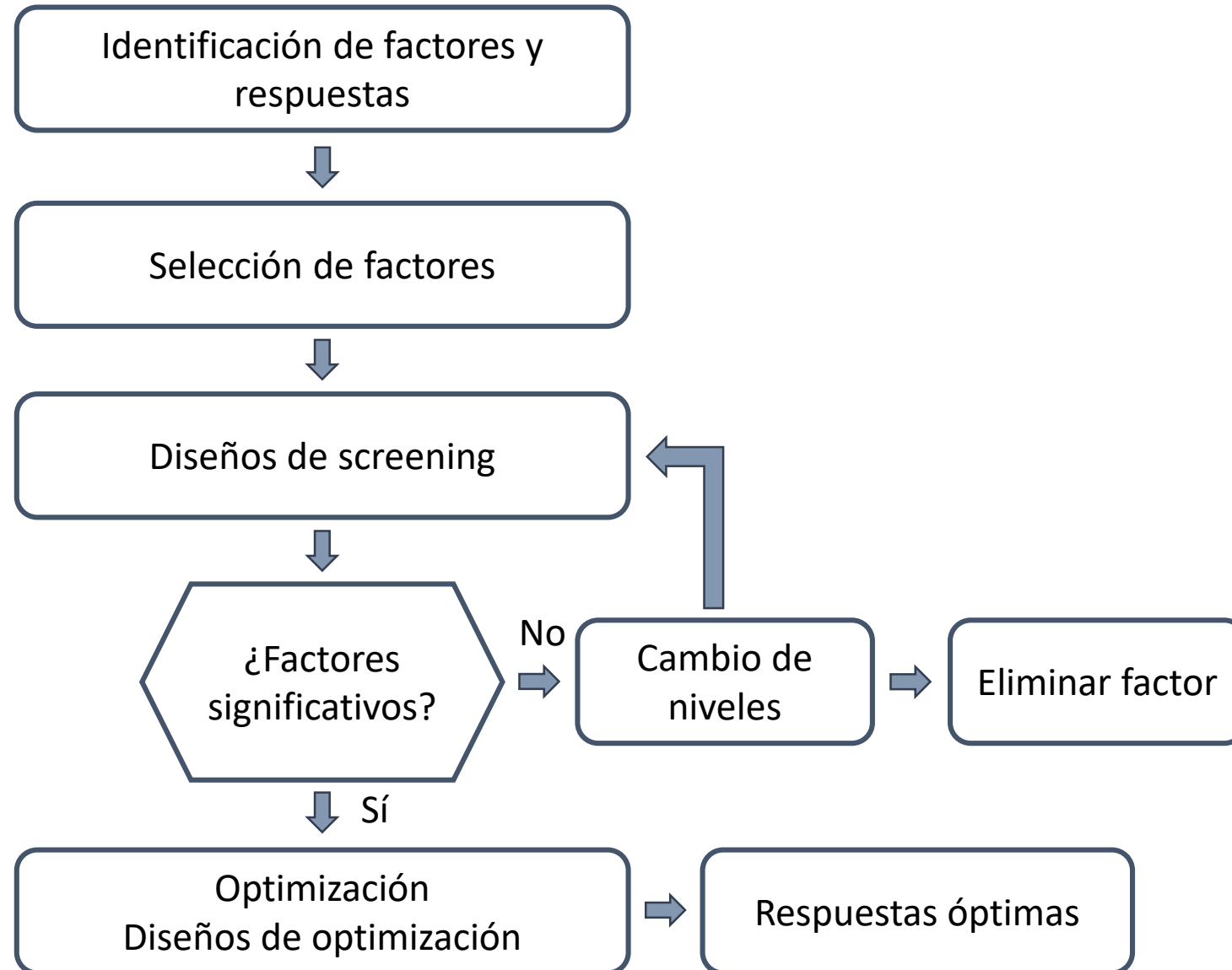
OBJETIVO:

- Optimizar el sistema espectrométrico considerando variables de la fuente de ionización, para evaluar la interacción de los parámetros instrumentales en la respuesta (área de los picos cromatográficos) de los tres analitos en conjunto (glifosato, AMPA y glufosinato) y aumentar la sensibilidad de la detección. Dependiente de cada equipo.
- Software Design Expert 7.0.

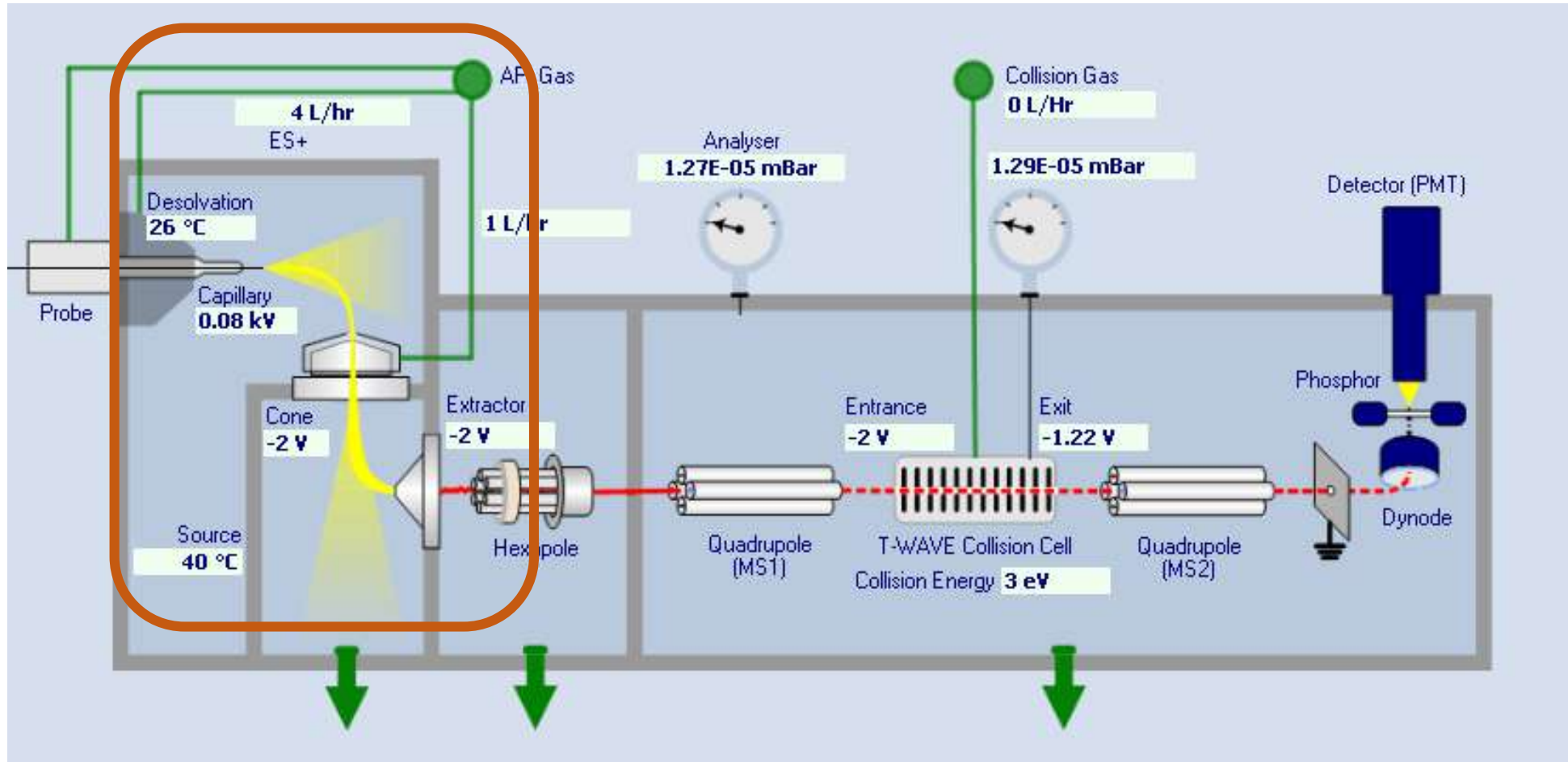
OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

- La optimización de los compuestos, es decir la selección de las condiciones del voltaje de fragmentación y energías de colisión se deben determinar individualmente para cada plaguicida.
- Infusión, que consiste en la introducción de los estándares directamente a la fuente, sin el paso previo por la columna cromatográfica. Se infunde cada compuesto individual y se va observando la respuesta en función de los voltajes de manera de seleccionar el voltaje óptimo para aislar el ion precursor y una vez optimizado el ion precursor se determinan las energías de colisión (CE) de los iones producto o fragmento.
- **VARIABLES QUE NO SE SELECCIONAN PARA CADA COMPUESTO INDIVIDUALMENTE, SINO QUE SE DEBEN OPTIMIZAR Y LOGRAR UNA SOLUCIÓN DE COMPROMISO ÓPTIMA PARA TODOS LOS COMPUESTOS.**

ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN

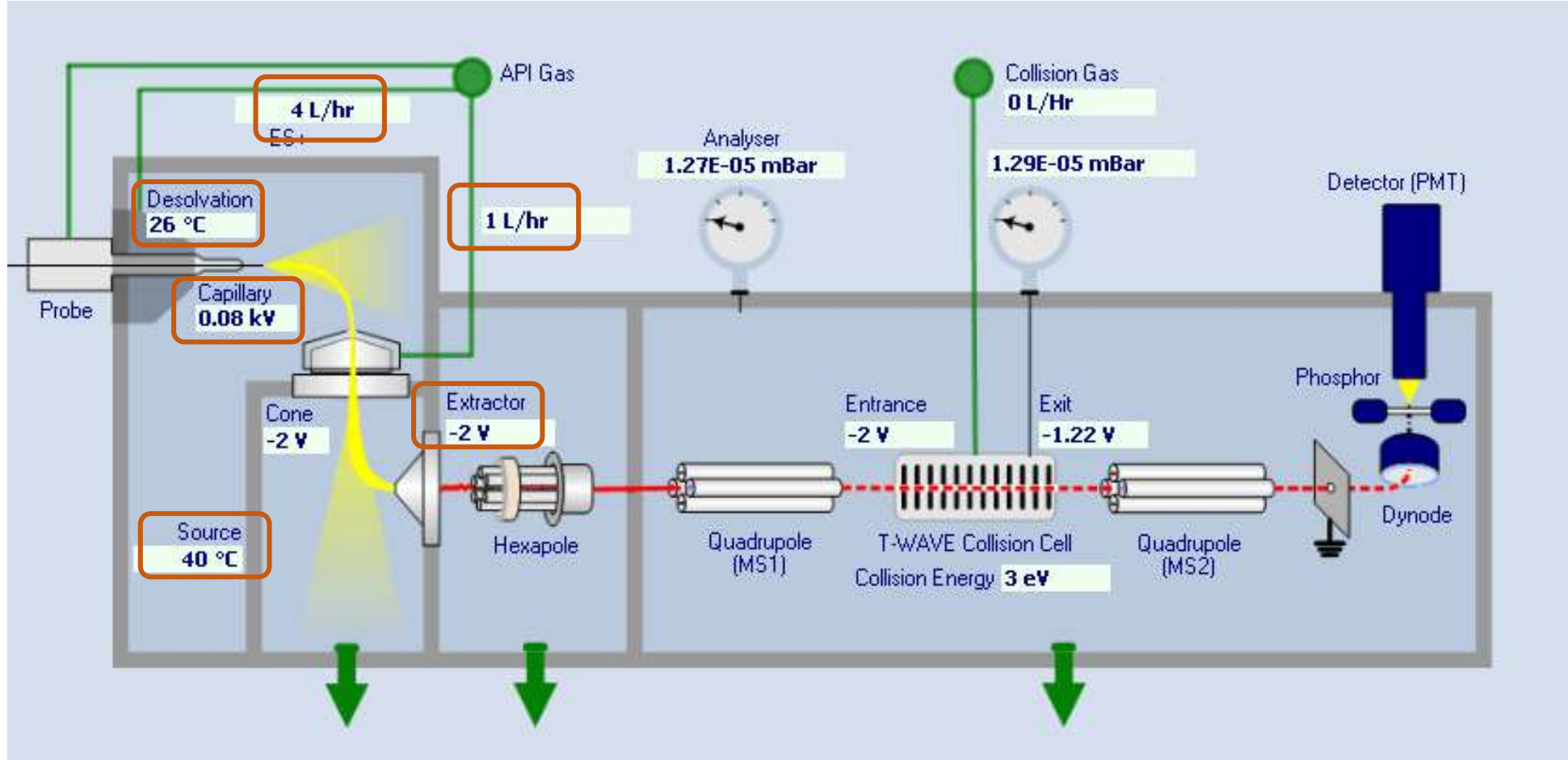


ESQUEMA COMPLETO DEL SISTEMA MS



Fuente de ionización.

SELECCIÓN DE VARIABLES A OPTIMIZAR



VARIABLES A OPTIMIZAR

- **Voltaje de capilar:** voltaje que se aplica para formar un exceso de carga en la solución que eventualmente forma iones.
- **Voltaje de extractor:** concentra los iones hacia el hexapolo.
- **Temperatura de desolvatación y Temperatura de fuente:** ayuda a la evaporación del solvente (desolvatación) y previene condensación de la muestra y la formación de aductos de solvente (fuente). Dependen del flujo y la composición de la fase móvil (FM acuosas y flujos altos requieren más calor).
- **Flujo de gas de desolvatación:** flujo de N_2 enviado por la boquilla del calefactor de desolvatación y usado para la evaporación del solvente (depende del flujo y la composición de la fase móvil).
- **Flujo de gas de cono:** flujo inverso de N_2 alrededor del cono de muestra para prevenir la formación de aductos y mantenerlo limpio (flujo alto podría reducir la sensibilidad).

Diseños de screening



DISEÑO FACTORIAL

Diseños factoriales completos.

- Se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.
- Permiten estimar los efectos de todos los factores principales y sus interacciones.
- La cantidad de puntos experimentales esta dada por 2^k .
- El número de experiencias crece rápidamente con el número de factores.

Diseños factoriales fraccionados.

- Se investigan algunas de todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.
- La cantidad de experimentos a realizar está dada por 2^{k-p} . Donde p indica cuántas veces se fracciona o reduce el diseño completo.

Se inició el experimento con un diseño factorial fraccionado. Este tipo de diseño no permite explorar completamente una amplia región del espacio de los factores, pero proporciona información útil con un número relativamente reducido de corridas por cada factor y se pueden identificar tendencias importantes, que luego son utilizadas como punto de partida en experimentos adicionales.

DISEÑO FACTORIAL

- Se utilizaron rangos de valores óptimos para el buen funcionamiento y vida útil del equipo.
- Voltaje de capilar: 1 - 4 kV
- Voltaje de extractor: 2 - 6 V
- Temperatura de fuente: 120 - 150 °C
- Temperatura de desolvatación: 250 - 450 °C
- Flujo de gas de desolvatación: 800 - 1000 L/h
- Flujo de gas de cono: 5 - 20 L/h

Para identificar cuáles son las variables que influyen en el sistema.

- 16 corridas, inyecciones por duplicado.

std	Run	Block	Voltaje capilar	Voltaje extractor	Temperatura fuente	Temperatura solvatación	Caudal solvatación	Caudal cono
15	1	Block 1	1	6	150	450	800	20
8	2	Block 1	4	6	150	350	1000	5
12	3	Block 1	4	6	120	450	800	5
9	4	Block 1	1	2	120	450	800	20
4	5	Block 1	4	6	120	350	800	20
2	6	Block 1	4	2	120	350	1000	5
5	7	Block 1	1	2	150	350	1000	20
7	8	Block 1	1	6	150	350	800	5
16	9	Block 1	4	6	150	450	1000	20
10	10	Block 1	4	2	120	450	1000	20
3	11	Block 1	1	6	120	350	1000	20
14	12	Block 1	4	2	150	450	800	5
11	13	Block 1	1	6	120	450	1000	5
6	14	Block 1	4	2	150	350	800	20
13	15	Block 1	1	2	150	450	1000	5
1	16	Block 1	1	2	120	350	800	5

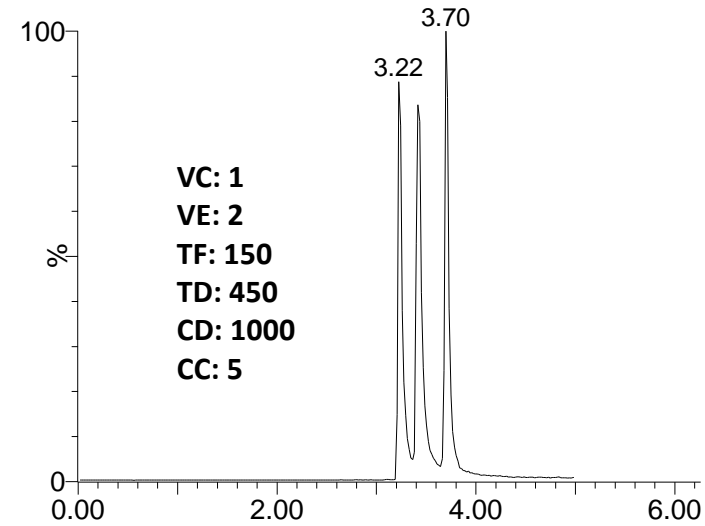
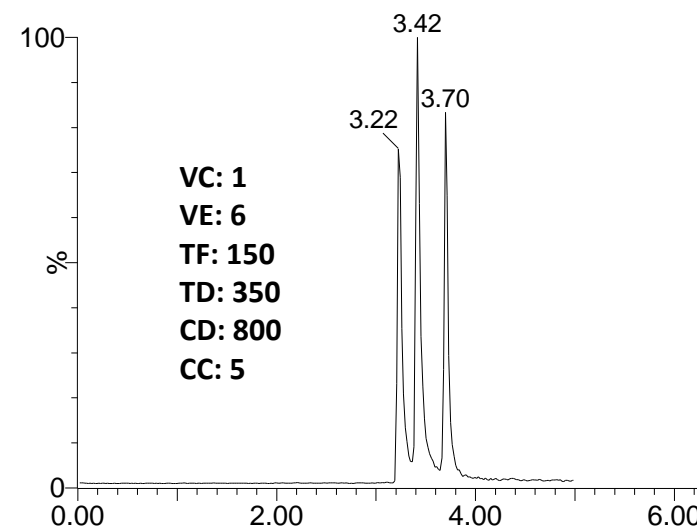
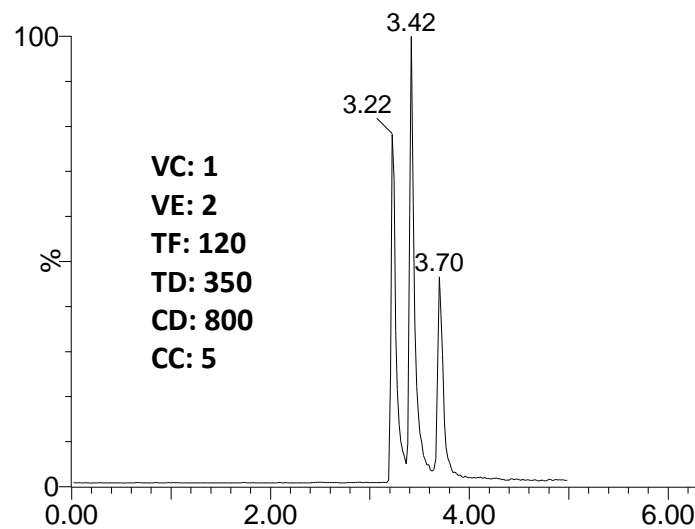
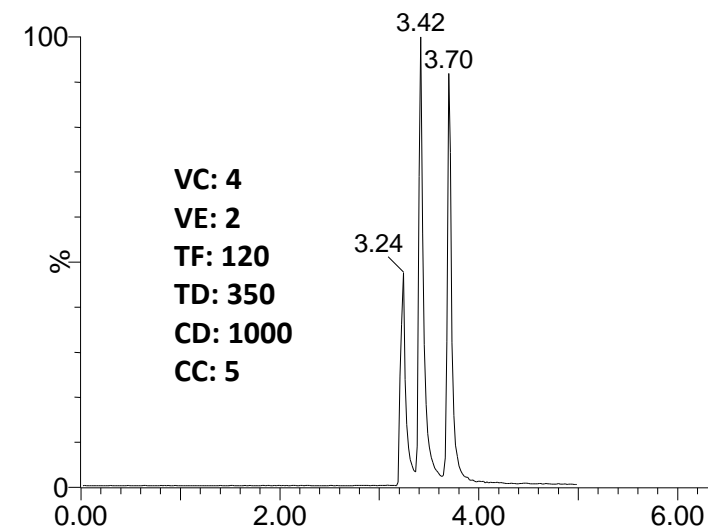
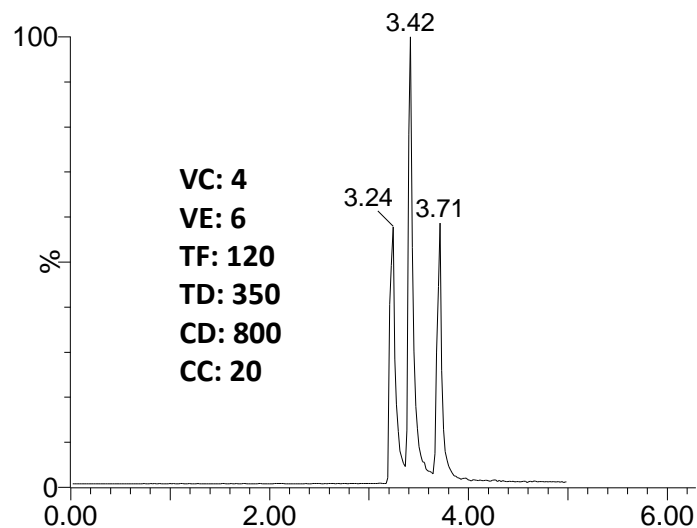
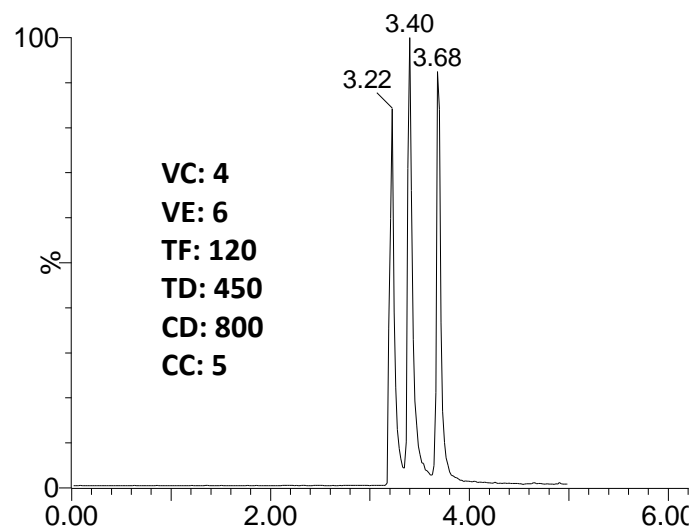
Diseños de screening



DISEÑO FACTORIAL



RESULTADOS



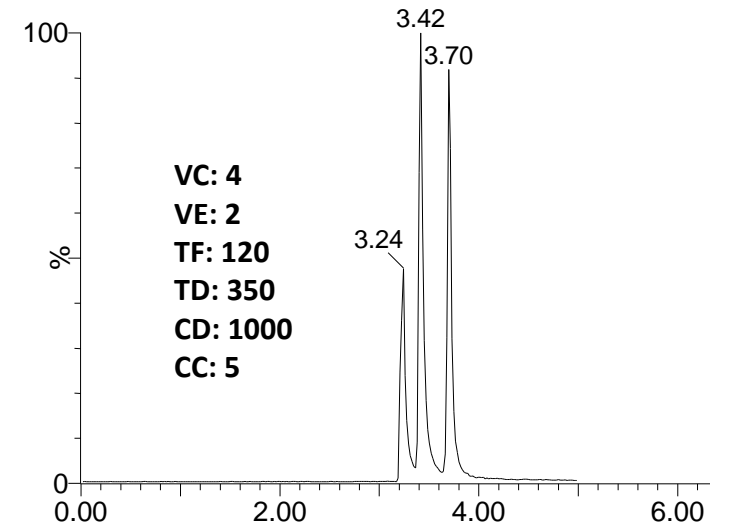
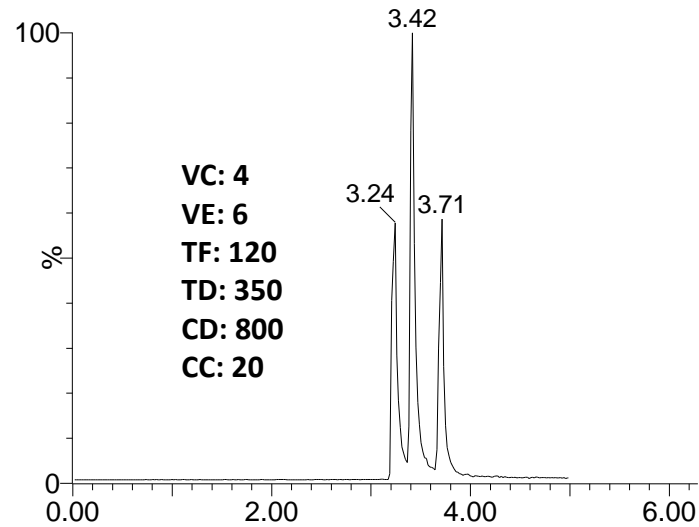
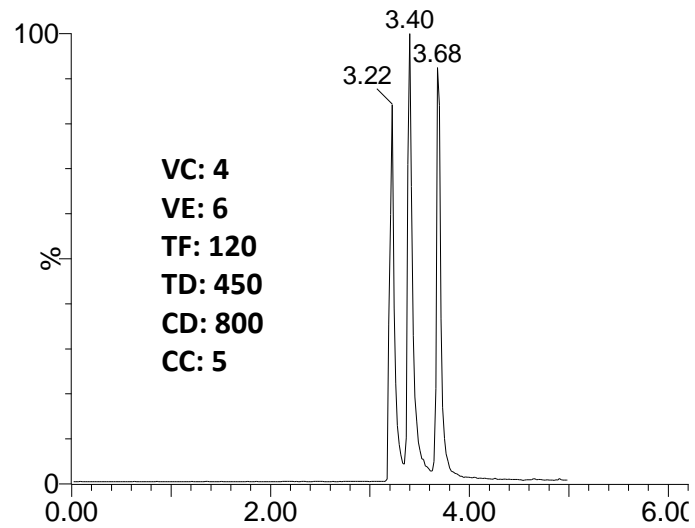
Diseños de screening



DISEÑO FACTORIAL

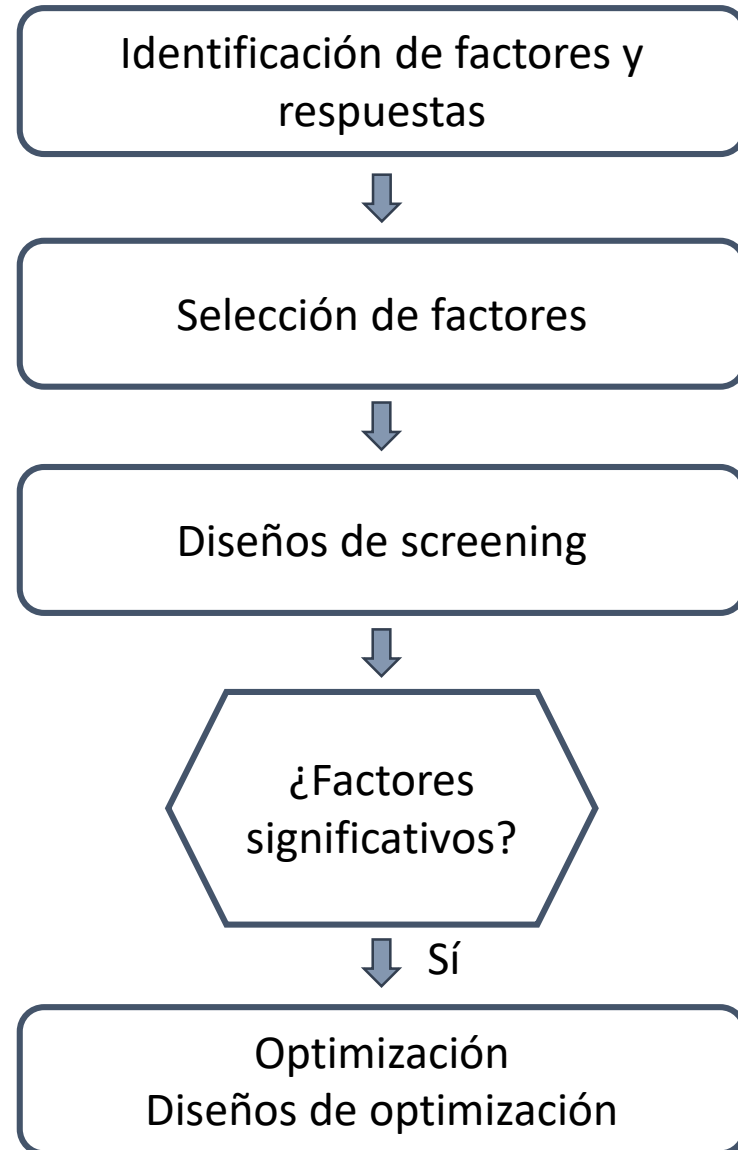


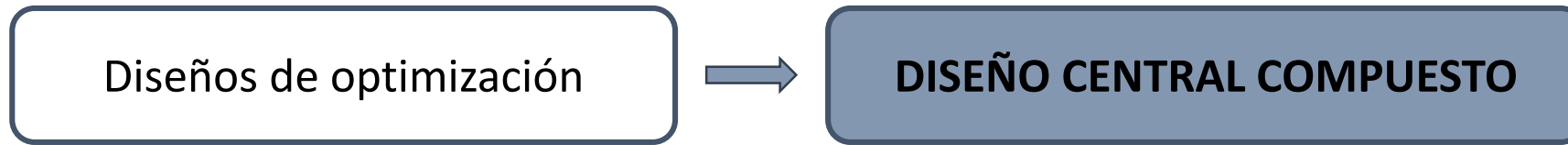
RESULTADOS



Factor	Glifosato	AMPA	Glufosinato
Voltaje capilar (kV)	No influye (2 kV)	No influye (2 kV)	No influye (2 kV)
Voltaje extractor (V)	Influye (mínimo)	Influye (mínimo)	Influye (mínimo)
Temperatura fuente (°C)	No influye (120 °C)	Influye poco (120 °C)	Influye poco (120 °C)
Temperatura desolvatación (°C)	Influye (máximo)	Influye (máximo)	Influye (máximo)
Caudal desolvatación (L/h)	No influye (cerca del mínimo)	No influye (cerca del mínimo)	No influye (cerca del mínimo)
Caudal cono (L/h)	No influye (mínimo)	No influye (mínimo)	No influye (mínimo)

ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN

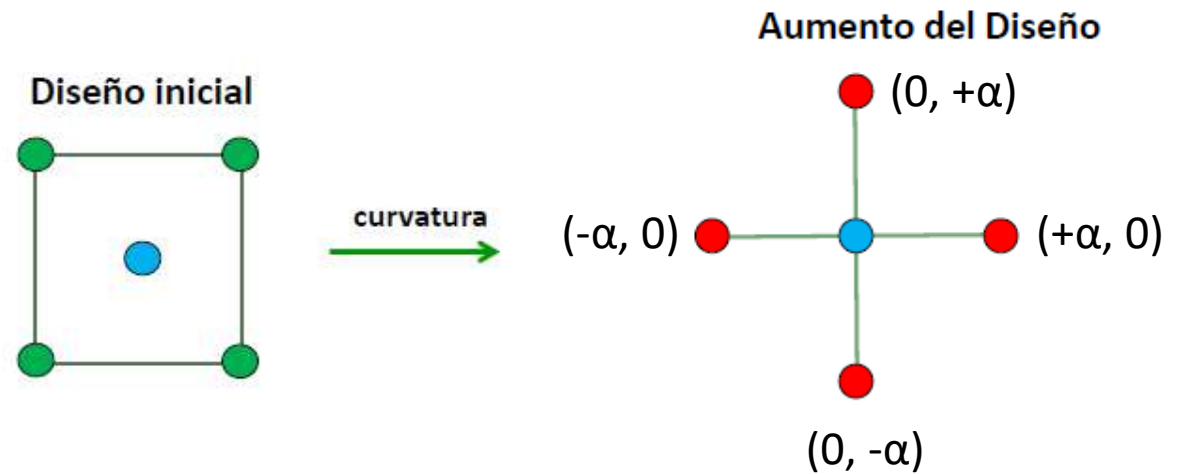




- Como se necesita explorar una región donde se estima que existe una configuración óptima, se puede ampliar un diseño factorial y formar un diseño central compuesto.
- Es un diseño de superficie de respuesta, que es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta.
- La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de screening, cribado o factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta a obtener.
- En una ecuación de superficie de respuesta se adicionan los términos cuadráticos que permiten modelar la curvatura en la respuesta, lo que la hace útil para entender o mapear una región de una superficie, hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta y seleccionar las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones.

DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

- Optimizar los parámetros que resultaron influyentes en el diseño factorial.
- Voltaje de extractor: 1 - 2,2 V
- Temperatura de fuente: 100 - 120 °C
- Temperatura de desolvatación: 400 - 450 °C
- 5 puntos centrales y $\alpha=1,68179$.
- Diseño estrella, a una distancia α del centro.



- 19 corridas, inyecciones por duplicado.

STD	RUN	Voltaje extractor	Temp. Fuente	Temp. Desolvatación
12	1	1,6 (2)	123	425
1	2	1 (1)	110	400
7	3	1	120	450
2	4	2,2 (3)	110	400
14	5	1,6	115	467
10	6	2,6 (4)	115	425
13	7	1,6	115	383
16	8	1,6	115	425
18	9	1,6	115	425
4	10	2,2	120	400
19	11	1,6	115	425
15	12	1,6	115	425
5	13	1	110	450
9	14	0,6 (0)	115	425
8	15	2,2	120	450
17	16	1,6	115	425
3	17	1	120	400
11	18	1,6	107	425
6	19	2,2	110	450

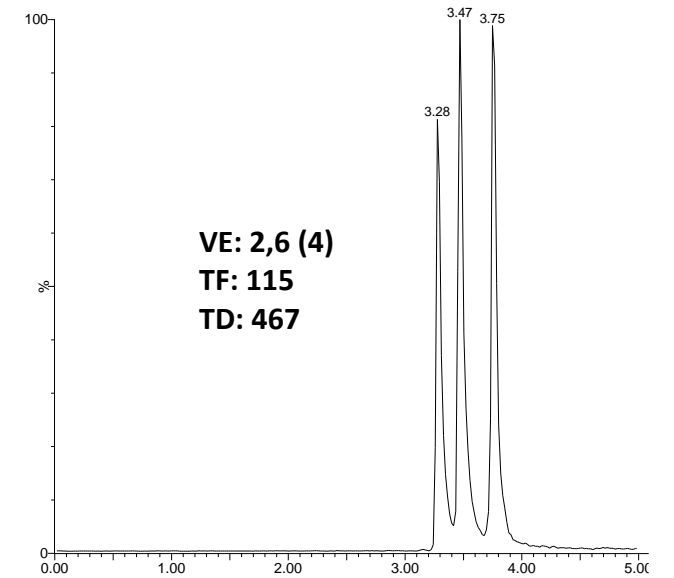
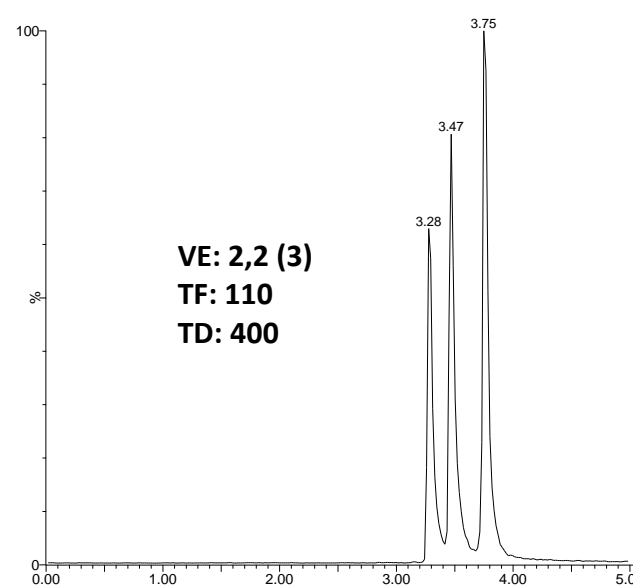
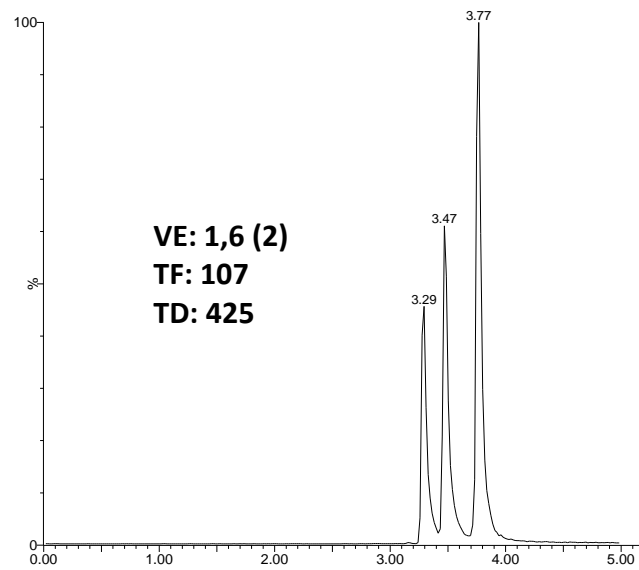
Diseños de
optimización



**DISEÑO CENTRAL
COMPUESTO**



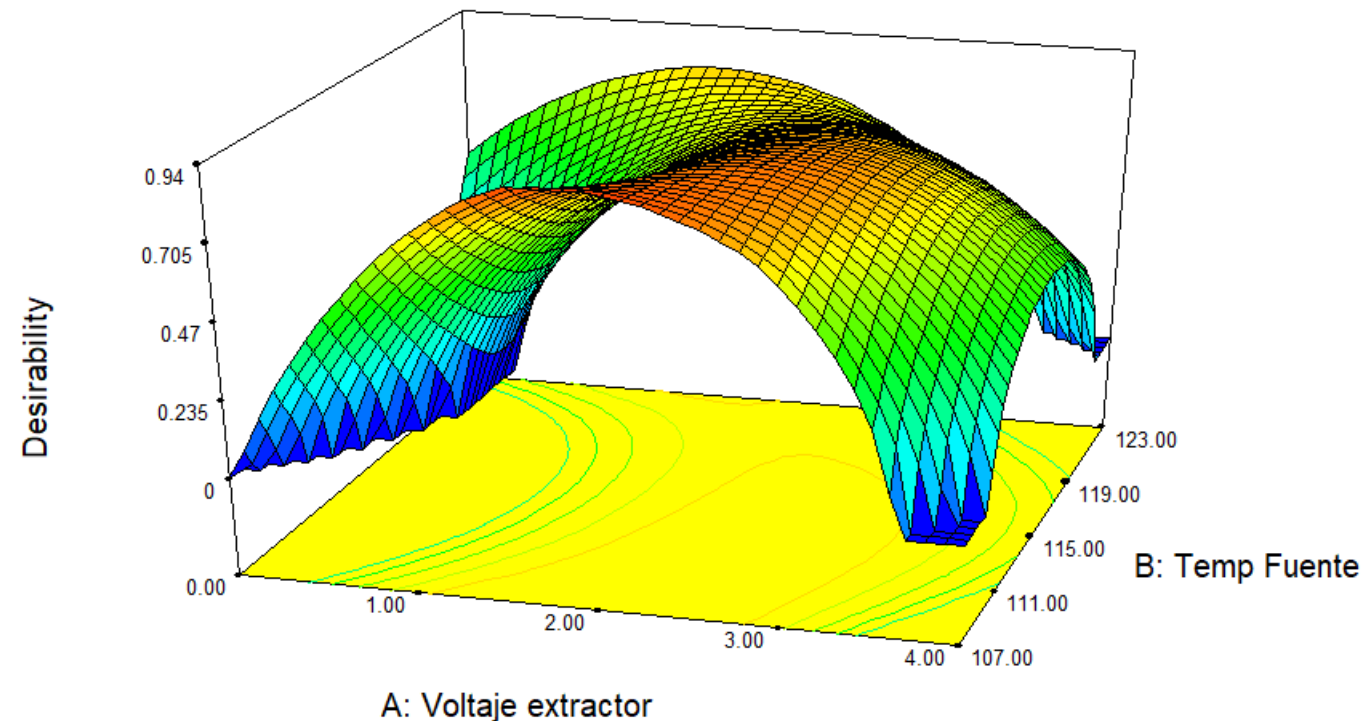
RESULTADOS



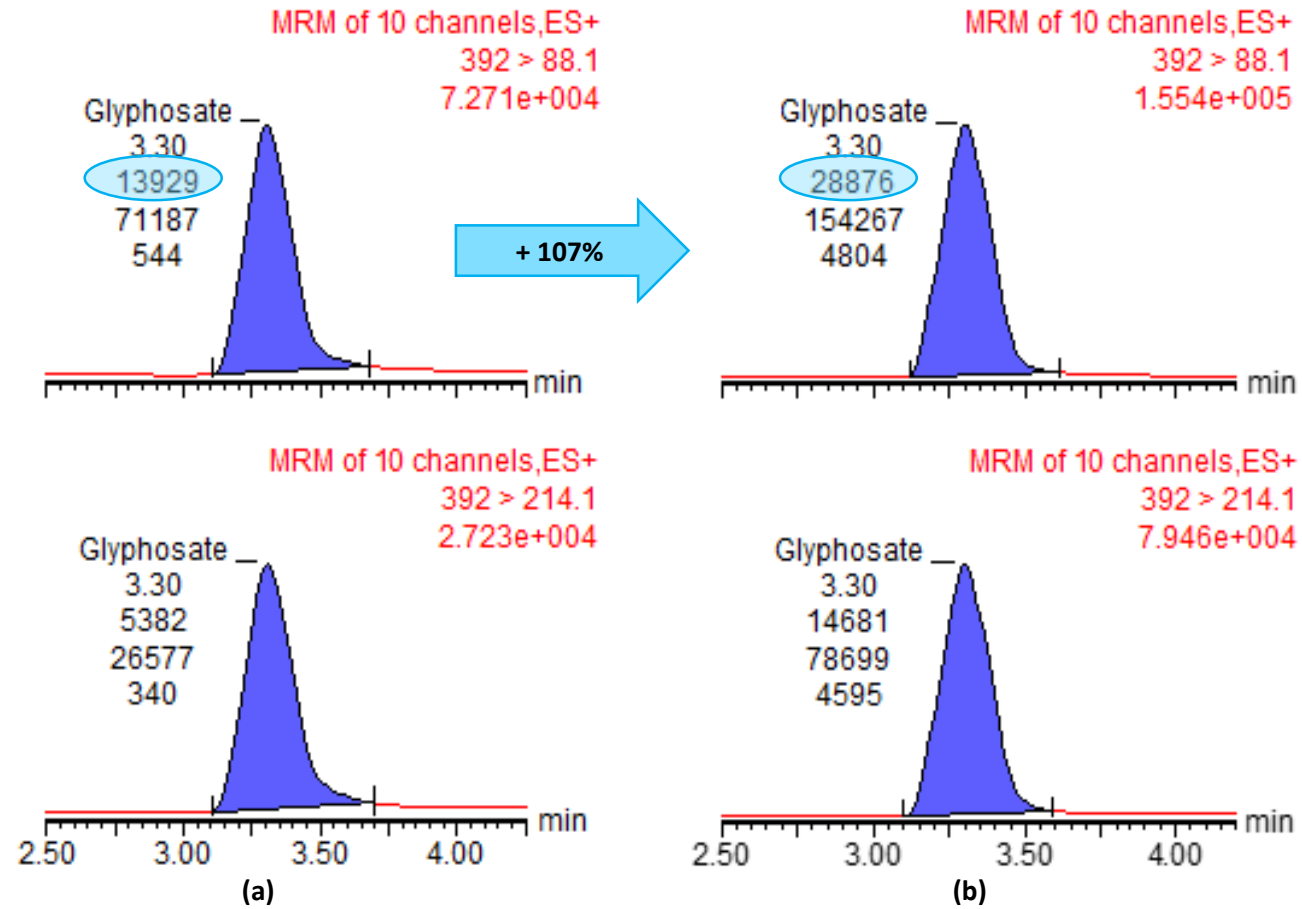
Variables a optimizar	Valores iniciales	Valores diseño de experimentos
Voltaje de capilar	1 kV	2 kV
Voltaje de extractor	1 V	2 V
Temperatura de fuente	140°C	107°C
Temperatura de desolvatación	500°C	462°C
Flujo de gas de desolvatación	600 L/h	800 L/h
Flujo de gas de cono	20 L/h	5 L/h

Superficie de respuesta con un valor de 0,936 de deseabilidad, lo que es un muy buen valor, cercano a 1, que es lo ideal.

Se evaluó la sensibilidad cromatográfica de los analitos estudiados con los parámetros espectrométricos optimizados mediante el diseño de experimentos realizado.

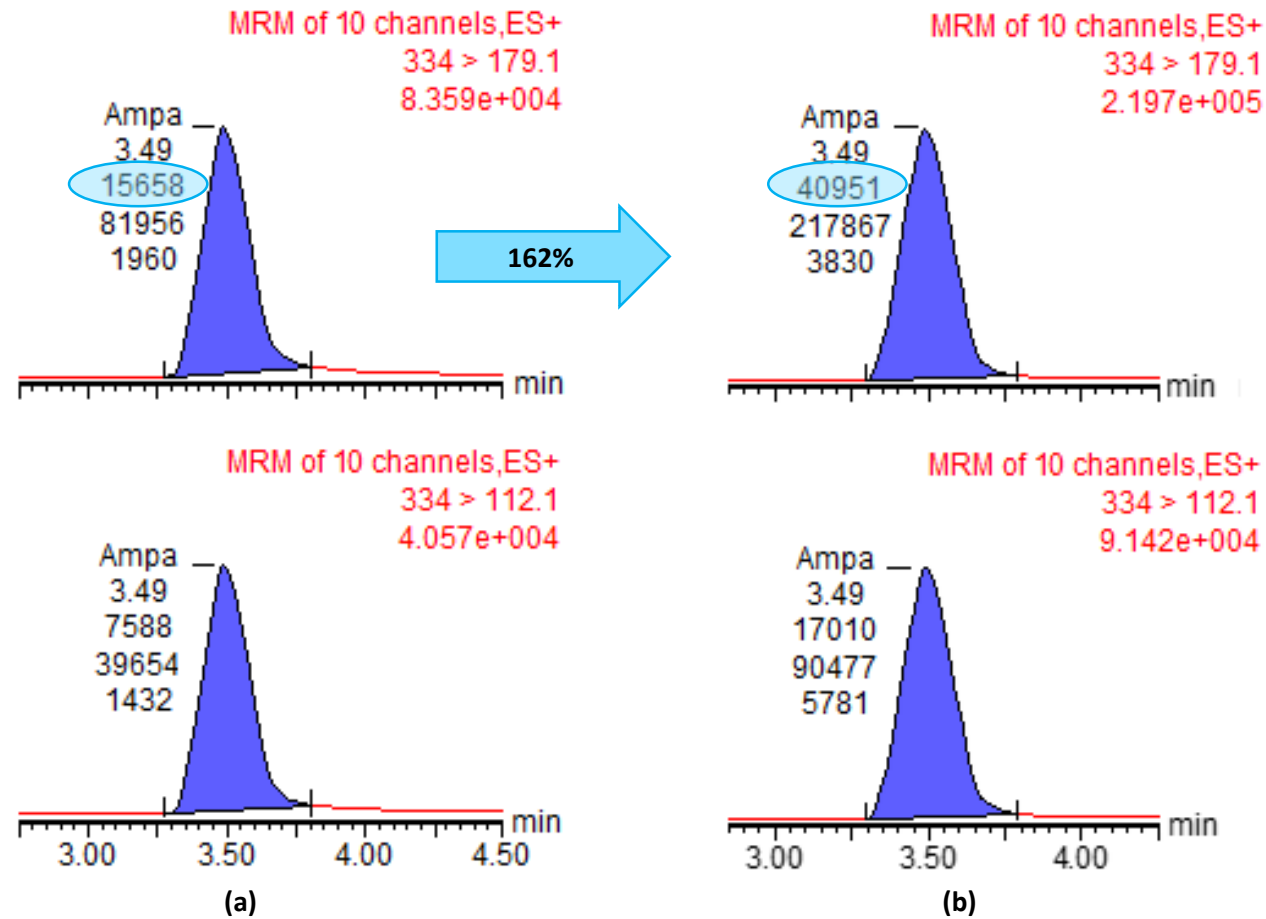


OPTIMIZACIÓN GLIFOSATO



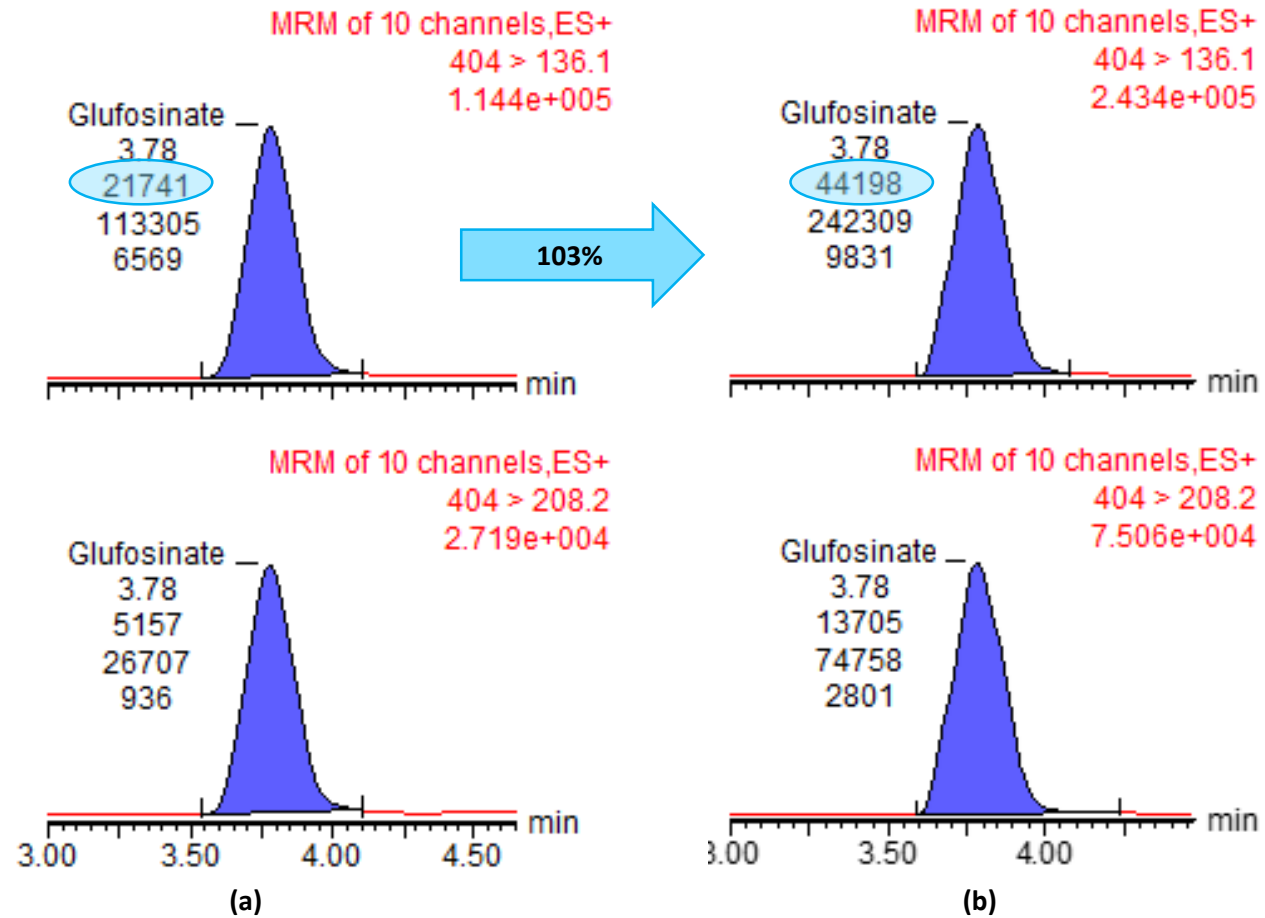
Comparación de picos cromatográficos de glifosato antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

OPTIMIZACIÓN AMPA



Comparación de picos cromatográficos de AMPA antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

OPTIMIZACIÓN GLUFOSINATO



Comparación de picos cromatográficos de glufosinato antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

RESUMEN

DISEÑO FACTORIAL

(Para identificar qué parámetros influyen en el sistema)



- Voltaje de capilar

- Voltaje de extractor

- Temperatura de fuente

- Temperatura de desolvatación

- Flujo de gas de desolvatación

- Flujo de gas de cono



DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

(Para optimizar los parámetros influyentes)



1 - 2,2 (V)

110 - 120 (°C)

400 - 450 (°C)

5 puntos centrales

$\alpha = 1,68179$

CONCLUSIONES

- Diseño de experimentos (factorial y central compuesto) permitió encontrar la mejor combinación de los factores para obtener la respuesta más conveniente.
- Lograr un incremento en las áreas de los tres analitos estudiados, aumentar la sensibilidad analítica y, por consiguiente, conseguir mejores límites de detección y cuantificación.



¡Gracias!

Luisina Demonte

