

ANÁLISIS DE MUESTRAS COMPLEJAS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS Y CARBOHIDRATOS MEDIANTE GC-MS

NANCY PÉREZ RODRÍGUEZ* , PERLA ELIZONDO MARTÍNEZ* , BLANCA NÁJERA MARTÍNEZ*

Los ácidos carboxílicos y carbohidratos están presentes en la naturaleza y en productos comerciales que actualmente se encuentran en el mercado.

Las fórmulas comerciales que en su composición contienen una mezcla de estos compuestos son ampliamente utilizados en cosmetología, dermatología¹ y agroquímicos, entre otros, los cuales, por su naturaleza, presentan dificultades para su análisis y cuantificación.

Estas mezclas son el resultado de procesos químicos, como la hidrólisis, o de procesos microbiológicos, como la fermentación de productos naturales;² en ambos casos se obtiene una mezcla compleja, que por provenir de un producto natural no siempre presenta la misma composición química.

Aplicar un método analítico adecuado para caracterizar y cuantificar eficientemente esos productos es de gran utilidad, permite relacionar el proceso con el producto resultante, además de poder certificar su composición química al pretender comercializarlos, ya que sería una garantía de calidad del producto, por consecuencia, la confianza en el uso del mismo.

Actualmente, el uso de técnicas acopladas como la cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas (GC-MS),^{3,11,13} cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC/MS)¹² y la cromatografía de exclusión iónica (IEC),⁴⁻⁷ entre otras, constituyen una herramienta muy poderosa en la caracterización y cuantificación de mezclas de compuestos orgánicos en diferentes matrices.

La cromatografía de gases es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizadas y, en combinación con el detector de espectrometría de masas, constituye una herramienta esencial en el análisis de muestras orgánicas complejas.

Esta técnica (GC-MS) presenta las ventajas de ser sensible y específica en la identificación, confirmación y cuantificación de sustancias, además de ser de uso común en los laboratorios industriales.

En el presente trabajo, desarrollado en conjunto con una empresa privada,⁸ se efectuó el análisis de un hidrolizado de la cáscara de arroz, que contiene dentro de su composición ácidos carboxílicos y carbohidratos, utilizando como técnica analítica la cromatografía de gases capilar acoplada a la espectrometría de masas.

Previo al análisis de la muestra se aplicó una técnica de derivatización, utilizando agentes sililantes, posteriormente los compuestos de interés fueron separados por cromatografía de gases y analizados por espectrometría de masas. Para compensar los efectos de matriz y las variaciones en el volumen de inyección se utilizaron las técnicas de estándar interno y adición de estándar.

Metodología

La metodología utilizada para el análisis de la muestra fue desarrollada en cooperación con la empresa Proquimsa.⁸

Para el análisis se requiere aplicar la técnica

*Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

combinada de adición de estándar-estándar interno con el propósito de compensar los efectos de matriz y variaciones en el volumen de inyección.

Se determinaron los siguientes parámetros estadísticos que definen el alcance y la calidad de los resultados obtenidos bajo las condiciones operativas del método desarrollado:

- Intervalo de trabajo
- Linealidad
- Precisión
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Exactitud

Linealidad del método

Se estableció mediante la determinación de la desviación estándar relativa del conjunto de los factores de calibración promedio (FC), asumiendo linealidad, ya que en todos los casos resultó menor al 20%.

Sensibilidad del método

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las curvas de calibración bajo el siguiente criterio:

- Límite de detección: 3.3 (s del intercepto/pendiente) desviación estándar de la respuesta al origen y la pendiente de la curva de calibración.
- Límite de cuantificación: 10 (s del intercepto/pendiente) desviación estándar de la respuesta al origen y la pendiente de la curva de calibración.

Precisión y exactitud del método

Los intervalos de trabajo se establecieron de manera individual para todos los analitos, los cuales oscilan en un intervalo de concentración entre 0.099 y 2.840% P/V.

La precisión, en función de repetibilidad, expresada como el porcentaje del coeficiente de variación CV, fue menor al 15%, cumpliendo con esta condición en todos los analitos.

La exactitud se determinó como el porcentaje del error, tomándose como el valor esperado la concentración de los estándares de calibración.

Esta información se encuentra publicada en el reporte industrial propiedad de la empresa Proquimsa.⁸

Experimental

Todos los reactivos utilizados fueron marca Sigma-Aldrich (QP).

Materiales y equipo

Material volumétrico común de laboratorio, columna DB-1, longitud 30M x 0.25mm ID, espesor 0.25mm, jeringa de 1mL marca Hamilton, modelo 7001N.

Cromatógrafo de gases marca Varian 3400, acoplado a un detector de masas ITD, Finnigan Mat.

Análisis de la muestra

La técnica combinada utilizada para el análisis de la muestra consiste en la preparación de una solución patrón A y una solución de la muestra B.

Preparación de A

Esta solución se forma al mezclar volúmenes iguales de una solución estándar en piridina de seis ácidos carboxílicos y cinco carbohidratos, a la cual se le agregó ácido malónico y sorbitol, como estándares internos, y otra solución también en piridina, solamente con los estándares internos antes mencionados.

Preparación de B

Consiste de una mezcla de los estándares internos y la muestra del hidrolizado de cáscara de arroz.

Ambas soluciones (A y B), antes de ser analizadas por cromatografía de gases, deben ser derivatizadas.⁹ La técnica que se aplicó en este trabajo fue la de silanización,¹⁰ por ser la más ampliamente utilizada. Se emplearon como agentes derivatizantes el hexametilsilano (HMS) y trimetilclorosilano (TMCS). Este proceso involucra el desplazamiento del hidrógeno ácido de los ácidos carboxílicos y carbohidratos por un grupo silano, facilitando así el diagnóstico de los compuestos al ser analizados por espectrometría de masas, además de reducir las interacciones entre la columna y los compuestos a analizar, mejorar la simetría de los picos, disminuir la polaridad de los grupos funcionales e incrementar la volatilidad.

Una vez derivatizadas las soluciones, fueron inyectadas al cromatógrafo y analizadas bajo las con-

diciones óptimas de operación (como se muestra en la tabla I), obteniéndose una separación completa.

De los datos experimentales obtenidos por cromatografía se calcularon los factores de respuesta de cada uno de los compuestos, relacionando la altura de cada pico con el estándar interno para determinar las concentraciones de los analitos presentes en la muestra.

Resultados y discusión

La concentración de cada uno de los compuestos en la solución patrón se estableció en base a las concentraciones esperadas de los analitos en la muestra, de acuerdo con el análisis previo realizado por Proquimsa.⁸

La separación de los seis ácidos carboxílicos, cinco carbohidratos y dos estándares internos se logró bajo las condiciones óptimas de operación, mismas que se muestran en la tabla I.

Al ser comparados los cromatogramas de los estándares puros con los del hidrolizado de la cáscara de arroz, se observó la influencia de la matriz, por lo que fue necesario mezclarlos con la muestra antes de ser derivatizados.

El análisis cromatográfico mostró una separación completa de todos los picos generados por los ácidos carboxílicos y carbohidratos en menos de 32 minutos. Los tiempos de retención son mostrados en la tabla II.

Para comprobar la separación de cada uno de los componentes se usaron los espectros de masas de la biblioteca NBS con el método TIC (Tentatively Identified Compound).

Para la identificación de ácido glicólico, ácido glicérico, ácido glutárico, arabinosa, xilosa, ácido xilárico, manosa, galactosa y glucosa se utilizaron estándares; y para el ácido xilónico y ácido arabónico se utilizó la biblioteca NBS con TIC (Tentatively Identified Compound), comparando los espectros de masas obtenidos. En la figura 1 se muestra el espectro de masas del ácido xilárico, uno de los compuestos analizados.

El análisis del hidrolizado de la cáscara de arroz se realizó cinco veces (N=5), los resultados se muestran en la tabla III.

En los cromatogramas obtenidos de la muestra no se observaron las señales correspondientes a los ácidos xilónico y arabónico, por lo que se asume que su concentración se encuentra por debajo de 0.01% P/V, de acuerdo a los estándares prepara-

Tabla I. Condiciones de operación del GC/MS

Cromatógrafo de gases	Varian 3400
Detector	Finnigan Mat ITD
Columna	DB-1 (30m x 0.25mm ID., 0.25 mm)
Temperatura del inyector	260°C
Split	50:1
Programa de temperatura	60°C por 1 min, 60°C-110°C a 6°C/min, 110°C-260°C a 10°C/min
Tiempo de corrida	24 minutos
Gas acarreador	Helio
Velocidad de flujo	34cm/seg
Volumen de inyección	1mL
Intervalo de masas	30-550m/z

Tabla II. Tiempos de retención de los seis ácidos carboxílicos, cinco carbohidratos y dos estándares internos.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)
Ácido glicólico	8:42
Ácido glicérico	14:50
Ácido glutárico	15:47
Arabinosa	20:04
Xilosa	21:10
Ácido xilónico	21:15
Ácido arabónico	21:27
Ácido xilárico	21:53
Manosa	22:22
Galactosa	22:51
Glucosa	23:36

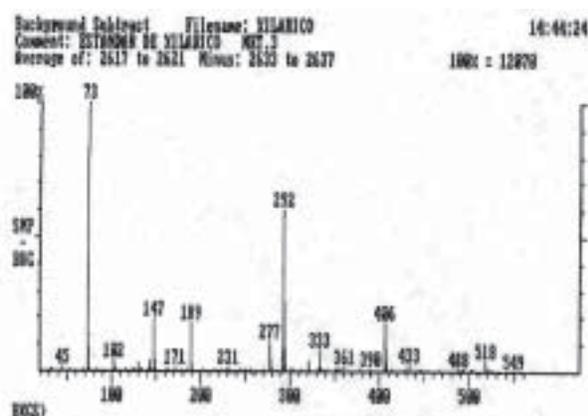


Fig. 1. Espectro de masas del ácido xilónico.

dos. El resto de los ácidos carboxílicos y carbohidratos fueron identificados y cuantificados, encontrándose en un intervalo de concentración de 0.099 a 2.840% P/V.

En todos los casos se cumple con la condición de linealidad, ya que la desviación estándar relativa del conjunto de los factores de calibración, en el intervalo de trabajo, es menor al 20%, según los criterios de aceptación establecidos por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (US

EPA). El mínimo valor obtenido fue 0.81 para la glucosa, y el máximo valor de 10.58 para la xilosa, por lo que, de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla III, se cumple con este criterio.

Conclusiones

El análisis previo, realizado en conjunto con la empresa Proquimsa, sirvió de base para establecer la concentración de cada uno de los compuestos en la solución patrón

La técnica de silanización, como tratamiento previo de las soluciones A y B, fue rápida y efectiva, ya que en menos de cinco minutos se obtienen los derivados silanizados listos para ser inyectados en el cromatógrafo de gases.

Por las ventajas de sensibilidad y especificidad que presenta la técnica acoplada de GC/MS, las cuales se reflejan en los resultados obtenidos para los diferentes compuestos, se propone utilizarlo como método de análisis para mezclas de ácidos carboxílicos y carbohidratos. Esta técnica la utiliza actualmente Proquimsa.

Resumen

Los ácidos α -hidroxicarboxílicos y carbohidratos son compuestos que se encuentran en la naturaleza, o que se pueden generar durante procesos como la hidrólisis o fermentación de productos de origen natural. En este trabajo se presenta un método para el análisis de seis ácidos carboxílicos y cinco carbohidratos en un hidrolizado de cáscara de arroz, mediante cromatografía de gases capilar con detector de espectrometría de masas (GC/MS). Se establecieron las condiciones óptimas de operación del equipo para una separación completa de los compuestos en el menor tiempo posible, permitiéndonos su cuantificación mediante la técnica de adición de estándar-estándar interno. Los estándares y muestra fueron derivatizados para poder ser analizados por GC/MS, se obtuvieron concentraciones que fluctúan entre los 0.099 y 2.84% P/V.

Palabras clave: Ácidos Carboxílicos, Carbohidratos, Silanización, Cáscara de arroz, GC/MS.

Abstract

The α -hydroxyl carboxylic acid and carbohydrates are chemical compounds which can be normally

Tabla III. Resultados del análisis del hidrolizado de cáscara de arroz.

Compuesto	Concentración (% P/V)	Desviación estándar relativa
*LC del 95% para N=5		
Ácido glicólico	0.099±0.006	0.0054
Ácido glicérico	0.11±0.02	0.0191
Ácido glutámico	0.27±0.05	0.0473
Arabinosa	0.60±0.08	0.0707
Xilosa	2.84±0.13	0.1058
Ácido xilónico	< 0.01	—
Ácido arábónico	< 0.01	—
Ácido xilárico	0.42±0.06	0.0566
Manosa	0.300±0.016	0.0141
Galactosa	0.54±0.05	0.0448
Glucosa	1.009±0.009	0.0081

* LC Limite de confianza para N=5

found in natural products, or generated through processes such as the hydrolysis or fermentation of natural products. This work presents an analytical method for carboxylic acid and carbohydrates on rice peel via Capillary Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry (GC/MS). Optimal GC/MS operational conditions were established for a complete compound separation in the least possible time, allowing quantitative measurements using the standard addition-internal technique. The standards and samples were analyzed by GC/MS and the results are presented, following the analytical technique developed.

Keywords: α -Carboxylic acids, Carbohydrates, Silylation, Peel rice, GC/MS.

Referencias

1. Yu, R.J. and Van Scott, E.J. Alpha-hydroxy acids: Science and therapeutic use. *Cosmetic Dermatology* (Oct. Suppl.); (1994) 12-20.
2. Analysis of Kombucha Ferments: Report on Growers. <http://w3.trib.com/~kombu/FAO/mroussin2toc.html>.
3. Yasushi Ehara and Kazuhiko Sakamoto. Purge and Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Carboxylic Acids by Esterification. *Analytical Sciences*, March 2000, Vol.16.
4. Bipp, H.P., Fisher, K., Bieniek, D., Kettrup, A. Application of ion exclusion chromatography (IEC) for the determination of sugar and carboxylic acids in hydrolysates from carbohydrate containing residues. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 321-325 (1997).
5. Isher, K., Chodura, A., Kotalik, J., Bieniek, D., Kettrup, A. Analysis of aliphatic carboxylic acids and amino acids in effluents of landfills, composition plants and fermentation plants by ion-exclusion and ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 770, 229-241 (1997).
6. Ewa Dabek, Katherine Keppel Jones. The Analysis of Low Molecular Weight Carboxylic Acids by CE with Indirect UV Detection. *LC-GC* 18(9), 950-967, (2000).
7. Mongay, C., Pastor, A., Olmos, C. Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion exchange chromatography. *J. Chromatog.* 736(1-2), 351357, (1996).
8. Proquimsa. Reporte Técnico Industrial.2002
9. Karl, Blau and John M. Hlket. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester, 1993; pp. 4-8
10. Pierce A.E. *Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Co., Rockford. Ill, 1968.
11. *Gas Chromatography: Gary A. Eiceman**, Jorge Gardea-Torresdey, Ed Overton and Kenneth Carney, *Anal. Chem.*2002, 74,2771-2780
12. *Column Liquid Chromatography: Equipment and Instrumentation: William R. LaCourse*, *Anal. Chem.*2002, 74,2813-2832
13. Automated derivatization instrument: Preparation of alditol acetates for analysis of bacterial carbohydrates using gas chromatography/mass spectrometry Steinberg, Paul, Fox, Alvin. *Analytical Chemistry*. Washington: May 1, 1999. Vol. 71. Iss 9; pp. 1914-1917.