

La técnica de inyección por *solvent-flush* en el análisis cuantitativo de ácidos grasos de muy elevada masa molecular por Cromatografía Gaseosa

David Marrero,* Luis González,* Victor L. González,* Abilio Laguna* y Johannes González**

*Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 614 Ciudad de La Habana. **Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de abril de 2002. Aceptado: 1 de junio de 2002.

Palabras clave: ácidos grasos de muy elevada masa molecular, factor másico de respuesta, análisis cuantitativo cromatográfico, Cromatografía Gaseosa. Key words: very long-chain fatty acids, mass response factor, quantitative GC analysis, Gas Chromatography.

RESUMEN. Se considera que la introducción de la muestra es la mayor fuente de error en el análisis cuantitativo por Cromatografía Gaseosa (CG). Ello es debido a diversos fenómenos (entre ellos, la discriminación en la aguja de la jeringuilla), los cuales provocan cambios sustanciales en la composición de la muestra. Estos cambios resultan más apreciables al ser mayor la diferencia de volatilidades entre los componentes de la mezcla a analizar y se revelan en el factor másico de respuesta relativa (f_i^m). Para analizar la influencia de la técnica de inyección sobre el comportamiento cromatográfico de los ácidos grasos en forma de ésteres metílicos se prepararon varias mezclas con patrones de ácidos comúnmente presentes en las ceras vegetales ($C_{24:0}$, $C_{26:0}$, $C_{28:0}$ y $C_{30:0}$). A estas mezclas se les añadió $C_{19:0}$ como patrón interno, se metilaron por catálisis ácida con una disolución de HCl-metanol y se analizaron por CG con detección de ionización por llama. En los análisis se utilizó una columna de vidrio silanizada (3,1 m x 3,0 mm di), rellena con Chromosorb W (HP) de 80 a 100 mallas, impregnado al 3% con OV-101, y se encontró que existe influencia de la velocidad y del tipo de inyección sobre el f_i^m . Al utilizar la técnica de inyección convencional se observó que ocurre un aumento considerable del f_i^m con la disminución de la velocidad de inyección y con el aumento en la longitud de la cadena. Al comparar la técnica convencional con la técnica de *solvent-flush* se observó que esta última permite resultados más precisos y el f_i^m se hace menos dependiente de la masa molecular del ácido, lo que indica una disminución del efecto discriminatorio. En estas condiciones de análisis también se encontró una buena correlación entre las respuestas y las masas inyectadas, al trabajar en un intervalo de 0,5 a 2 μg , dado por coeficientes de correlación mayores de 0,99, y la determinación no presentó sesgo, al estar el cero incluido en los límites de confianza de los interceptos.

ABSTRACT. Sample introduction is considered to be the biggest error source in the Gas Chromatographic (GC) analysis. It is because of several phenomena like discrimination in the syringe needle, which cause substantial changes in sample composition. These changes proved to be more remarkable when differences between volatility of the mixture components are greater, and they are reflected on relative mass response factor (f_i^m). For analyzing the influence of the injection technique on the chromatographic behavior of fatty acid methyl esters, several mixtures of standard acids ($C_{24:0}$, $C_{26:0}$, $C_{28:0}$ and $C_{30:0}$), which are usually present in vegetables waxes, were prepared. The internal standard $C_{19:0}$ was added to each mixture, they were methylated by acid catalysis using a HCl-methanol solution and were analyzed by GC employing a flame ionization detection. A silanized glass column (3.1 m x 3.0 mm id) packed with 3% OV-101 on 80-100 mesh Chromosorb W (HP) was used and it was proved an influence of speed and injection technique on f_i^m . A remarkable increase of f_i^m with decreasing of injection speed and with chain length was observed when conventional injection technique was employed. Solvent-flush proved to give more precise results than conventional injection technique and molecular mass become less dependent on f_i^m , which evidence a decreasing discriminative effect. A good correlation between the responses and the injected masses was also found in the whole studied range, 0.5 - 2 μg , with correlation coefficients > 0.99. The zero was included in the confidence limits of intercepts; therefore, the determination did not present bias.

INTRODUCCION

Los ácidos saturados de muy elevada masa molecular (ASEMM), son constituyentes naturales de las ceras en general^{1,2} y pueden estar presentes en diferentes fluidos biológicos.³⁻⁵ Su determinación por Cromatografía Gaseosa (CG) es una tarea analítica compleja, debido a sus bajas volatilidades, a fenómenos de adsorción que pueden tener lugar en el sistema cromatográfico⁶ y a la dificultad para introducirlos cuantitativamente a la columna,⁷ pues usualmente ocurre un efecto discriminatorio en la introducción con jeringuilla,⁸ principalmente cuando la muestra se introduce manualmente.

Aunque estos problemas no han podido ser completamente eliminados, se ha logrado su disminución mediante la formación de derivados como los ésteres metílicos,⁹ con la utilización de diversos modos de inyección entre los que pudiera citarse el *solvent-flush*, así como con la utilización de diferentes sistemas de introducción.^{10,11} Entre estos últimos se encuentra el sistema *on-column*, que reduce considerablemente la discriminación, pero presenta algunas desventajas instrumentales, así como riesgos de contaminación de la columna, incluso con materiales no volátiles.¹² El grado en que los procedimientos anteriormente señalados logran mejorar el comportamiento cromatográfico de la mezcla está en dependencia de las condiciones experimentales y de

la muestra utilizada, por lo que para poder aplicarlos, se impone el estudio de cada caso en particular.

Al tener lugar los efectos discriminatorios mencionados se afectan directamente los parámetros que permiten evaluar cuantitativamente la composición de la muestra analizada, estos son: la respuesta específica neta, la respuesta relativa y consecuentemente el factor de respuesta.¹³ Teniendo esto en cuenta se evidencia que una vía directa para determinar el grado en que ocurre el cambio en la composición de la muestra es la medición de la respuesta cromatográfica de los analitos de interés. Para el caso de los ASEMM con más de 24 átomos de carbono no existe publicado ningún estudio sobre la influencia que pudiera tener la utilización de distintas técnicas de inyección en CG de relleno sobre el resultado cuantitativo, por lo que los autores se propusieron realizar este estudio mediante la determinación de los factores másicos de respuesta relativa (f_i^m) con mezclas modelos de C_{19:0} a C_{30:0}. La información resultante podría ser aplicable en el desarrollo de métodos para el análisis de estos ácidos en matrices reales como las ceras vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Patrones de ácidos grasos: 1-nonadecanoico (C_{19:0}), 1-tetracosanoico (C_{24:0}), 1-hexacosanoico (C_{26:0}), 1-octacosanoico (C_{28:0}) y 1-triacontanoico (C_{30:0}) (Sigma, MO, USA), todos > 99 % CG. Disolventes: metanol, acetona y tolueno (Merck, Darmstadt, Alemania). Ácido clorhídrico (37 %) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cristalería

Se utilizaron viales de 2 y 4 mL, tubos de vidrio silanizado de 12 mL, todos con tapa y sello inerte, matraz aforado de 50 mL y jeringuilla de 10 µL (Hamilton, Bonaduz, Suiza).

Equipos

Para la preparación de las muestras se empleó un termostato seco provisto de concentrador MultiBlock (LabLine Instruments Inc., IL, USA) y una balanza analítica AG245 (Mettler, Toledo, Suiza), con una exactitud de 0,01 mg.

Análisis cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de gases, con detector de ionización

por llama, modelo GC-14A con procesador computadorizado de datos C-R4A (Shimadzu, Japón). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna de vidrio silanizada (3,1 m x 3,0 mm di), rellena con Chromosorb W (HP) de 80 a 100 mallas, impregnado con OV-101 al 3 %. Las condiciones cromatográficas generales fueron: programación de temperatura de la columna desde 200 a 320 °C a 10 °C/min, e isotérmico por 10 min a la temperatura final. Temperatura del inyector 300 °C (excepto cuando se indique otra) y detector: 320 °C. El flujo del gas portador (argón) fue de 40 mL/min y los flujos de aire e hidrógeno fueron de 300 y 30 mL/min respectivamente. La inyección fue de 1 µL.

Preparación de las muestras

Las mezclas de patrones se prepararon mediante pesada directa (Tabla 1). Posteriormente, se formó el derivado metílico en el vial de pesada mediante catálisis ácida, según González *et al.*¹⁴ Esta técnica consiste en añadir 1 mL de una disolución de HCl al 5 % (v/v) en metanol, cerrar herméticamente el vial y calentar a 80 °C durante 1,5 h. Pasado el tiempo de reacción, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se evapora a sequedad a 80 °C mediante un flujo lento de nitrógeno. La muestra seca se diluye con 1 mL de tolueno para su análisis por CG.

Para la determinación cuantitativa se utilizó al ácido C_{19:0} como patrón interno. El parámetro evaluado fue el f_i^m :

$$f_i^m = \frac{m_i A_r}{A_i m_r}$$

donde:

- A_i área del componente analizado.
- m_i masa del componente analizado (mg).
- A_r área del patrón interno.
- m_r masa del patrón interno (mg).

Efecto de la velocidad de inyección sobre el factor de respuesta

Se realizó la inyección manual de 1 µL de la mezcla 2 (Tabla 1) por

la técnica convencional de aguja llena (n = 2) a cuatro velocidades, en 1, 2, 3 y 4 s. Además, se inyectó esta misma mezcla en 1 s, pero a 45 °C en el inyector. En todos los casos, se calcularon los f_i^m .

Efecto de la inyección solvent-flush sobre la determinación del f_i^m

La mezcla 2 se inyectó por la técnica de inyección convencional y por la de solvent-flush (n = 5), la cual consiste en llenar la aguja con acetona, desplazar el émbolo hasta la marca de 0,2 µL y seguidamente tomar 0,2 µL de aire, 1 µL de la muestra y finalmente, 0,2 µL de aire. En todos los casos, la inyección fue rápida, aproximadamente 1 s, y se determinaron los con sus coeficientes de variación (CV). Posterior a cada inyección realizada por la técnica de solvent-flush, antes de lavar la jeringuilla, se inyectaron 2 µL de tolueno caliente (60 °C). De esta forma, se obtuvo un cromatograma de los componentes que habían quedado retenidos en la jeringuilla. Se sumaron las áreas obtenidas en ambas inyecciones, se volvió a calcular el f_i^m (factor f_A) y se comparó, por la prueba t de Student, con el f_i^m obtenido en la primera inyección.

Estudio de la linealidad y proporcionalidad de la determinación

La linealidad y proporcionalidad se determinaron por el análisis de las mezclas 1 a la 4. Para ello, se calculó la ecuación de regresión de cada ácido por el método de los mínimos cuadrados (A_i/A_r en función de m_i/m_r). Los criterios que se consideraron fueron el coeficiente de correlación (r) y la significación estadística del intercepto, según los intervalos de confianza calculados para p = 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la velocidad de inyección sobre el factor de respuesta

Al realizar la inyección convencional, para todas las velocidades estudiadas, se observó un incremento del f_i^m con el aumento de la masa molecular (M_i) del ácido (Ta-

Tabla 1. Preparación de las muestras.

Mezcla	C _{19:0}	C _{24:0}	C _{26:0} (mg)	C _{28:0}	C _{30:0}
1	1,03	0,53	0,51	0,54	0,55
2	1,04	1,05	1,05	1,05	1,10
3	1,04	1,64	1,56	1,56	1,72
4	1,07	2,23	2,30	2,30	2,17

bla 2). Esto puede deberse fundamentalmente a un efecto discriminatorio en la aguja de la jeringuilla, consistente en que pasan a la columna preferentemente los compuestos más volátiles.^{7,8} Al ser el patrón interno ($C_{19:0}$) el más volátil, es el que pasa a la columna en mayor proporción, por lo que todos los f_i^m son mayores que uno y tienden a aumentar con la M_i del ácido en estudio. Otro factor que pudiera incidir es la adsorción irreversible en el sistema cromatográfico, la que aumenta con el tiempo de retención.¹⁵ Este comportamiento también ha sido descrito para otros compuestos grasos al utilizar temperatura programada en columnas con fase estacionaria impregnada.¹⁶⁻¹⁹

Se aprecia además que la velocidad de la inyección incide sobre el factor de respuesta. Al ser más lenta la inyección aumenta el f_i^m para todos los ácidos estudiados, lo cual indica un aumento del efecto discriminatorio. Este fenómeno pudiera afectar significativamente las determinaciones cuantitativas por lo que la inyección manual se debe realizar con la mayor rapidez posible (aproximadamente 1 s).

Al llevar a cabo la inyección en un segundo, pero con el inyector a 45 °C, los f_i^m obtenidos para los ácidos $C_{24:0}$, $C_{26:0}$, $C_{28:0}$ y $C_{30:0}$ (0,978; 0,998; 1,004 y 1,007; respectivamente) fueron muy cercanos a la unidad. Esto demuestra que el factor determinante en el aumento de los f_i^m es la temperatura a que se somete la aguja, debido a lo cual, ocurre el efecto discriminatorio; no obstante, utili-

zar temperaturas de inyección tan bajas en el análisis rutinario presenta algunas desventajas instrumentales, tales como un mayor tiempo de análisis y, fundamentalmente, riesgos de contaminación de la columna, incluso con materiales no volátiles.¹²

Efecto de la inyección *solvent-flush* sobre la determinación del f_i^m

Con vistas a reducir la influencia de la velocidad de inyección sobre el f_i^m se decidió estudiar el empleo de la técnica de inyección por *solvent-flush*, la cual ha permitido mejorar la precisión y disminuir el efecto discriminatorio en el trabajo con otras mezclas de ácidos grasos.¹¹ Al utilizar dicha técnica, se obtuvieron menores CV y el incremento del f_i^m con el número de átomos de carbono también fue menos perceptible que al emplear la técnica de inyección convencional (Tabla 3). Al comparar los f_i^m calculados de una primera inyección y luego de sumar las áreas obtenidas en dos inyecciones consecutivas, no se observaron diferencias significativas ($t_{exp.} < t_{tab.}$, p

= 0,05), por lo que se infiere que efectivamente ocurrió una disminución del efecto discriminatorio.

Estudio de la linealidad y proporcionalidad de la determinación

Al inyectar las cuatro mezclas mediante la técnica de *solvent-flush* se encontró una buena linealidad del sistema (Tabla 4), dada por coeficientes de correlación superiores a 0,99. El inverso de la pendiente para todos los ácidos fue similar a los f_i^m calculados en los ensayos anteriores; resultado esperado, ya que al ser lineal la correlación, la pendiente calculada en cada punto coincide con la pendiente total de la recta. El término independiente (a) no fue significativo, al quedar incluido el cero en los intervalos de confianza calculados, por lo que no hay sesgo. Teniendo en cuenta este resultado se puede plantear que es posible realizar el análisis de estos ácidos por el método del patrón interno, al utilizar relaciones de masas (masa de analito/masa de patrón interno) entre 0,5 y 2,2.

Tabla 2. Factor másico de respuesta (f_i^m) obtenido para diferentes velocidades de inyección (n = 2).

Tiempo de inyección	f_i^m			
	$C_{24:0}$	$C_{26:0}$	$C_{28:0}$	$C_{30:0}$
1	1,035	1,083	1,112	1,134
2	1,074	1,155	1,161	1,198
3	1,215	1,254	1,283	1,323
4	1,382	1,403	1,481	1,603

Tabla 3. Comportamiento del f_i^m por las dos técnicas de inyección estudiadas (n = 5).

Acidos	Inyección convencional			Inyección <i>solvent-flush</i>					
	\bar{f}_i^m	DE	CV (%)	\bar{f}_i^m	DE	CV (%)	\bar{f}_A	DE	$t_{exp.}$
$C_{24:0}$	1,037	0,017	1,64	1,028	0,005	0,49	1,023	0,009	1,087
$C_{26:0}$	1,074	0,014	1,30	1,046	0,005	0,48	1,041	0,009	1,087
$C_{28:0}$	1,102	0,019	1,72	1,050	0,006	0,57	1,043	0,010	1,346
$C_{30:0}$	1,121	0,018	1,60	1,081	0,008	0,56	1,083	0,016	0,385

$$t_{tab.} (8; 0,05) = 2,306$$

\bar{f}_A : f_i^m calculado al sumar las áreas obtenidas en la primera y en la segunda inyección

Tabla 4. Parámetros de correlación obtenidos (n = 5).

Parámetro	$C_{24:0}$	$C_{26:0}$	$C_{28:0}$	$C_{30:0}$
b (\bar{f}_i^m)	0,99 (1,01)	0,96 (1,04)	0,94 (1,06)	0,93 (1,07)
a ± IC	-0,05 ± 0,11	0,003 ± 0,03	-0,05 ± 0,09	-0,09 ± 0,14
r	0,999 7	0,999 9	0,999 8	0,998 7

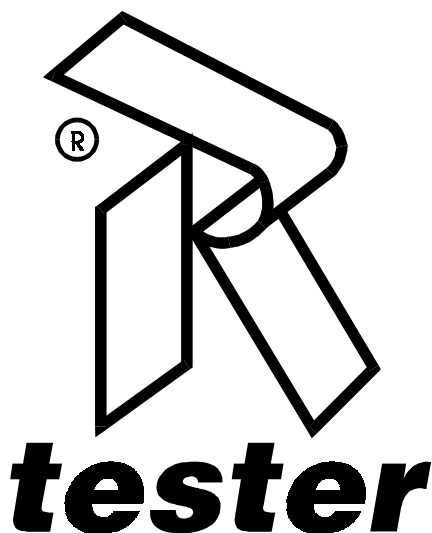
a Intercepto. b Pendiente. r Coeficiente de correlación. IC Intervalo de confianza del intercepto.

CONCLUSIONES

Se demostró que al utilizar la técnica de *solvent-flush* en el análisis cuantitativo de ácidos grasos de muy elevada masa molecular por Cromatografía Gaseosa, se disminuye el efecto discriminatorio, por lo que el factor másico de respuesta relativa se hace menos dependiente de la masa molecular del ácido, así como de la velocidad de inyección. En estas condiciones de análisis, también se obtiene una buena correlación entre las respuestas y las masas inyectadas, al trabajar en un intervalo de relaciones de masas de 0,5 a 2.

BIBLIOGRAFIA

1. Kolattukudy P.E., Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, Elsevier, Amsterdam, 1976.
2. Elias V.O., Simoneit B.R.T., Pereira A.S., Carbal J.A., and Cardoso J.N., **Environ. Sci., Technol.**, **33**, 2369, 1999.
3. Moser A. B., *et al.*, **Ann. Neurol.**, **45**, 100, 1999.
4. Verken P., *et al.*, **J. Chromatogr. B.**, **713**, 281, 1998.
5. Muskiet F.A.J., Van Doormaal J.J., Martini I.A., Wolthers B. G. and Van Der Slik W., **J. Chromatogr. B.**, **278**, 231, 1983.
6. Shantha N.C. and Napolitano G.E., **J. Chromatogr.**, **624**, 37, 1992.
7. Eder K., Reichlmayr-Lais A. and Kirchgessner M., **J. Chromatogr.**, **588**, 265, 1991.
8. Grob K Jr. and Neukom H. P., **J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.**, **2**, 15, 1979.
9. Christie W.W., Gas chromatography and lipids, A Practical Guide, Chapter II, The Oily Press, Ayr, Scotland, 11-42, 1989.
10. Eder K., **J. Chromatogr. B.**, **671**, 113, 1995.
11. Ulberth F. and Scharamel F., **J. Chromatogr.**, **704**, 455, 1995.
12. Watson D.G., Pharmaceutical Analysis, Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited, 1999.
13. Novák J., Quantitative Analysis by Gas Chromatography, Chapter III, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 43-66, 1988.
14. González L., Marrero D. and González J.L., **J. Chromatogr. A**, **888**, 159, 2000.
15. Schomburg G., Husmann H., and Schultz F., **J. Chromatogr. A**, **279**, 259, 1983.
16. Ackman R.G., Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Chapter III, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 47-65, 2000.
17. Carelli A.A. and Cert A., **J. Chromatogr.**, **630**, 213, 1993.
18. González V.L., Sierra R. y Magraner J., **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **30**, 146, 1999.
19. Liu G. and Xin Z., **Chromatographia**, **30**, 267, 1990.



R tester le ofrece servicios especializados en protección contra la corrosión con el fin de elevar la durabilidad, confiabilidad y el tiempo de vida útil de los materiales metálicos o no, de los equipos, sus partes y accesorios, así como de las instalaciones.

SERVICIOS:

- ☑ Evaluación y caracterización de la agresividad corrosiva de la atmósfera y del agua de mar en los lugares de interés.
- ☑ Pronóstico de la resistencia a la corrosión.
- ☑ Ensayos acelerados.
- ☑ Selección de materiales con resistencia óptima a la corrosión.
- ☑ Asesoría técnica y consultoría especializada.
- ☑ Ensayos mediante técnicas electroquímicas de avanzada, seguras y rápidas.
- ☑ Evaluación y certificación de la calidad de materiales metálicos y poliméricos.
- ☑ Evaluación de la calidad del aire para la obtención de licencia ambiental.

