

TRABAJOS DE COLABORACION

Sección de Fisiología y Bioquímica del Parasitismo
Instituto "López-Neyra" de Parasitología. C.S.I.C. Granada

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES POR CROMATOGRAFIA GASEOSA

MIGUEL MONTEOLIVA y JOSE MARIA ABENZA

INTRODUCCION

Los ácidos grasos volátiles constituyen un grupo de ácidos monocarboxílicos, de bajo peso molecular y caracterizados por ser arrastrables en corriente de vapor de agua.

Característicos de las grasas de leche de mamíferos, actualmente se ha demostrado su existencia en otras numerosas fuentes, tanto como ácidos libres, como combinados.

Para su identificación y determinación se han empleado diversos procedimientos desde los clásicos índices de Polenske y Reichels Meisl, hasta las diferentes técnicas cromatográficas: papel, capa fina, columna y cromatografía gaseosa. En la actualidad el método de elección es la cromatografía gaseosa que presenta sobre las anteriores una mayor resolución y sensibilidad, además de poseer una mayor exactitud y reproducibilidad. En este trabajo describimos la técnica empleada por nosotros, para la identificación y determinación de ácidos grasos volátiles, en muestras de origen animal.

MATERIAL Y METODOS

a) *Aislamiento de los ácidos grasos*

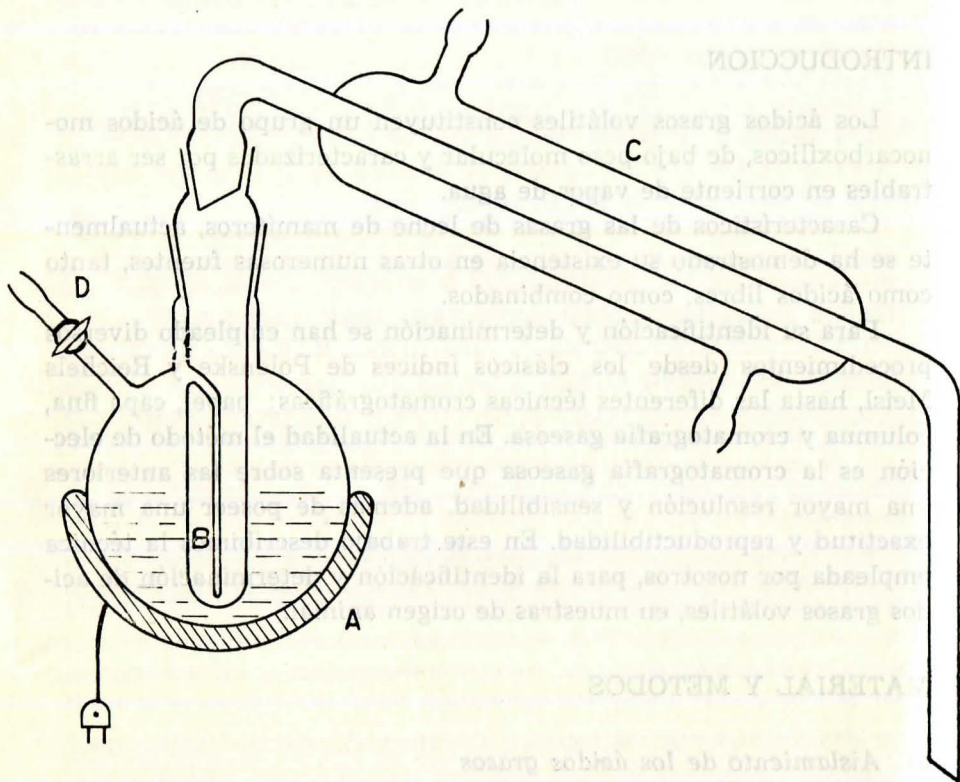
El aislamiento de los ácidos grasos se realiza por destilación en corriente de vapor, en el dispositivo de la gráfica n.º 1. Consta de un matraz de cuello corto de un litro de capacidad y boca esmerilada 45/40 y una lateral, 14/23. En esta última se ajusta una llave de paso con un macho, 14/23, y por el otro lado, terminado en oliva, para unirle, un tubo de goma que lleve al fregadero.

Sección de Fisiología y Biología del Parasitismo
Instituto "José-Novás" de Parasitología, CSIC, Granada

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES POR
CROMATOGRAFIA GASEOSA

MIGUEL MONTEOLIVA y JOSE MARIA ARZUELA

GRAFICA 1



ATERIAL Y METODOS

Aislamiento de los ácidos grasos

El aislamiento de los ácidos grasos se realiza por destilación en
vacuo de vapor, en el dispositivo de la gráfica n.º 1. Consiste de un
matraz de cuello corto de un litro de capacidad y boca ensanchada
de 170 y una lateral M.22. En esta última se ajusta una llave de
cierre con un macho M.23 y por el otro lado, terminado en otro
macho M.24, un tubo de goma que lleva al frasco.

El recipiente de destilación ajusta en su centro con un macho, 45/40, a la boca del matraz y en su parte superior está terminado en una hembra, 14/23, que permite unirle mediante las piezas adecuadas a un refrigerante de destilación. Esta pieza central tiene un orificio lateral por debajo del esmerilado macho, unido a un tubo de vidrio de 2 mm de luz que termina en el fondo del recipiente.

Todo el conjunto va montado sobre una manta calefactora regulable. En el matraz se coloca agua destilada suficiente para cubrir el nivel del líquido contenido en el recipiente interior y se calienta hasta hervir con la llave lateral abierta. Cuando la ebullición está regularizada se cierra la llave, con lo que se obliga al vapor de agua a pasar por el tubo de vidrio y barbotear en el líquido problema, iniciándose el arrastre de los ácidos grasos que se condensan en el refrigerante, recogiendo a la salida de este en un matraz aforado.

Para que los ácidos grasos estén como tales, el pH del medio ha de ser inferior a 3, por lo que, antes de iniciar la destilación, se agrega suficiente ácido fosfórico concentrado.

La neutralización del destilado o fracción alicuota del mismo, con hidróxido sódico n/10 en presencia de fenoltaleína, nos da la acidez total de los ácidos grasos volátiles solubles.

En algunos casos pueden aparecer en el destilado sustancias volátiles neutras que no estorban a la determinación de la acidez total, pero sí en la cromatografía gaseosa. En este caso, el destilado neutralizado a la fenoltaleína se evapora a sequedad a 70°C, se disuelve en 5 ml. de agua destilada y en un dispositivo de pequeñas dimensiones, se destila sobre 2 ml. de ácido fosfórico concentrado, recogiendo los 5 ml. en el destilado. Esta segunda destilación permite concentrar el destilado primero que debe de ser de 15-20 veces más que el volumen del problema.

Los ácidos grasos libres, en solución acuosa, en 1.^a ó 2.^a destilación, se encuentran en condiciones de ser inyectados en el cromatógrafo.

b) *Cromatografía gaseosa*

Se utiliza un cromatógrafo Carbo Erba, modelo Fractovap 2.200, equipado con detector de ionización de llama. Las condiciones experimentales empleadas son las siguientes:

Temperatura del bloque de inyección	250°C
Temperatura del detector	200°C
Temperatura de la columna	180°C
Flujo de nitrógeno (gas portador)	60 ml/minuto
Flujo de hidrógeno (gas combustible)	40 ml/minuto
Flujo de Aire (gas carburente)	100 ml/minuto
Atenuación en el electrómetro	1.000 × 16
Entrada al registrador	1 mV/anchura del papel

Velocidad del registrador	} determinación tiempos		
		retención	0,5 cm/minuto
		otras medidas	0,1 cm/minuto

Columna: Poropak Q silanizado, 100-120 mallas con el 1% de ácido fosfórico.

Dimensiones de la columna de vidrio: 0,6 cm. × 2 metros.

c) Soluciones patrones

A partir de ácidos grasos comerciales, destilados en corriente de vapor y ajustados en el destilado a soluciones N/10, valorando con sosa en presencia de fenoltaleina. Se comprueba que sólo dan un pico en la cromatografía gaseosa.

TABLA 1

Ácido	n.º de C	Estructura	Casa		T.º eb.
			Comercial	P.M.	
Acético	2	lineal, sat.	Merck	60,05	118,1
Propiónico	3	lineal, sat.	Erba	74,08	141,4
Acrílico	3	lineal, insat.	Erba	72,06	141,2
Isobutírico	4	lineal, sat.	Riedel	88,10	154,7
Butírico	4	ramif., sat.	Riedel	88,10	164,1
Crotónico	4	lineal, insat.	Koch-Light	86,09	189,0
2-metil-butírico	5	ramif., sat.	Fluka	102,13	174
Isovaleriánico	5	ramif., sat.	Doesder	102,13	176,5
Valeriánico	5	lineal, sat.	Koch-Light	102,13	186,4
Etil-acrílico	5	lineal, insat.	Koch-Light	100,11	197-200
Tíglico	5	ramif., inst.	NBCo	100,11	198,5
2-metil-valeriánico	6	ramif., sat.	Fluka	116,16	193
4-metil-valeriánico	6	ramif., sat.	Koch-Light	116,16	199,5
Caproico	6	lineal, sat.	NBCo	116,16	205,4

RESULTADOS

TABLA 2

Tiempos de retención de los ácidos grasos volátiles

Acido	T.R. (m.)	Acido	T.R. (m.)
Acético	3,10	Isovaleriánico	28,06
Propiónico	6,36	Valeriánico	34,30
Acrílico	7,00	Etil-acrílico	43,20
Isobutírico	11,50	Tíglico	37,24
Butírico	14,20	2-metil-valeriánico	58,00
Crotónico	19,40	4-metil-valeriánico	67,00
2-metil-butírico	27,36	Caproico	72,00

TABLA 3

En la mezcla, a concentraciones equimolares, se diferencian los siguientes picos:

T.R.	Componentes	T.R.	Componentes
3,10	Acético	20,88	2-M-butírico, Isovaleriánico
6,50	Propiónico, Acrílico	34,30	Valeriánico
11,50	Isobutírico	41,00	Tíglico, Etil-acrílico
14,20	Butírico	64,00	2-M-valeriánico, 4-M-valeriánico
19,40	Crotónico	78,00	Caproico

TABLA 4

Sensibilidad del detector de ionización de llama, para los diferentes ácidos (expresados en nanoequivalentes o microgramos, necesarios para obtener una altura de pico de 10 mm.)

Acido	nano equivalentes	microgramos
Acético	6,6	0,36
Propiónico	4,2	0,31
Acrílico	6,0	0,43
Isobutírico	5,0	0,44
Butírico	4,2	0,37
Crotónico	9,0	0,77
2-metil-butírico	10,0	1,02
Isovaleriánico	13,0	1,32
Valeriánico	10,1	1,03
Etil-acrílico	22,9	2,29
Tíglico	21,2	2,12
2-metil-valeriánico	18,8	2,18
4-metil-valeriánico	19,2	2,23
Caproico	28,4	3,29

TABLA 5

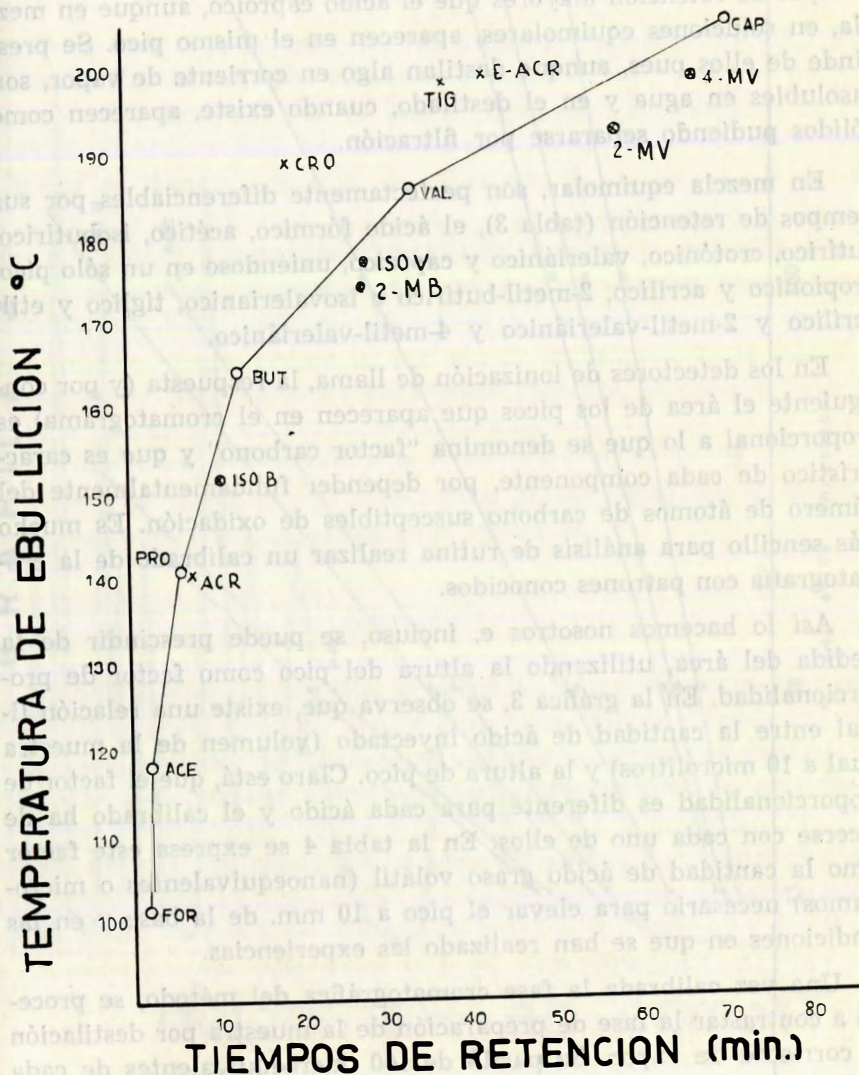
Porcentaje de recuperación para los diferentes ácidos ensayados en primera y segunda destilación (100 micro. Mol. de cada uno)

Acido	1. ^a destilación	2. ^a destilación	
	% inicial	% 1. ^a d.	% ini.
Acético	70,8	93,1	65,9
Propiónico	100,0	95,0	95,0
Isobutírico	100,0	96,9	96,9
Butírico	99,8	92,5	92,3
Crotónico	100,0	78,8	78,8
2-metil-butírico	94,6	90,2	85,3
Isovaleriánico	100,0	90,8	90,8
Valeriánico	100,0	92,0	92,0
Tíglico	99,4	81,0	80,5
2-metil-valeriánico	97,8	80,5	78,7
4-metil-valeriánico	100,0	81,5	81,5
Caproico	100,0	83,3	83,8
Promedio	96,8	88,0	85,2

DISCUSION

El Poropak Q es un copolímero poroso del estireno-divinilbenno inerte, y, que sirve como soporte del ácido fosfórico, que es el que actúa como fase estacionaria. Por consiguiente, los tiempos de retención de los ácidos grasos volátiles, en principio, son dependientes de sus respectivas temperaturas de ebullición. En las condiciones en que nosotros operamos, se obtienen los tiempos de retención que se indican en la tabla núm. 2, y si se enfrentan a sus respectivas temperaturas de ebullición, se obtiene la gráfica 2, donde puede observarse que, en la serie de los ácidos grasos normales, los tiempos de retención son función de la temperatura de ebullición de los mismos. No ocurre así con los restantes ácidos grasos derivados, bien por ramificación o insaturación pues, en relación a esta función, tiempo de retención/temperatura de ebullición, los ramificados retrasan su salida de la columna, mientras que los insaturados, la adelanta. Esto parece indicar que en la separación cromatográfica, en columna de Poropak, además de influir la temperatura de ebullición del ácido graso, influye también su estructura molecular.

GRAFICA 2



Además de los ácidos incluidos en la tabla 2, se ha ensayado el ácido fórmico y los superiores al caproico, cáprico, caprílico y laúrico. El primero tiene un tiempo de retención de minuto y medio, pero apenas es detectado por ionización de llama, a las concentraciones en que operamos, con los restantes ácidos. Los últimos tienen tiempos de retención mayores que el ácido caproico, aunque en mezcla, en soluciones equimolares, aparecen en el mismo pico. Se prescinde de ellos pues, aunque destilan algo en corriente de vapor, son insolubles en agua y en el destilado, cuando existe, aparecen como sólidos pudiendo separarse por filtración.

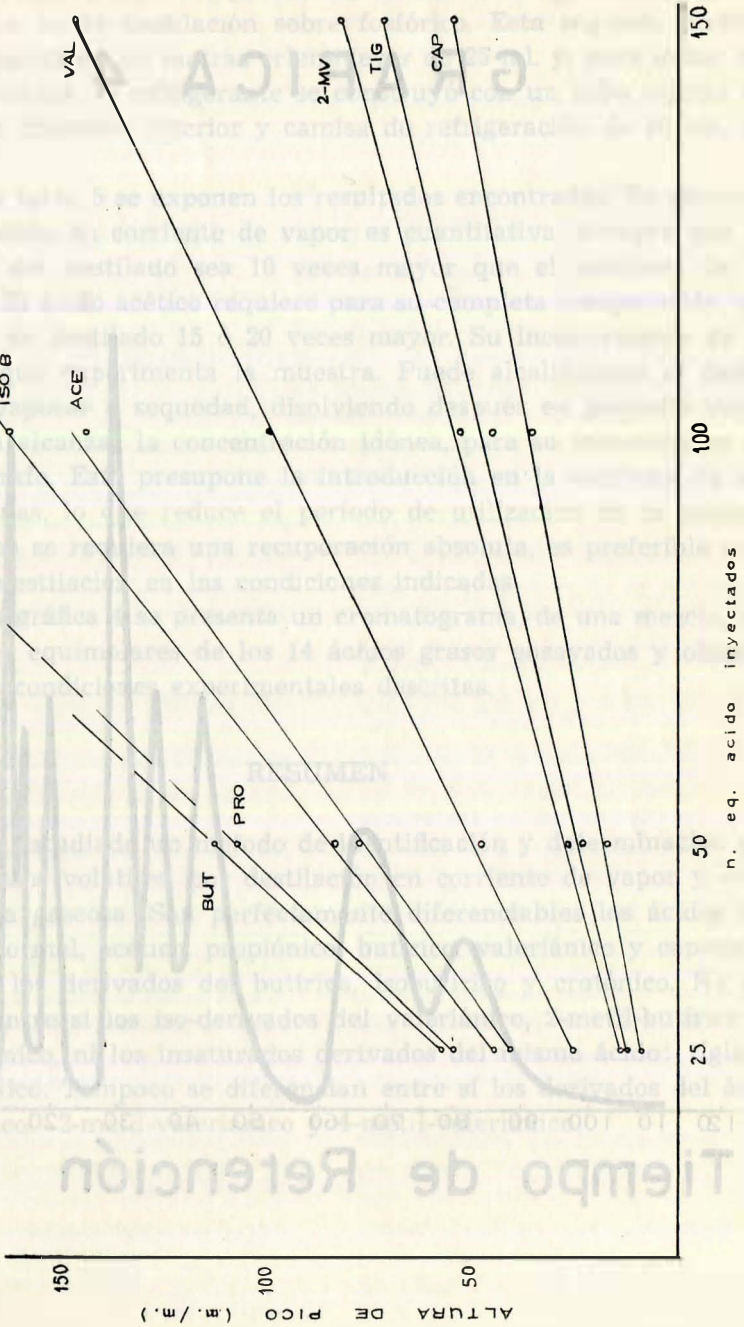
En mezcla equimolar, son perfectamente diferenciables por sus tiempos de retención (tabla 3), el ácido fórmico, acético, isobutírico, butírico, crotónico, valeriánico y caproico, uniéndose en un sólo pico, propionico y acrílico, 2-metil-butírico e isovalerianico, tíglico y etil-acrílico y 2-metil-valeriánico y 4-metil-valeriánico.

En los detectores de ionización de llama, la respuesta (y por consiguiente el área de los picos que aparecen en el cromatograma) es proporcional a lo que se denomina "factor carbono" y que es característico de cada componente, por depender fundamentalmente del número de átomos de carbono susceptibles de oxidación. Es mucho más sencillo para análisis de rutina realizar un calibrado de la cromatografía con patrones conocidos.

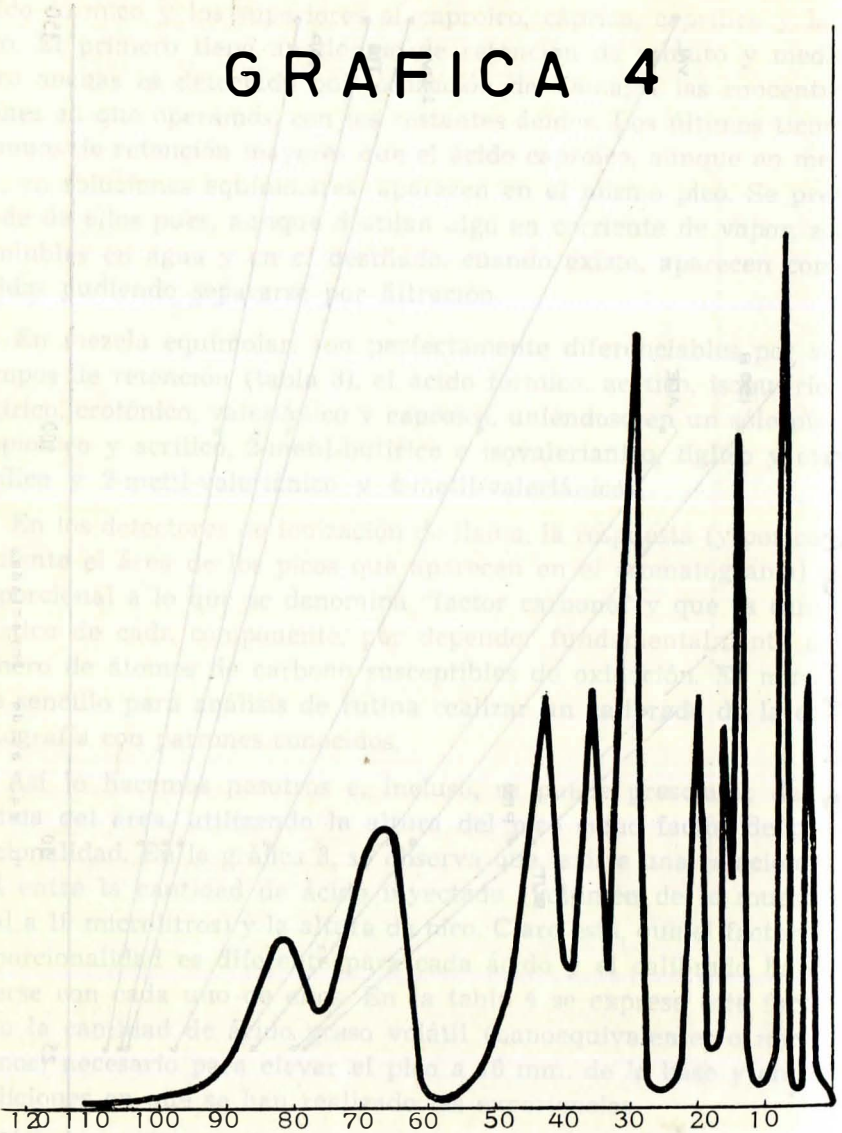
Así lo hacemos nosotros e, incluso, se puede prescindir de la medida del área, utilizando la altura del pico como factor de proporcionalidad. En la gráfica 3, se observa que, existe una relación lineal entre la cantidad de ácido inyectado (volumen de la muestra igual a 10 microlitros) y la altura de pico. Claro está, que el factor de proporcionalidad es diferente para cada ácido y el calibrado ha de hacerse con cada uno de ellos. En la tabla 4 se expresa este factor como la cantidad de ácido graso volátil (nanoequivalentes o microgramos) necesario para elevar el pico a 10 mm. de la base y en las condiciones en que se han realizado las experiencias.

Una vez calibrada la fase cromatográfica del método, se procedió a contrastar la fase de preparación de la muestra por destilación en corriente de vapor. Se partió de 100 microequivalentes de cada ácido en 5 ml de solución acuosa, destilando en el dispositivo de la gráfica 1, hasta obtener 50 ml. de destilado y acidificando la muestra con 1 ml. de ácido fosfórico concentrado.

GRAFICA 3



GRAFICA 4



Tiempo de Retención

De la misma forma se procedió a determinar el porcentaje de recuperación en la destilación sobre fosfórico. Esta segunda destilación se realiza en un matraz erlemmeyer de 25 ml. y, para evitar espacios muertos, el refrigerante se construyó con un tubo capilar de 3 mm. de diámetro interior y camisa de refrigeración de 10 cm. de largo.

En la tabla 5 se exponen los resultados encontrados. En general, la destilación en corriente de vapor es cuantitativa, siempre que el volumen del destilado sea 10 veces mayor que el volumen de la muestra. El ácido acético requiere para su completa recuperación, un volumen de destilado 15 ó 20 veces mayor. Su inconveniente es la dilución que experimenta la muestra. Puede alcalinizarse el destilado y evaporar a sequedad, disolviendo después en pequeño volumen para alcanzar la concentración idónea, para su inyección en el cromatógrafo. Esto presupone la introducción en la columna de sales alcalinas, lo que reduce el período de utilización de la misma. Cuando no se requiera una recuperación absoluta, es preferible una segunda destilación en las condiciones indicadas.

En la gráfica 4 se presenta un cromatograma, de una mezcla, en cantidades equimolares de los 14 ácidos grasos ensayados y obtenido en las condiciones experimentales descritas.

RESUMEN

Se ha estudiado un método de identificación y determinación de ácidos grasos volátiles, por destilación en corriente de vapor y cromatografía gaseosa. Son perfectamente diferenciables los ácidos de la serie normal, acético, propiónico, butírico, valeriánico y caproico, así como los derivados del butírico, isobutírico y crotónico. No se separan entre sí los iso-derivados del valeriánico, 2-metil-butírico e isovaleriánico, ni los insaturados derivados del mismo ácido: tíglico y etilacrílico. Tampoco se diferencian entre sí los derivados del ácido caproico: 2-metil-valeriánico y 4-metil-valeriánico.