

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE METILÉSTERES DE ÁCIDOS.**

**JUAN PABLO LÓPEZ VALENCIA**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE TECNOLOGIA QUÍMICA  
PEREIRA  
2008**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE METILÉSTERES DE ÁCIDOS.**

**JUAN PABLO LÓPEZ VALENCIA**

**TRABAJO DE GRADO**  
**Requisito final para optar al título de tecnólogo químico**

**Director:**  
**JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**  
**PEREIRA**  
**2008**

**NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO  
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE METILÉSTERES DE ÁCIDOS.**

**Presentado por:**

**JUAN PABLO LÓPEZ VALENCIA**

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de \_\_\_\_\_

Con la connotación: \_\_\_\_\_

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

**Director:**  
**Juan Pablo Arrubla Vélez** \_\_\_\_\_

**Jurado:**  
**Firma:** \_\_\_\_\_

**Jurado:**  
**Firma:** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

- Agradezco a mi familia por todo el apoyo y su cariño incondicional que me han dado siempre, especialmente durante mis estudios, el cual ha sido de gran ayuda.
- Agradezco al profesor José Hipólito Isaza, por permitirme utilizar el cromatógrafo de gases del laboratorio de CPN, y a Hugo y Milena que con mucha paciencia me enseñaron como operarlo.
- A todos los profesores que me dieron clase durante mis estudios de tecnología química, por sus enseñanzas y por su calidad como personas.
- A mis amigos que hicieron más amena la estadía en la universidad.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	9
<b>RESUMEN</b>	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	12
<b>OBJETIVOS</b>	14
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	15
<b>1.1 ESTANDARIZACIÓN</b>	15
1.1.1 Linealidad y rango	16
1.1.2 Precisión	17
1.1.3 Exactitud	18
1.1.4 Limite de detección	19
1.1.5 Limite de cuantificación	19
1.1.5.1 Método basado en la relación señal/ruido	20
1.1.5.2 Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado	20
1.1.5.3 Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero	20
1.1.6 Sensibilidad	20
<b>1.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>	21
1.2.1 Ventajas	21

1.2.2 Limitaciones de la CG	22
1.2.3 Instrumentos para la cromatografía gas	23
1.2.3.1 Gas portador	24
1.2.3.2 Sistema de inyección de muestra	24
1.2.3.3 Configuración de la columna y del horno de la columna	24
1.2.3.4 Sistemas de detección	25
1.2.3.4.1 Detector de ionización de llama (DIL)	25
1.2.3.4.2 Detector de conductividad térmica (DCT)	25
1.2.3.4.3 Detector de captura de electrones (DCE)	26
1.2.4 Acoplamiento de la cromatografía de gases con métodos espectroscópicos	26
1.2.5 Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)	26
<b>1.3 ESPECTROMETRIA DE MASAS MOLECULAR (EM)</b>	<b>28</b>
1.3.1 Impacto electrónico (IE)	28
1.3.2 Ionización química (IQ)	29
1.3.3 Ión Molecular	29
1.3.4 La regla de nitrógeno	30
1.3.5 Pérdidas lógicas neutras	30
1.3.6 Espectrometría de masas de metilésteres	30
<b>1.4 METODOS DE EXTRACCION</b>	<b>32</b>
1.4.1 Extracción Soxhlet	32
<b>1.5 DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS</b>	<b>32</b>
1.5.1 Esterificación y trans-esterificación catalizada por ácido	33

<b>2. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
<b>2.1 MUESTRAS DE ANÁLISIS</b>	<b>35</b>
<b>2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b>	<b>35</b>
<b>2.3 EXTRACCIÓN</b>	<b>35</b>
<b>2.4 ESTERIFICACIÓN DE LA MUESTRA</b>	<b>35</b>
<b>2.5 ESTÁNDAR</b>	<b>35</b>
2.5.1 Patrones	37
<b>2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO</b>	<b>37</b>
2.6.1 Scan	37
2.6.2 Curvas de calibración	40
2.6.3 Análisis de muestra	40
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>3.1 SCAN</b>	<b>41</b>
<b>3.2 CALIBRACIÓN</b>	<b>46</b>
<b>3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</b>	<b>53</b>
<b>3.4 ANÁLISIS DE MUESTRA REAL</b>	<b>57</b>
<b>3.5 INTERFERENCIAS</b>	<b>58</b>
<b>3.6 TIEMPO Y COSTOS DEL ANÁLISIS</b>	<b>59</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla No. 1:</b> Composición del estándar de mezcla de metilesteres marca RESTEK código 35078.	36
<b>Tabla No. 2:</b> Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).	38
<b>Tabla No. 3:</b> Programación del horno para el método de ionización química positiva (IQ).	39
<b>Tabla No. 4:</b> Compuestos identificados por el scan con método IE.	41
<b>Tabla No. 5:</b> Compuestos identificados por IQ.	44
<b>Tabla No. 6:</b> Concentraciones de cada nivel inyectado.	46
<b>Tabla No. 7:</b> Datos estadísticos para la calibración por el modo IE.	54
<b>Tabla No. 8:</b> Datos estadísticos para la calibración por el modo IQ.	56
<b>Tabla No. 9:</b> Porcentaje de ácidos grasos en la muestra real (aceite de crisálida)	58
<b>Tabla No. 10:</b> Presupuesto para el análisis de una muestra.	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura No. 1:</b> Estudios en los que se divide la precisión.	18
<b>Figura No. 2:</b> Diagrama de un sistema de cromatografía gas-liquido.	23
<b>Figura No. 3:</b> Esquema de fragmentación por IE dando como resultado el ión $[M - 31]^+$ .	31
<b>Figura No. 4:</b> Rearreglo de McLaffety resultando el ión de peso molecular 74.	31
<b>Figura No. 5:</b> Diagrama de extracción del aceite usando el método Soxhlet.	32
<b>Figura No. 6:</b> Esterificación de ácidos grasos con catálisis acida.	33
<b>Figura No. 7:</b> Trans-Esterificación de lípidos por catálisis acida.	33
<b>Figura No. 8:</b> Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).	38
<b>Figura No. 9:</b> Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).	39
<b>Figura No. 10:</b> Cromatógrama total de iones del patrón de 500 ppm por el método IE.	41
<b>Figura No. 11:</b> Espectro de masas por IE del metil estearato.	42
<b>Figura No. 12:</b> Espectro de masas por IE del metil palmitoleato.	43
<b>Figura No. 13:</b> Cromatógrama total de iones del patrón de 500 ppm por el método de IQ.	43
<b>Figura No. 14:</b> Espectro de masas del metil oleato obtenido por IQ.	45
<b>Figura No. 15:</b> Esquema de fragmentación por IQ dando como resultado el ión $[M - 31]^+$ .	45

<b>Figura No. 16:</b> Espectro de masas del metil undecanoato obtenido por IQ.	46
<b>Figura No. 17:</b> Curvas de calibración de los compuestos identificados por IE	47
<b>Figura No. 18:</b> Curvas de calibración de los compuestos identificados por IQ.	50
<b>Figura No. 19:</b> Cromatógrama total de iones del aceite de crisálida de gusano de seda previamente esterificado.	57

## RESUMEN

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es la herramienta más empleada y poderosa para el análisis de lípidos, por exactitud, sensibilidad y reproducibilidad.

Se estandarizó la técnica de cromatografía acoplada a espectrometría de masas usando los modos de ionización por impacto electrónico (IE) y por ionización química (IQ) para el análisis de metilesteres de ácidos grasos calculando los parámetros estadísticos necesarios para esto, como lo son la precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, sensibilidad y límite de linealidad; logrando valores aceptables de estas medidas, indicando que la técnica muestra concordancia entre análisis.

Como muestra real se utilizó el aceite de crisálida de gusano de seda *Bombix mori híbrido pilamo 1* procedente del corregimiento de Santa Rosa en el municipio de Buga en el Valle del Cauca, el cual fue analizado después de que la técnica estuvo estandarizada y que el aceite fue derivatizado, obteniendo como ácidos mayoritarios al ácido palmítico y el ácido oleico con 26,300% y 43,752% respectivamente.

## JUSTIFICACIÓN

La estandarización es un procedimiento estadístico que consiste en verificar y documentar, que exista un alto grado de seguridad en la obtención de resultados que deberían ser precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos<sup>[1]</sup>

Se realizan millones de análisis diariamente en el mundo en los ámbitos más variados: productos manufacturados, naturales, medioambientales, químicos y físicos. En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La estandarización de metodologías analíticas permite conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que le confiere un grado elevado de comparación entre resultados<sup>[2]</sup>.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se basa en la separación de compuestos volátiles dependiendo de sus puntos de ebullición. Al llegar al detector, las moléculas del analito son bombardeadas por electrones, rompiendo enlaces (en ocasiones no necesariamente) y formando fragmentos más estables.

La cromatografía de gases se ha convertido en la herramienta más empleada en la separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos (Fatty Acids Metil Esters, FAMES por sus siglas en ingles); cuya exactitud esta limitada por la complejidad del proceso de calibración, la pureza de las sustancias empeladas como estándares y la imposibilidad de identificar los compuestos en la muestras<sup>[3-5]</sup>.

La oleoquímica es la rama de las industrias químicas encargada de estudiar la composición fisicoquímica de los aceites y grasas. Globalmente ha tomado fuerza la utilidad de los derivados de estas sustancias para reemplazar productos petroquímicos utilizados en las industrias químicas (cosméticos, limpieza, alimentos, combustibles, etc.) con el beneficio de proceder de recursos naturales renovables y ser muy biodegradables<sup>[6]</sup>.

La industria oleoquímica en Colombia es aun muy joven, como lo establece una producción de 32.071 toneladas (t), con importaciones de 27.089 t y exportaciones de 3.195 t para el año 2002<sup>[7]</sup>.

En la Universidad Tecnológica de Pereira, escuela de química, se ha conformado un grupo de investigación en oleoquímica, con el objeto de estudiar la posible utilización de los productos y subproductos de la sericultura y otras ramas de la oleoquímica<sup>[8]</sup>.

La estandarización se hace el fin de disponer de una técnica analítica moderna para apoyar las investigaciones del grupo de investigación de oleoquímica en el campo de la sericultura, oleorresinas y bio-combustibles.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Estandarizar la técnica cromatográfica (gas-liquido), con columna capilar y detector de espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos grasos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener en forma experimental y para las condiciones del laboratorio los valores de los parámetros: precisión, linealidad, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y correlación lineal que sirvan como criterio de confianza para que una vez montado el método analítico pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.
- Fortalecer los trabajos de investigación en el análisis de subproductos obtenidos de la industria serícola y obtener o complementar la información existente en lo relacionado con: interferencias, tiempo y costos del análisis.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 ESTANDARIZACIÓN

Estandarizar un método de análisis consiste en verificar y documentar, que este conduzca con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos<sup>[1]</sup>.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo mas o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses)<sup>[9]</sup>.

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en el mundo en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, naturales, análisis medioambientales, clínicos, forenses, químicos y físicos. En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La estandarización de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad permite conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.

Desde la vertiente económica, los costos asociados al proceso analítico suelen ser elevados y surgen costos adicionales ligados a las decisiones que se toman sobre la base de los resultados obtenidos. No se puede dar el lujo, por ejemplo, de que se devuelvan un lote de producto expedido en función de unos resultados analíticos que erróneamente expresaban conformidad a la normatividad vigente. Una correcta estandarización del método debería haber detectado la presencia de error en los resultados emitidos.

Los requisitos analíticos para un uso determinado establecen los parámetros o criterios de calidad del método a utilizar para resolver el problema. Estos criterios de calidad, llamados "*performance characteristics*" o "*figures of merit*" en inglés, pueden ser de tipo estadístico. En estos figuran los parámetros fundamentales de exactitud (relacionados con la trazabilidad) y precisión (relacionados con la incertidumbre) y los secundarios de selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación.

Muchos analistas consideran que un método estándar o de referencia, que ha sido estandarizado por algún organismo que posee una cierta reputación, puede aplicarse directamente el laboratorio. La estandarización de los métodos ya

realizada se considera, erróneamente, una garantía suficiente para obtener resultados de calidad.

Siguiendo un método previamente estandarizado se pueden alcanzar buenos resultados pero hace falta demostrar que funcionan en nuestro ámbito de trabajo. Por tanto, un método siempre debe estandarizarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecuan al problema analítico particular que se debe resolver en el laboratorio <sup>[2]</sup>.

De acuerdo al método de ensayo que se este estandarizando; volumétrico, gravimétrico, instrumental, se debe establecer una metodología específica para encontrar los parámetros que se quieran.

### **1.1.1 Linealidad y Rango.**

La linealidad es la capacidad del método de proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del rango establecido.

Siempre que sea posible se buscara respuesta del tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. Por ejemplo en algunos procedimientos como en los como en los inmunoensayos la respuesta del método no suele ser lineal pero si proporcional a la concentración. En estos casos son validos otros ajustes matemáticos.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los limites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones <sup>[1]</sup>.

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 4 niveles de concentración. Estadísticamente lo correcto seria analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio practico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja en niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas <sup>[1]</sup>.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las concentraciones  $x$  y la respuesta  $y$ . La relación entre ambas variables se

expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y = bx + a$ , obtenida por un método de ajuste.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena.

En la recta de regresión  $y = bx + a$ ,  $x$  es la concentración,  $y$  la respuesta,  $b$  el valor de la pendiente y,  $a$  el término independiente.

La pendiente  $b$  se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente  $a$ , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de las ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) nos indica el grado de relación entre la variable  $x$  (concentración), y la variable  $y$  (respuesta). Su valor máximo es 1, si  $r$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0,999$ , aunque en el caso de impurezas se admite  $\geq 0,990$ <sup>[1]</sup>.

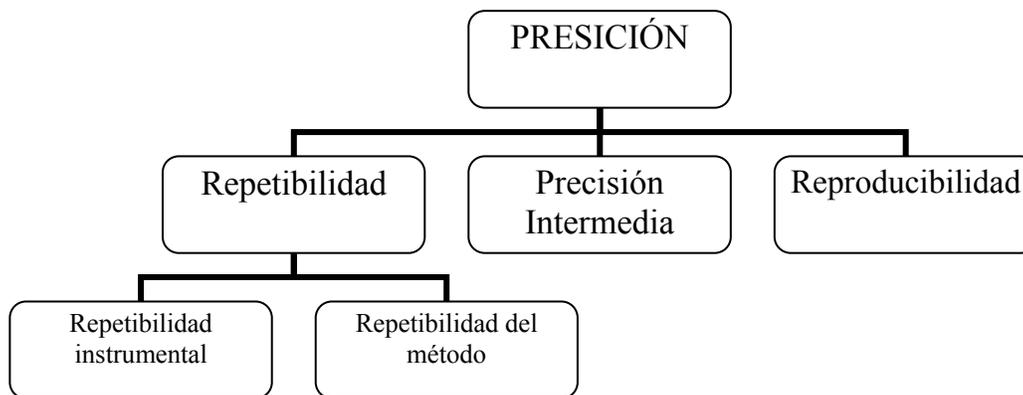
### 1.1.2 Precisión.

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma homogénea en las condiciones prescritas<sup>[1]</sup>. Usualmente se expresa en términos de la DESVIACIÓN ESTÁNDAR (SD). Otra forma de expresar la precisión es la Desviación Estándar Relativa (RSD) o COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)<sup>[9]</sup>.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el mas-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) De aquí la importancia del estudio de la precisión<sup>[1]</sup>.

En la figura 1 se muestra los diferentes tipos de resultados que engloba la precisión.



**Figura 1.** Estudios en los que se divide la precisión.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más influye en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.

La repetibilidad instrumental estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces.

El ensayo de la repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

El objetivo del estudio de la reproducibilidad es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios <sup>[1]</sup>.

Los resultados de la repetibilidad instrumental dependen del instrumento, por ejemplo no se puede obtener el mismo coeficiente de variación con un equipo con inyección automática que con inyección manual.

Cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad del método aumente.

### 1.1.3 Exactitud.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De esta definición surge el problema de saber cual es el valor verdadero. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo.

La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza<sup>[1]</sup>.

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en algunas muestras de matrices complejas solo se obtienen valores del 50, 80 o 90%. En estos casos es importante que aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces puede intentar aplicarse un factor de corrección.<sup>[1]</sup>

La desviación de la exactitud por exceso se produce cuando existen interferencias y la selectividad del método no es la adecuada, entonces se obtienen resultados superiores al valor verdadero. En este caso, si es posible, se debería modificar las condiciones del método para optimizar la selectividad o bien cambiar a otro alternativo que sea selectivo. La desviación de la exactitud por defecto suele producirse cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos obteniéndose recuperaciones mas bajas. Cuando esto ocurre seria conveniente intentar optimizar la preparación de la muestra para mejorar el factor de recuperación<sup>[1]</sup>.

#### **1.1.4 Limite de Detección (LD).**

La mayoría de criterios coinciden en que el límite de detección se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales<sup>[1]</sup>.

El límite de detección es un término solo cualitativo. No debe confundirse este término con otro al que normalmente se asocia, la sensibilidad, ya que esta es la capacidad de un método de análisis para discriminar pequeñas diferencias en concentración o masa del analito. Una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de detección, ya que lo que definiría este límite es la relación entre el ruido y la señal debida al analito<sup>[1]</sup>.

#### **1.1.5 Limite de Cuantificación (LC).**

Se entiende por límite de cuantificación de un método, a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

El limite de cuantificación es un termino cuantitativo, encontrándose entre este y el limite de detección un rango de concentraciones en el que si bien no puede

cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos <sup>[1]</sup>.

Hay muy diversos métodos de análisis y equipos instrumentales, dependiendo de cada uno se elegirá el método para hallar tanto el límite de detección como el de cuantificación, en los siguientes párrafos se mencionaran algunos métodos para hallarlos.

#### **1.1.5.1 Método Basado en la Relación Señal/Ruido.**

Este es uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración de cero analito (cromatografía de gases o líquida, espectrofotometría UV-visible)

Este procedimiento presenta la desventaja de que en numerosas ocasiones al llevar a cabo la comprobación experimental del LC calculado, se observa que es posible obtener resultados igualmente precisos y exactos aun cuando se desciende mas en la concentración limite <sup>[1]</sup>.

#### **1.1.5.2 Método Basado en la Desviación Estándar de la Respuesta del Blanco y la Pendiente de la Recta de Calibrado.**

De acuerdo con la IUPAC, puede calcularse el LD y LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra y la pendiente de la recta de calibrado del analito.

La expresión a aplicar para este cálculo varía en función de si el método instrumental empleado corrige la señal frente a un blanco (métodos espectrofotométricos) o no (métodos cromatográficos) <sup>[1]</sup>.

#### **1.1.5.3 Método Basado en la Extrapolación de la Recta de Calibrado a concentración Cero.**

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el calculo, en ocasiones costoso en tiempo, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Utilizando como en el anterior la pendiente de la recta de calibrado, pero en este caso sustituye el valor real de un blanco, por la extrapolación de dicha recta <sup>[1]</sup>.

#### **1.1.6 Sensibilidad.**

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración <sup>[9]</sup>. En contraste con el limite de detección, la sensibilidad de un método esta definida como la habilidad para distinguir entre diferentes concentraciones. Para métodos donde la respuesta con respecto a la concentración es una función lineal, la sensibilidad es constante con respecto a la concentración y es igual a la pendiente de la curva de calibración.

Contrariamente a las funciones lineales, la sensibilidad de métodos cuando su respuesta es no-lineal cambia con la concentración del analito <sup>[10]</sup>.

## 1.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Es difícil imaginar un laboratorio de analítico orgánico sin un cromatógrafo de gases. En muy poco tiempo la cromatografía de gases, se ha convertido en la técnica principal para la separación y análisis de compuestos volátiles. Ha sido usada para analizar gases, líquidos y sólidos (este último usualmente se disuelven en solventes volátiles). Tanto material orgánico como inorgánico pueden ser analizados, y el peso molecular puede estar en un rango de 2 hasta 1.000 Daltons. Los cromatógrafos de gases, son los instrumentos de análisis más usados en el mundo. Las columnas capilares eficientes proporcionan alta resolución, separando más de 450 componentes en el aroma del café. Detectores sensibles como el detector de ionización de llama el cual puede cuantificar hasta concentraciones de 50 ppb de componentes orgánicos con una desviación estándar relativa de 5% <sup>[11]</sup>.

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra en dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada apretadamente dentro de una columna. Esta es la fase estacionaria y puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase consiste en un gas o un líquido que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. Esta fase se denomina fase móvil <sup>[12]</sup>. En el caso de la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas inerte, su separación se basa en las diferencias en los puntos de ebullición y la temperatura de la columna.

En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas transportador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Los adsorbentes, tales como carbón vegetal, gel de sílice y tamices moleculares, son las fases estacionarias en la CG de fase sólida. Esta se utiliza principalmente para la separación de gases ligeros. Los líquidos orgánicos de alto punto de ebullición constituyen la fase estacionaria de la CG de fase líquida. La fase líquida se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado *soporte sólido*. La base para la separación es la partición de la muestra dentro o fuera de esta película líquida. Si se puede encontrar una fase líquida que tenga solubilidad selectiva para dos compuestos, entonces estos dos pueden separarse mediante cromatografía de gases. La CG de fase líquida es la forma más selectiva de la cromatografía y la que se presta a mayores usos <sup>[12]</sup>.

En la cromatografía de gases se emplea el procedimiento de *elusión*; la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente. Esta técnica tiene la ventaja de que los picos de la muestra están rodeados por un gas transportador puro y cuando se concluye el análisis, la columna queda lista para otra muestra.

### 1.2.1 Ventajas.

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son: alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos.

**Alta Resolución:** La CG puede generar miles de platos teóricos en unos pocos minutos. Los isómeros con puntos de ebullición muy próximos que no pueden

separarse por destilación se separan fácilmente mediante la cromatografía de gases.

Además la CG se presta a usos mas variados que la mejor columna de destilación, ya que la columna cromatográfica puede sustituirse fácilmente. Esto permite la separación selectiva debido a solubilidades diferentes, aun cuando los puntos de ebullición estén muy cercanos. Como hay numerosas columnas, se puede escoger entre ellas, lo que confiere variedad a la gama de muestras que pueden manejarse.

Velocidad: Normalmente, el análisis por CG tarda unos minutos; muchas separaciones útiles se completan en 10 minutos. Con altas presiones se han terminado análisis completos en apenas unos segundos. Sin embargo, en la mayoría de los análisis de laboratorio este ahorro en tiempo no reduce apreciablemente el tiempo total involucrado en la toma de la muestra, el análisis cromatográfico y el cálculo de los resultados. En consecuencia no se ha destacado mucho la rapidez de estos análisis. Basta señalar que la CG permite lograr rápidamente buenos datos analíticos.

Sensibilidad: Una de las razones principales por las que se usa ampliamente la CG en los análisis es la sensibilidad conseguida. El detector de conductividad térmica puede fácilmente medir microgramos. El detector de ionización de llama fácilmente mide nanogramos ( $10^{-9} g$ ), y los detectores mas selectivos como el de captura de electrones y el detector fotométrico de llama alcanzan los picogramos ( $10^{-12} g$ )

Debido a esta sensibilidad, la CG es un método preferido para el análisis de trazas, particularmente plaguicidas, herbicidas y contaminantes orgánicos en el aire y del agua. Otra ventaja de esta extrema sensibilidad es la pequeñez de la muestra requerida. Para completar un análisis bastan unos microlitros. En una aplicación forense de la CG fue suficiente una partícula de pintura para identificar el color y modelo de automóvil comprometido en un accidente.

Sencillez: Tanto las técnicas como el instrumental de la cromatografía de gas son relativamente sencillos y fáciles de comprender. Con solo unos pocos días de trabajo de laboratorio los estudiantes son capaces de obtener datos analíticos significativos.

Resultados Cuantitativos: Una ventaja importante de la CG es que permite obtener muy buenos resultados cuantitativos. Sin embargo, la exactitud es función de muchos factores. Se puede obtener buena exactitud en una amplia gama de concentraciones de la muestra, desde miligramos hasta nanogramos <sup>[12]</sup>.

### **1.2.2 Limitaciones de la CG.**

Las principales limitaciones de la cromatografía de gases son: solo pueden manipularse muestras volátiles; a menudo es necesario eliminar interferencias en la muestra; es una técnica “deficiente” para análisis cualitativos.

Solo Muestras Volátiles: Todas las muestras deben ser volátiles; de lo contrario, no pasaran a través de la columna. Con la CG es difícil tratar compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular superior a 600.

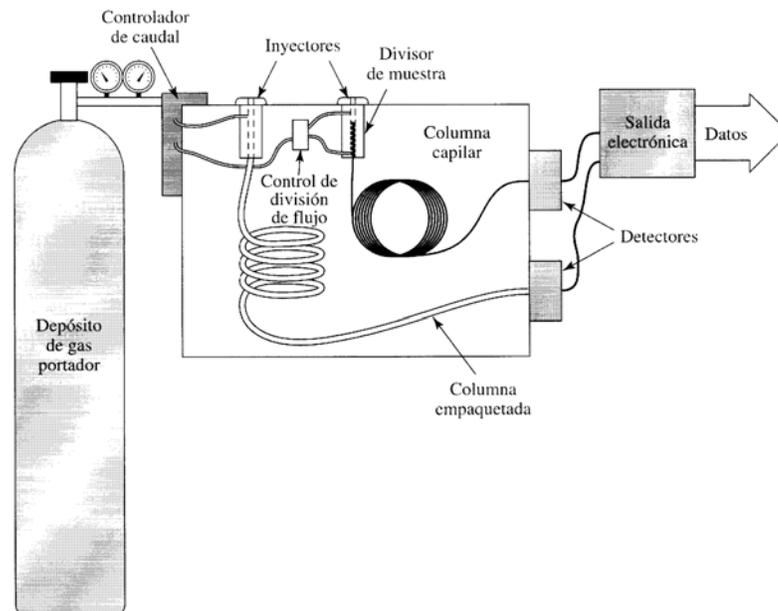
Necesario Eliminar Interferencias: muestras directas como la orina, grasa animal o agua de río no pueden inyectarse directamente en una columna de CG. Estas muestras deben purificarse con disolvente o mediante cromatografía en columna, para eliminar las sales y los compuestos de peso molecular elevado, si se inyectaran estas muestras en una columna de CG, no tardarían en obstruir la columna y disminuiría la velocidad de flujo.

Técnica Cualitativa Deficiente: La CG es un buen método cuantitativo, pero un método cualitativo deficiente. Por lo general, para identificar la muestra se comparan los tiempos de retención de patrones y muestras conocidas. Así no es posible confirmar la identidad de una muestra debido a que varios compuestos pueden tener los mismos tiempos de retención [12].

### 1.2.3 Instrumentos Para La Cromatografía Gas (CG).

Actualmente, más de 30 fabricantes de instrumentos ofrecen 130 modelos distintos de equipos de CG, con un precio que varía desde los 30.000 hasta 250.000 dólares. En las últimas décadas los fabricantes han mejorado sus componentes agregando primero integradores electrónicos y procesadores de datos basados en un computador. Después ordenadores para el control automático de la mayoría de parámetros, como temperatura de la columna, caudales e inyección de la muestra, y el desarrollo de columnas abiertas que son capaces de separar gran cantidad de analitos en tiempos relativamente cortos [13].

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases se muestran en la figura 2.



**Figura 2.** Diagrama de un sistema de cromatografía gas-liquido.

**1.2.3.1 Gas Portador.** El propósito del gas portador es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. El gas deberá ser inerte y no reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria <sup>[12]</sup>. La selección del gas portador puede influir tanto en la separación como en la velocidad y determina la selección del detector. Un gas de peso molecular elevado genera más platos teóricos, un ejemplo es el nitrógeno en comparación con el helio. Sin embargo si se desea optimizar la velocidad del análisis, es mejor escoger un gas portador ligero, como el helio o el hidrogeno <sup>[12]</sup>. Es importante que el gas portador sea de alta pureza. Las impurezas (en especial oxígeno y agua) pueden alterar químicamente la fase líquida y, por ende, modificar los tiempos de retención. Las columnas de poliésteres, poliglicoles y poliamidas son susceptibles de ser degradadas por el oxígeno y el agua. Trazas de agua pueden des-adsorber otros contaminantes en la columna y producir numerosas señales en el detector o hasta “picos fantasma” <sup>[12]</sup>.

**1.2.3.2 Sistema de Inyección de Muestra.** La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida como un “tapón” de vapor; la inyección lenta de muestras demasiado grandes provoca un ensanchamiento de las bandas y una pobre resolución. El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un “septum” de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna (esta cámara normalmente está unos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra). Para columnas capilares el tamaño de la muestra es de aproximadamente  $10^{-3} \mu L$ , en estos casos se emplea un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto <sup>[13]</sup>.

**1.2.3.3 Configuración de la Columna y del Horno de la Columna.** En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las *rellenas* y las *abiertas* o *capilares*. Estas últimas más eficaces y rápidas. Las columnas pueden variar desde menos de 2 hasta 50 metros de longitud o más. Están construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm, para colocarse en el interior de un horno termostático.

La temperatura de la columna es una variable importante que para un trabajo preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello la columna se introduce en un horno a temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. En la práctica con temperaturas de la columna iguales o ligeramente superiores a la temperatura de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elusión razonables (2 a 30 min.). Para muestras cuyos componentes presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición, a menudo es

conveniente emplear una *programación de la temperatura*, con lo que se aumenta la temperatura de la columna bien de forma continua o bien por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación.

En general, la resolución óptima se asocia con una temperatura mínima; en contrapartida la reducción de temperatura produce un aumento en el tiempo de elusión, y por lo tanto del tiempo que se necesita para completar el análisis.

**1.2.3.4 Sistemas de Detección.** El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración <sup>[12]</sup>.

Algunas de las características deseables para un detector de CG son:

La sensibilidad es la cantidad de señal generada por unidad de concentración o por unidad de masa de un analito en el gas transportador. Las unidades de sensibilidad se basan en la medida del área de los picos <sup>[11]</sup>.

Respuesta lineal para solutos que se extiendan a varios ordenes de magnitud <sup>[13]</sup>.

Un intervalo de temperatura de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 °C <sup>[13]</sup>.

Que el detector genere una respuesta para todos los componentes de la muestra, exceptuando el gas transportador y una respuesta selectiva y predecible para uno o más tipos de solutos <sup>[12, 13]</sup>.

**1.2.3.4.1 Detector de Ionización de Llama (DIL).** El detector de ionización de llama es el detector más extensamente utilizado, y por lo general uno de los más aplicables en cromatografía de gases <sup>[13]</sup>. El DIL se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. El DIL responde al número de átomos de carbono que entre en el detector por unidad de tiempo, por ello, es más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración. Es insensible a los gases no combustibles como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> <sup>[12]</sup>.

Sus características son, mínima cantidad detectable de 10<sup>-11</sup> g; respuesta lineal de 10<sup>6</sup>; excelente estabilidad, poco efecto por los cambios en el flujo y la temperatura; gas transportador nitrógeno o helio; temperatura límite de 400 °C <sup>[11]</sup>.

**1.2.3.4.2 Detector de Conductividad Térmica (DCT).** Uno de los primeros detectores que se utilizaron en cromatografía de gases, y uno de los que todavía tienen gran aplicación <sup>[13]</sup>. El funcionamiento de este se basa en el principio de que un cuerpo caliente perderá calor a una velocidad que depende de la composición del gas que lo rodea. Así, la velocidad de pérdida de calor puede usarse como una medida de la composición del gas <sup>[12]</sup>.

Las conductividades térmicas del helio y del hidrogeno son aproximadamente de seis a diez veces mayores que las de la mayoría de los compuestos orgánicos, de modo que, incluso en presencia de pequeñas cantidades de materia orgánica, tiene lugar una disminución relativamente grande de la conductividad térmica del

efluente de la columna y, en consecuencia, el detector experimenta un marcado aumento en la temperatura <sup>[13]</sup>. La mínima cantidad detectable por DCT es de  $10^{-9}$  g ; responde a todos los componentes; tiene una respuesta lineal de  $10^4$ ; con una estabilidad buena, usando helio como gas transportador y con una temperatura límite de 400 °C <sup>[11]</sup>.

**1.2.3.4.3 Detector de Captura de Electrones (DCE).** El detector de captura de electrones ha llegado a ser uno de los detectores más ampliamente utilizados para el análisis de muestras medioambientales, debido a su selectividad para detectar compuestos que contienen halógenos, tal es el caso de los pesticidas y de los bifenilos policlorados <sup>[13]</sup>. Este mide las disminuciones de una señal en vez del aumento de la corriente eléctrica. A medida que el gas portador nitrógeno fluye a través del detector, una lamina de tritio o de <sup>63</sup>Ni radioactivo ioniza las moléculas de nitrógeno y forma electrones lentos. Estos electrones se desplazan hacia el ánodo, cuyo potencial es de 90 voltios positivos. Si se introduce en el detector una muestra que contenga moléculas que capturen electrones, se reducirá la corriente. La disminución de corriente es una medida de la cantidad y afinidad electrónica de los compuestos de la muestra. La mínima cantidad detectable por el DCE es de  $10^{-9} - 10^{-12}$  g , su respuesta es muy selectiva, tienen una linealidad de  $10^3 - 10^4$  y con una estabilidad considerable.

#### **1.2.4 Acoplamiento de la Cromatografía de Gases con Métodos Espectroscópicos.**

La cromatografía de gases a menudo se combina con otras técnicas selectivas como la espectroscopia y la electroquímica. En los primeros métodos acoplados, los gases efluentes de una columna cromatográfica, después de ser detectados por un detector no destructivo y no selectivo, se recogían como fracciones separadas en una trampa fría. La composición de cada una de las fracciones se investigaba por resonancia magnética nuclear, infrarrojo, o espectrometría de masas, o por medidas electroanalíticas <sup>[13]</sup>.

#### **1.2.5 Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).**

Algunos fabricantes de instrumentos ofrecen equipos de cromatografía de gases que pueden acoplarse directamente con distintos tipos de espectrómetros de masas de barrido rápido <sup>[13]</sup>.

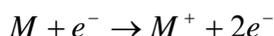
La CG es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Desafortunadamente la CG no puede confirmar la identidad o estructura de cada pico. Los tiempos de retención son característicos de cada compuesto pero no son únicos <sup>[11]</sup>.

Tanto el sistema cromatográfico como el espectroscópico están calentados (200 – 300°C), ambos trabajan con compuestos en estado gaseoso y ambos requieren pequeños tamaños de muestra (micro o nanogramos). CG y EM son muy

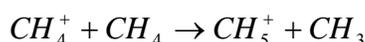
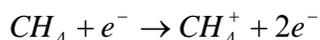
compatibles. El único problema es que la presión atmosférica en la salida del CG debe ser reducida a un vacío de de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  torr para la entrada al EM <sup>[11]</sup>.

Las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas (o repelidas) por un apropiado campo magnético o eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, pero impacto electrónico (IE) es el más antiguo, común y simple. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas <sup>[11]</sup>.

Los electrones de alta energía golpean las moléculas neutras del analito, causando la ionización (usualmente pierde un electrón) y fragmentación. Esta técnica de ionización produce en su mayoría exclusivamente iones positivos:



Otros medios para lograr la ionización son la ionización química (IQ y, la ionización química negativa (IQN). En IQ, un gas reactivo como el metano es admitido a la cámara de iones donde es ionizado, produciendo un catión el cual experimenta más reacciones para producir iones secundarios.



Comúnmente esta técnica produce menos fragmentaciones y espectros más simples. El pico mayor que resulta es  $(M + 1)$ , siendo  $M$  el peso molecular <sup>[11]</sup>.

Para llevar a cabo la ionización química, la cantidad de iones es habitualmente diferente de la usada para impacto electrónico, la presión de operación es mayor y la temperatura es más baja <sup>[11]</sup>.

Después de la ionización, las partículas cargadas son repelidas y atraídas por lentes cargados en el analizador de masa. Aquí las especies iónicas son separadas por su razón masa-carga  $\left(\frac{m}{z}\right)$  por cualquiera de los dos campos magnético o eléctrico <sup>[12]</sup>. Los analizadores de masa típicos para CG/EM son cuadrupolos o trampa de iones. El primero consiste en cuatro varas hiperbólicas perpendiculares a cada una. Tiene la ventaja de ser sencillo, pequeño, de costo moderado y rápido análisis lo que lo hace ideal a los sistemas CG/EM. Presenta restricciones cerca de los 2.000 Daltons <sup>[11]</sup>.

El de trampa de iones es también simple en diseño, costo moderados y de análisis rápidos para CG/EM. El espectro generado, difiere a menudo del espectro clásico creado en uno de cuadrupolo y algunos iones sufren disociación o colisiones ión-molécula adentro de la trampa de iones.

El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función del  $\left(\frac{m}{z}\right)$ . Bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y  $\left(\frac{m}{z}\right)$  específico que presentan las especies son únicos para cada compuesto. Estos

pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto <sup>[11]</sup>.

CG-EM combina las ventajas de ambas técnicas: el alto poder de resolución y la velocidad de análisis de CG, mientras la EM provee tanto identificación positiva como análisis cuantitativos por debajo del nivel de las ppb. Por otro lado los instrumentos de CG-EM representan una inversión importante de capital, son más complicados de operar que un CG <sup>[11]</sup>.

La presentación de datos puede ser de dos maneras; o como un total análisis (scan, TIC-Total Ion Chromatogram) o como un número pequeño individual de iones (SIM-Selected Ion Monitoring) característicos de un compuesto. Un cromatograma de ión total (TIC) es usado para identificar compuestos desconocidos. Un rango específico de masas es escaneado. Todos los picos son reportados así que los espectros de masa pueden ser recuperados del computador y ser usados para identificar cada pico. La computadora compara rápidamente cada espectro de masa desconocido con cerca de 150.000 espectros de referencia. La adquisición de datos necesario para examinar todos los iones en el rango seleccionado es lento, la sensibilidad es limitada, y usualmente no es óptima.

En SIM solo un pequeño número de iones (habitualmente 6) son monitoreados. Aquí la adquisición de datos es más rápida durante el tiempo de vida del pico, por lo tanto la cuantificación es mejor y la sensibilidad aumenta considerablemente. SIM no puede usarse para análisis cualitativo (no todas las masas son escaneadas), pero es el mejor modo para el análisis de compuestos designados, a menudo por debajo del nivel de los ppb <sup>[11]</sup>.

### **1.3 ESPECTROMETRIA DE MASAS MOLECULAR (EM)**

De todas las herramientas analíticas de que dispone un científico, la espectrometría de masas es quizás la de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras <sup>[13]</sup>.

Como muchas reacciones químicas usadas para análisis, el propósito básico de la espectrometría de masas es convertir la muestra en productos que son indicativos de la molécula original. Los productos formados son bastante raros: iones positivos gaseosos, cuya masa y abundancias relativas son mostrados en el espectro de masa <sup>[14]</sup>.

#### **1.3.1 Impacto Electrónico (IE).**

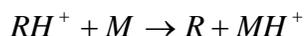
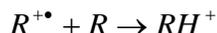
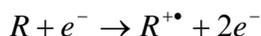
Para este método de ionización, el “reactivo” que produce los productos iónicos es un haz de electrones energéticos. Estos son calentados en un filamento incandescente, y viajan a través de la cámara de iones hasta un ánodo (trampa de iones) en el lado opuesto. El flujo de moléculas vaporizadas de la muestra a una

presión de aproximadamente  $10^{-3}$  Pa ( $10^{-5}$  torr) que entra a la fuente interactúa con el flujo de iones para formar una variedad de productos, incluyendo los iones positivos. Con la IE se pueden introducir muestras de moléculas largas usando la técnica de haz de partículas <sup>[14]</sup>.

### 1.3.2 Ionización Química (IQ).

El gas reactivo entra a la cámara de ionización aumentando la presión en la cámara de ionización a  $\sim 70$  Pa (0,50 torr), se puede asegurar que la muestra sufrirá cientos de colisiones antes de escapar. El bombardeo de electrones de metano o cualquier otro gas a tal presión en una cámara de ionización cerrada produce una abundancia de iones "reactivos" como  $\text{CH}_5^+$ . Estos reaccionarán con las moléculas de la muestra adicionada a través de reacciones ión-molécula; algunas son "suaves" produciendo iones estables que representan las moléculas de la muestra sin disociar. Con la ionización química diferentes tipos de moléculas pueden ser ionizadas selectivamente con iones positivos o negativos específicos. Ambos tipos de iones son utilizados para indicar el peso molecular, porque están a menudo presentes en espectros de IQ de compuestos que no muestran ión molecular en el espectro de IE <sup>[14]</sup>.

Para IQ el gas reactivo **R** es introducido a la fuente de iones a una concentración en exceso ( $\sim 10^4:1$ ) comparado con la muestra, y es ionizado por bombardeo de electrones o descarga eléctrica. Los iones  $R^{+\bullet}$  inicialmente formados pueden reaccionar con otras moléculas de **R** para formar iones reactivos los cuales atacan las moléculas de la muestra <sup>[14]</sup>.



Esta reacción es favorecida porque la afinidad de las moléculas de la muestra es mayor que la del reactivo <sup>[14]</sup>.

### 1.3.3 Ion Molecular.

El ión molecular,  $M^{+\bullet}$ ; provee la mas importante información en el espectro de masa. Desafortunadamente, para algunos tipos de compuestos el ión molecular no es lo suficientemente estable para ser encontrado con apreciable abundancia en el espectro de IE. Para estos casos la espectrometría de masas proporciona la técnica de ionización química. Los siguientes son requerimientos necesarios pero no suficientes para el ión molecular en un espectro de masas: Debe ser el ión con mayor masa en el espectro; debe ser una especie radical, que contenga un electrón desapareado; debe ser capaz de producir los iones importantes en la región de masas alta del espectro por pérdidas de especies neutras lógicas <sup>[14]</sup>.

#### 1.3.4 La Regla De Nitrógeno.

Para la mayoría de los elementos que se encuentran en los compuestos orgánicos, hay una correspondencia entre la masa del isótopo más abundante del elemento y su valencia. Con el nitrógeno sucede algo similar: si un compuesto no contiene (o contiene números pares de) átomos de nitrógeno, su ión molecular tendrá como masa un número par. Si el compuesto contiene números impares de átomos de nitrógeno, el respectivo ión molecular tendrá una masa impar. Esta relación aplica para todos los iones, no solo para el ión molecular <sup>[14]</sup>.

La importancia de los iones con electrones desapareados ( $OE^{+\bullet}$ ) se incrementa con: (i) aumento de la intensidad; (ii) aumento de la masa en el espectro (iii) aumento de masa en el pico grupo <sup>[14]</sup>.

#### 1.3.5 Perdidas Lógicas Neutras.

Solo hay cierto número de fragmentos neutros de masa baja son comúnmente perdidos en la descomposición del ión molecular. La presencia de un "importante" ión separado del ión de mayor masa con una masa anómala o con formula elemental, indica que el ultimo ión no es el ión molecular. Perdidas de masa de 4 a 14 y de 21 a 25 que dan importantes picos son altamente improbables <sup>[14]</sup>.

La abundancia del ión molecular, depende principalmente de su estabilidad y de la cantidad de energía necesaria para ionizar la molécula. Formas particulares estructurales tienden a mostrar valores característicos de estas propiedades, por esto la magnitud de la abundancia del ión molecular provee una indicación sobre la estructura de la molécula. En general, la estabilidad química de la molécula es paralela a la estabilidad del ión molecular, y esta se refleja en la abundancia del ión molecular; la intensidad de este se incrementa con el aumento de la insaturaciones y el numero de anillos. El efecto del ión molecular es menos claro; incrementando la longitud de la cadena en 6 u 8 carbonos decrece la intensidad del pico del ión molecular sustancialmente, pero a menudo se incrementa la intensidad del ión molecular de nuevo para cadenas rectas más largas. Para las cadenas ramificadas disminuye la estabilidad del ión molecular y de este modo su abundancia <sup>[14]</sup>.

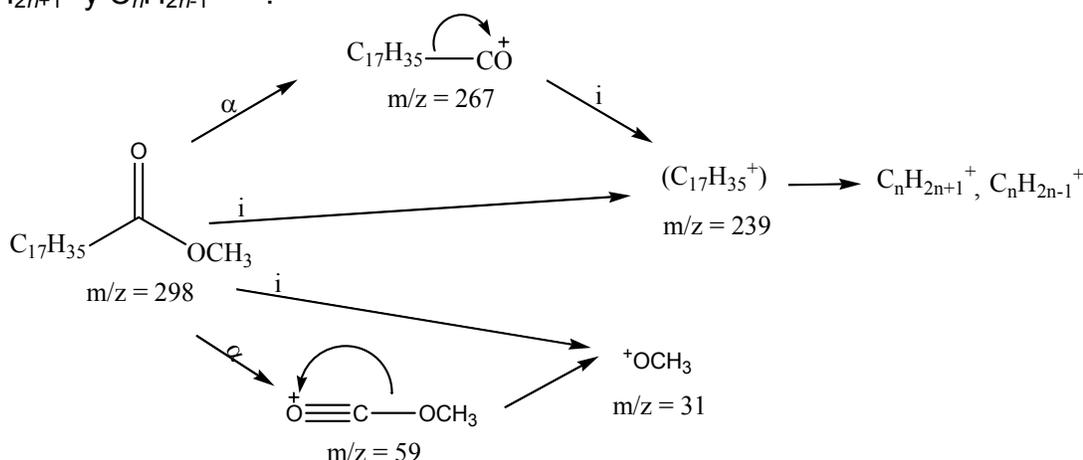
Si menos energía es requerida para ionizar la molécula, mas iones moleculares de menor energía interna son formados, y la intensidad del pico será mayor <sup>[14]</sup>.

#### 1.3.6 Espectrometría De Masas De Metilesteres.

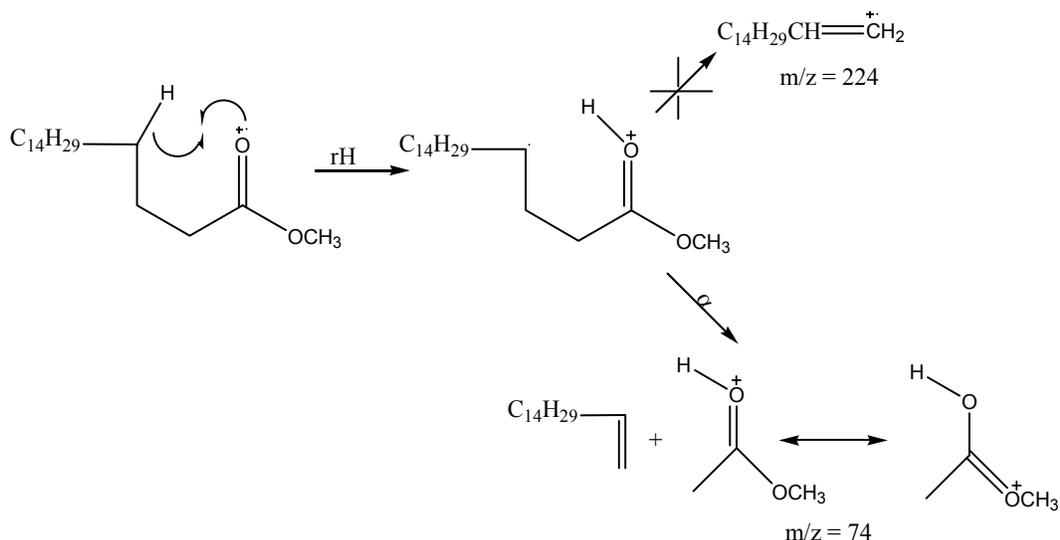
Los estudios clásicos de Stenhagen (1972) y sus colaboradores en la década de los 50' en espectrometría de masas de esterres de ácidos grasos fue probablemente la primera demostración del valor de la EM para deducir la estructura de moléculas complejas de productos naturales. Iones moleculares de apreciable abundancia son observables aun para metilesteres ácidos *n*-alifáticos de alto peso molecular; la intensidad del pico del ión molecular realmente aumenta con pesos moleculares altos ( $>C_6$ ), aunque disminuye cuando la cadena esta ramificada <sup>[14]</sup>.

Tanto el átomo de oxígeno del carbonilo como el oxígeno saturado de los ésteres pueden actuar como sitios para la reacción inicial y dar paso a la reacción esperada del comportamiento separado de estas funciones, y, además, nuevas reacciones aparentemente debido a sus efectos combinados [14].

Los metilesteres que no contienen una función adicional muestran las reacciones esperadas para el grupo carbonilo – adición  $\alpha$  (figura 3) y adición  $\beta$  con reorganización del hidrogeno  $\gamma$  (gama) (figura 4). El ión alquilo  $(M - 59)^+$  y el ión  $\text{CH}_3\text{O}^+$  son muy pequeños excepto metilesteres de bajo peso molecular. Además la descomposición de la mitad de los alquilos produce los iones característicos  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$  y  $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$  [14].



**Figura 3.** Esquema de fragmentación por IE dando como resultado el ión  $[M - 31]^+$ .



**Figura 4.** Rearreglo de McLaffety resultando el ión de peso molecular 74.

Otra reorganización inusual productora de iones  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CO}^+$  identificada por Stenhagen y sus colaboradores implica la pérdida de los carbonos  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - como

$C_3H_7$  (Mollova y Longevialle 1990). La adición de la cadena productora del ión alquilo puede ser significativa en los carbonos totalmente substituidos <sup>[14]</sup>.

## 1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

### 1.4.1 Extracción Soxhlet.

Consiste en un medio de extracción sólido-líquido que se utiliza generalmente para extraer componentes lipídicos de una matriz, por medio de un solvente apolar. Es un método de extracción directa, aplicable a alimentos en general, aunque con excepción de aquellos en los que la grasa está recubierta (como los productos lácteos), y para la obtención de la fracción de grasa libre de la muestra para su posterior caracterización. Los solventes más utilizados para extraer la grasa libre son el éter dietílico o el éter de petróleo, y para fines de cuantificación de grasa se requiere una muestra anhidra, para no extraer además azúcares y otros compuestos. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz <sup>[15]</sup>. En la figura 5, se muestra un diagrama de la extracción usando este método.

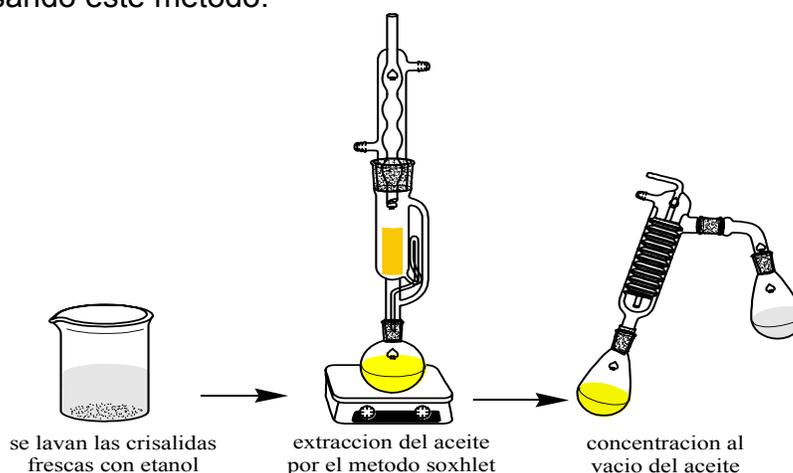


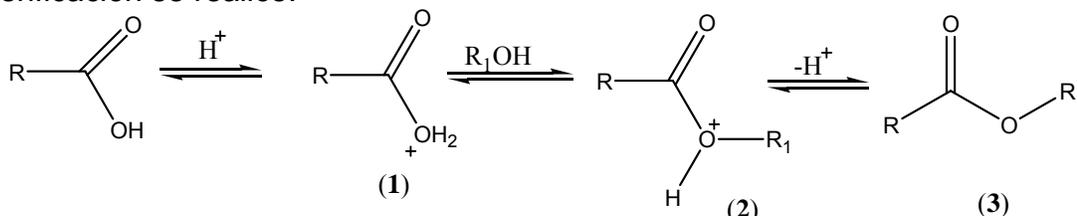
Figura 5. Diagrama de extracción del aceite usando el método Soxhlet.

## 1.5 DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La cromatografía de gases revolucionó el estudio de los lípidos, haciendo posible determinar la composición completa de los ácidos grasos de un lípido en muy corto tiempo. Para este propósito, los ácidos grasos son convertidos al derivado más simple volátil, usualmente metiléster, aunque otros ésteres pueden ser preferidos para diferentes propósitos. La preparación de tales ésteres se ha vuelto el tipo de reacción más común entre los analistas de lípidos. Aunque los ácidos grasos pueden estar en la naturaleza en estado libre (no esterificado), en su mayoría se encuentran como ésteres unidos a glicerol, colesterol o alcoholes alifáticos de cadenas largas}; en los casos cuando los ácidos grasos están en estado de ésteres, se debe trans-esterificar el ácido graso <sup>[16]</sup>.

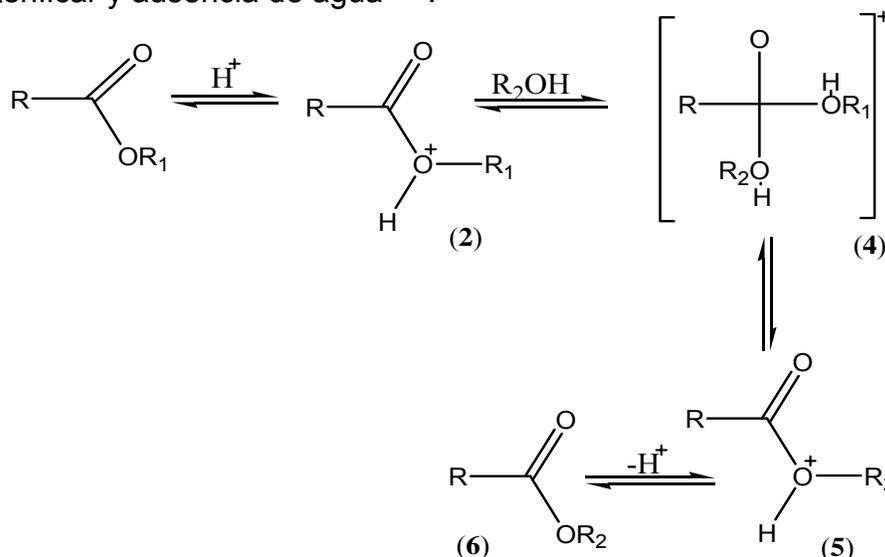
### 1.5.1 Esterificación Y Trans-Esterificación Catalizada Por Ácido.

Los ácidos pueden ser esterificados por alcoholes en presencia de un apropiado catalizador ácido (figura 6). El paso inicial es la protonación del ácido para dar el ión (1), el cual puede sufrir una reacción con el alcohol para dar el intermediario (2), y este a su vez puede perder un protón para convertirse en el éster (3). Cada paso en este proceso es reversible pero en presencia de un gran exceso del alcohol, el punto de equilibrio de la reacción es desplazado para que la esterificación se realice.



**Figura 6.** Esterificación de ácidos grasos con catálisis acida.

La trans-esterificación ocurre bajo condiciones similares (figura 7). La protonación de éster es seguida por la adición del alcohol para dar el intermediario (4) el cual se disocia para posteriormente dar el éster (6). El agua debe ser una vez mas excluida. Las condiciones preferidas para esterificación o trans-esterificación de ácidos carboxílicos son por consiguiente un exceso del alcohol con el que se quiere esterificar y ausencia de agua <sup>[16]</sup>.



**Figura 7.** Trans-Esterificación de lípidos por catálisis acida.

La esterificación con cloruro de hidrogeno en metanol HCl/MeOH al 5%, es la citada con más frecuencia; el reactivo se prepara burbujando cloruro de hidrogeno gaseoso seco en el metanol anhidro. En la práctica, pequeñas cantidades de agua formadas no afectan la esterificación significativamente y el reactivo tiene una vida útil de cerca de dos semanas a temperatura ambiente o más larga si se refrigera <sup>[16]</sup>.

Todos los ácidos grasos son esterificados con aproximadamente la misma razón de cloruro de hidrogeno y metanol, es improbable que hayan perdidas de ácidos grasos específicos durante el paso de la reacción. En síntesis, el cloruro de hidrogeno en metanol (o cualquier otro alcohol) puede ser usado para esterificar ácidos grasos libres o trans-esterificar ácidos grasos unidos por enlace éster a glicerol o colesterol. Probablemente puede ser el mejor reactivo disponible para propósitos generales de esterificación. La mayor desventaja es el largo tiempo del reflujo para completar la reacción <sup>[16]</sup>.

El ácido sulfúrico en metanol  $H_2SO_4/MeOH$  como reactivo para la esterificación, en ocasiones se emplea concentraciones muy altas, una solución del 1 al 2% tiene casi propiedades idénticas al  $HCl/MeOH$  al 5%, y es muy sencillo de preparar. La temperatura a la que se haga el reflujo y la concentración del ácido en la solución deben ser moderadas debido a que el  $H_2SO_4$  es un fuerte oxidante; para ácidos libres poliinsaturados no se recomienda largo tiempo en el reflujo debido al poder oxidativo del ácido, se tienen reportes de reflujo a concentraciones altas ~20% y temperaturas de 170 °C con formaciones de productos coloreados y destrucción de ácidos poliénoicos <sup>[16]</sup>.

El ácido de Lewis, trifloruro de boro, en la forma de su coordinación compleja con metanol es un poderoso catalizador ácido para la esterificación de ácidos grasos. En ocasiones la esterificación de ácidos grasos libres se completó en 2 minutos con trifloruro de boro en metanol  $BF_3/MeOH$  al 12 o 14% bajo reflujo. Este reactivo también se puede usar como trans-esterificador la mayor clase de lípidos, aunque se emplee más tiempo que esterificando ácidos libres. La reacción se puede acelerar con el uso de radiación de baja frecuencia. Desafortunadamente, el  $BF_3/MeOH$  tiene una serie desventaja; se reportó que algunos metóxidos eran producidos a partir de ácidos grasos insaturados por la adición de metanol por el doble enlace cuando la concentraciones del  $BF_3$  son elevadas ~ 50%. El reactivo tiene una vida útil limitada a temperatura ambiente y debería permanecer refrigerado. Ciertamente es muy popular, pero posiblemente porque es uno de los pocos reactivos que se puede comprar a distribuidores comerciales. El tricloruro de boro en metanol  $BCl_3/MeOH$  puede ser usado de manera similar para preparar metilesteres, aunque la reacción es más lenta que con el  $BF_3$  <sup>[16]</sup>.

## 2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 2.1 MUESTRAS DE ANÁLISIS

Como muestra real se utilizó crisálidas frescas del gusano de seda híbrido Pilamo 1, cultivado en la vereda de Santa Rosa, en el departamento del Valle del Cauca.

### 2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Al llegar los capullos al laboratorio de la UTP se realizó el sacrificio con aire seco caliente, con este procedimiento se secan también las crisálidas las cuales deben estar secas para la extracción del aceite. Cortando los capullos se extraen las crisálidas, las cuales son secadas con aire caliente durante 5 días debido a su cantidad.

### 2.3 EXTRACCIÓN

Se realizaron extracciones, según procedimientos en estudios preliminares, por medio de la técnica soxhlet, con una relación de crisálida-hexano de 1:10, durante 4 horas. El resultado de la extracción se llevó a concentración al vacío.

### 2.4 ESTERIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La esterificación del aceite se realizó utilizando una mezcla de  $H_2SO_4/MeOH$  al 2% (el procedimiento del libro no especifica la concentración, se toma esta por otras investigaciones), tanto el ácido como el metanol deben ser anhidros, para evitar desplazamientos en el equilibrio.

A 40-50 mg del extracto lipídico en un tubo con tapa rosca se agregó 1 mL de benceno (se cambio por hexano por disponibilidad). Se adicionó 2 mL de la mezcla  $H_2SO_4/MeOH$  al 2% posteriormente de que la muestra se disolvió. Después de tapar el tubo con la tapa rosca, se llevó a un baño María a 90 °C durante dos horas <sup>[17]</sup>.

Después de el tubo estar a temperatura ambiente, se adicionó 0,5 mL de agua y se mezcló. Se hicieron extracciones de la mezcla tres veces con porciones de 3 mL de pentano (se utilizó hexano grado cromatográfico para eliminar interferencias en el análisis cromatográfico de gases). Se combinaron los tres extractos de hexano y reducir el volumen hasta  $\frac{1}{4}$  del volumen inicial por calentamiento. Para el análisis en CG la muestra fue totalmente anhidra <sup>[17]</sup>.

### 2.5 ESTÁNDAR

Se compró un estándar comercial de mezcla de metilesteres de ácidos grasos marca RESTEK, con código de catalogo 35078 (en el anexo 1, se muestra el certificado del estándar), el cual contiene la 28 metilesteres de ácidos grasos. La

concentración del estándar es de  $30 \text{ mg/mL}$ . Los metilesteres presentes en el estándar y su concentración en él, se presentan en la tabla 1.

NUMERO DE CARBONOS	COMPUESTO	PORCENTAJE (% PESO)
4:0	Metil butirato	1,5%
6:0	Metil hexanoato	1,5%
8:0	Metil octanoato	2,0%
10:0	Metil decanoato	2,5%
11:0	Metil undecanoato	2,5%
12:0	Metil laurato	5,0%
13:0	Metil tridecanoato	2,5%
14:0	Metil miristato	2,5%
14:1	Metil miristoleato (cis-9)	1,5%
15:0	Metil pentadecanoato	1,5%
16:0	Metil palmitato	10,0%
16:1	Metil palmitoleato (cis-9)	5,0%
17:0	Metil heptadecanoato	2,5%
18:0	Metil estearato	5,0%
18:1	Metil oleato (cis-9)	15,0%
18:1	Metil elaidato (trans-9)	2,5%
18:2	Metil linoleato (cis-9,12)	10,0%
18:2	Metil linoelaidato (trans-9,12)	2,5%
18:3	Metil linolenato (cis-9,12,15)	5,0%
20:0	Metil araquidato	2,5%
20:1	Metil eicosenoato (cis-11)	1,5%
22:0	Metil behenato	2,5%
22:1	Metil erucato (cis-13)	1,5%
23:0	Metil tricosanoato	1,5%
24:0	Metil lignocerato	2,5%
20:5	Metil eicosapentaenoato (cis-5,8,11,14,17)	2,5%
24:1	Metil nervonato (cis-15)	2,5%
22:6	Metil docosahexaenoato (cis-4,7,10,13,16,19)	2,5%

**Tabla 1.** Composición del estándar de mezcla de metilesteres marca RESTEK código 35078.

Las condiciones en las que fue eluido el estándar para el certificado de análisis fueron las siguientes:

Columna Famewax (cat # 12498). 30 m, 0,32 mm, 0,25  $\mu$ m.

Gas transportador: hidrogeno con flujo de 40  $\text{cm}^3/\text{seg}$

Programación de la temperatura: 100 °C por 4 minutos. Se lleva hasta 240 °C con una rata de 3  $^\circ\text{C}/\text{min}$ , se mantiene esta temperatura por 10 minutos

Temperatura del inyector: 200 °C

Temperatura del detector: 250 °C

Tipo de detector: DIL

### 2.5.1 Patrones.

A partir del estándar 35078 el cual esta a una concentración de 30  $\text{mg}/\text{mL}$ , se realizaron las respectivas diluciones para obtener varios patrones. Estos patrones cubren concentraciones que van desde 2,5 hasta 500 ppm de la mezcla de metilesteres.

## 2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas marca Shimadzu GC-MS QP-2010. Sistema equipado con autoinyector AOC-20i, automuestreador AOC-20s, inyección Split-splitless, modo de ionización EI/SCI/NCI y un sistema de inserción directa controlado por un software GCMS solution. Con una columna de 30 m de largo, 0,25 mm DI, 0,25  $\mu$ m de partícula Rtx-CLPesticides Restek. Base de datos de espectros de masas Wiley, 7° edición, 2003.

### 2.6.1 Scan.

Se realizó un scan (análisis total de iones) tanto por impacto electrónico (IE) como por ionización química positiva (IQ), para el patrón de concentración más alta, el cual era de 500 ppm de mezcla de metilesteres; con el objetivo de realizar la identificación de los compuestos que eluyeron, debido a que las condiciones del cromatógrafo, columna y detector cambiaron con respecto a como fue analizado el estándar para el certificado de análisis.

Las condiciones para el scan por IE fueron las siguientes:

Temperatura del inyector: 250 °C

Modo de inyección: Split

Volumen de inyección: 2  $\mu$ L

Razón de split: 4

Presión: 73,7 kPa

Flujo total: 6,0  $\text{mL}/\text{min}$

Flujo en la columna: 1,0  $\text{mL}/\text{min}$

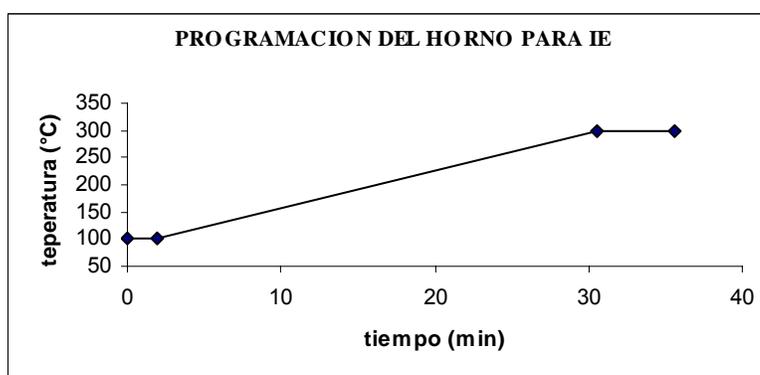
Velocidad lineal del gas: 37,2  $\text{cm}/\text{seg}$

Programación de la temperatura del horno: se muestra en la tabla 2

RAZÓN DE CALENTAMIENTO (°C/min)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE ESPERA (min.)
--	100	2
7	300	5

**Tabla 2.** Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).

La rampa de calentamiento del horno del cromatógrafo de gases se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).

Temperatura de la fuente de iones: 260 °C

Temperatura de la interfase: 280 °C

Ganancia del detector: 1,00 kV

Tiempo de corte del solvente: 2,00 min.

Para el espectrómetro de masas

Tiempo de inicio: 3 min.

Tiempo final: 35 min.

Modo ACQ: scan

Velocidad del scan: 1000

$m/z$  Inicial: 30,00

$m/z$  Final: 500,00

Las condiciones para el scan por IQ se muestran a continuación:

Temperatura del inyector: 250 °C

Modo de inyección: Split

Volumen de inyección: 2 µL

Razón de split: 4

Presión: 73,0 kPa

Flujo total:  $6,0 \text{ mL}/\text{min}$

Flujo en la columna:  $1,0 \text{ mL}/\text{min}$

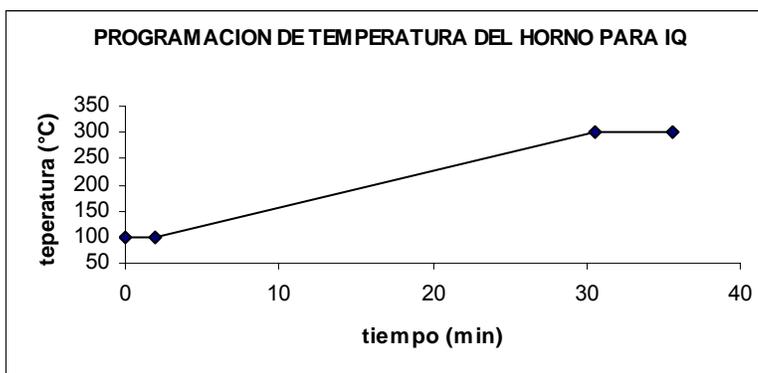
Velocidad lineal del gas:  $37,2 \text{ cm}/\text{seg}$

Programación de la temperatura del horno: se muestra en la tabla 3.

RAZÓN DE CALENTAMIENTO ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	TEMPERATURA ( $^{\circ}\text{C}$ )	TIEMPO DE ESPERA (min.)
--	100	2
7	300	5

**Tabla 3.** Programación del horno para el método de ionización química positiva (IQ).

La rampa de calentamiento del horno del cromatógrafo de gases se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Programación del horno para el método de impacto electrónico (IE).

Temperatura de la fuente de iones:  $210 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de la interfase:  $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Ganancia del detector:  $0,30 \text{ kV}$

Tiempo para el corte del solvente:  $1,50 \text{ min.}$

Para el espectrómetro de masas

Tiempo de inicio:  $2 \text{ min.}$

Tiempo final:  $32 \text{ min.}$

Modo ACQ: scan

Velocidad del scan:  $909$

$m/z$  Inicial:  $70,00$

$m/z$  Final:  $500,00$

### **2.6.2 Curvas de calibración.**

Se hicieron dos curvas para cada compuesto, una con cada método debido a las diferencias que se vieron en los dos scan. Las inyecciones se hicieron siguiendo las condiciones correspondientes de cada scan.

Para IQ, se asignaron picos moleculares para cada compuesto, debido a que sus espectros de masas eran muy limpios. Para IE, se asignaron picos comunes.

### **2.6.3 Análisis de la muestra.**

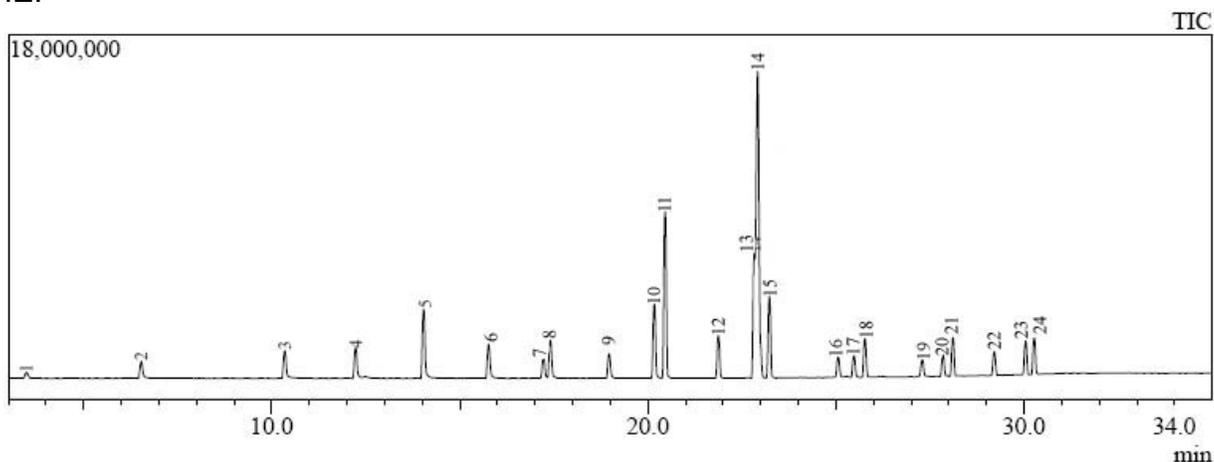
Después de que la técnica fue estandarizada, y la muestra fue derivatizada, se hizo su análisis cromatográfico a las mismas condiciones a las que se analizaron los patrones.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 SCAN

La realización del scan del estándar tanto para el método de IE como para IQ, se hizo con el patrón de concentración de 500 ppm.

Por el método de impacto electrónico (IE), se identificaron 24 picos pertenecientes al estándar, en la figura 10 se muestra el cromatógrama obtenido en el scan por IE.



**Figura 10.** Cromatógrama total de iones del patrón de 500 ppm por el método IE.

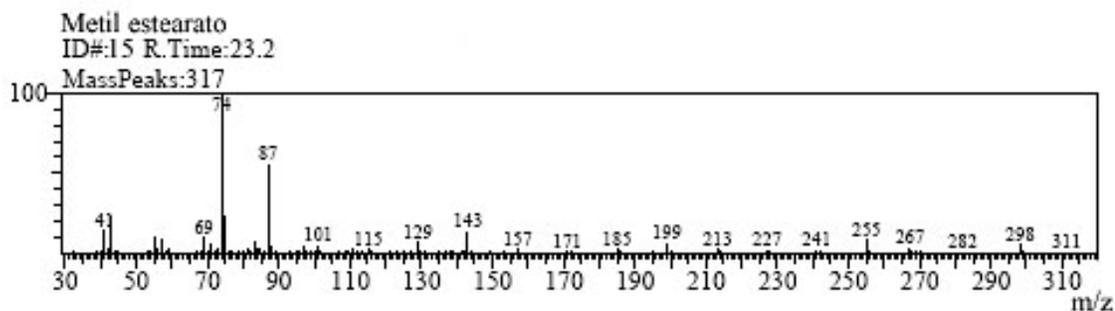
Los picos se identificaron por comparación de sus espectros (anexo 2) con la base de datos del espectrómetro de masas Wiley 7° edición, 2003; y comparando con la información del estándar. Los nombres de los picos que eluyeron se muestran en la tabla 4.

Nº DE ID	TIEMPO DE RETENCIÓN (s)	NOMBRE	m/z	ÁREA
1	3,479	Metil hexanoato	74	669.223
2	6,529	Metil octanoato	74	1.810.605
3	10,345	Metil decanoato	74	2.740.213
4	12,228	Metil undecanoato	74	2.936.660
5	14,038	Metil laurato	74	6.160.043
6	15,765	Metil tridecanoato	74	2.942.963
7	17,223	Metil miristoleato	74	388.389
8	17,406	Metil miristato	74	3.148.515
9	18,970	Metil pentadecanoato	74	1.926.640

10	20,171	Metil palmitoleato	74	1.200.941
11	20,458	Metil palmitato	74	11.698.265
12	21,875	Metil heptadecanoato	74	2.920.370
13	22,832	Metil linolenato	81	3.025.677
14	22,919	Metil oleato	74	3.821.317
15	23,232	Metil estearato	74	5.210.291
16	25,060	Metil eicosapentanoato	79	544.735
17	25,480	Metil eicosanoato	69	301.629
18	25,772	Metil araquidato	74	2.286.912
19	27,296	Metil docosahexanoato	79	457.109
20	27,848	Metil erucato	69	309.515
21	28,109	Metil behenato	74	2.108.875
22	29,211	Metil tricosanoato	74	1.180.219
23	30,044	Metil nervonato	69	486.656
24	30,272	Metil lignocerato	74	1.821.811

**Tabla 4.** Compuestos identificados por el scan con método IE.

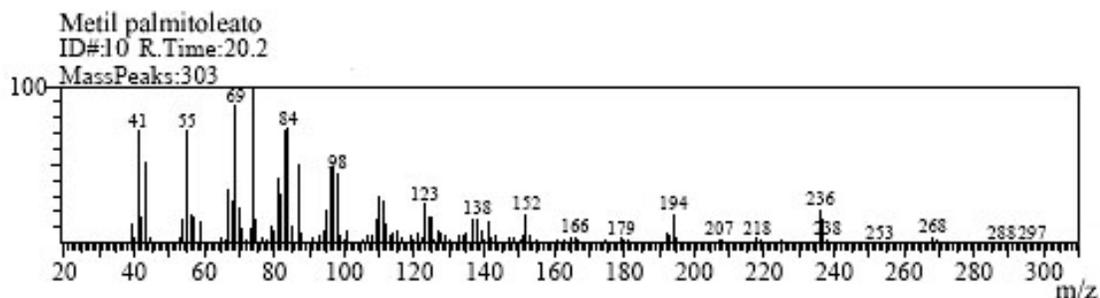
En los espectros de masas por IE (anexo 2), se ven iones  $[M - 31]^+$  los cuales son producidos por la pérdida de  $\text{CH}_3\text{O}$  del  $[M]^+$  (figura 3). Se puede ver en la figura 11 el espectro de masas de metil estearato (18:0), con un peso molecular de 298 umas.



**Figura 11.** Espectro de masas por IE del metil estearato.

Este ión ( $[M - 31]^+$ ) es producido cuando una simple ruptura homolítica del enlace metoxi produce un ión acilo comúnmente observado <sup>[3]</sup>.

También se observan los iones  $[M - 32]^+$  en abundancias mayores a las del ión  $[M - 31]^+$  en metilesteres de ácidos grasos monoinsaturados. En la figura 12 se muestra el espectro de masas del metil palmitoleato (16:1) con peso molecular de 268 umas.

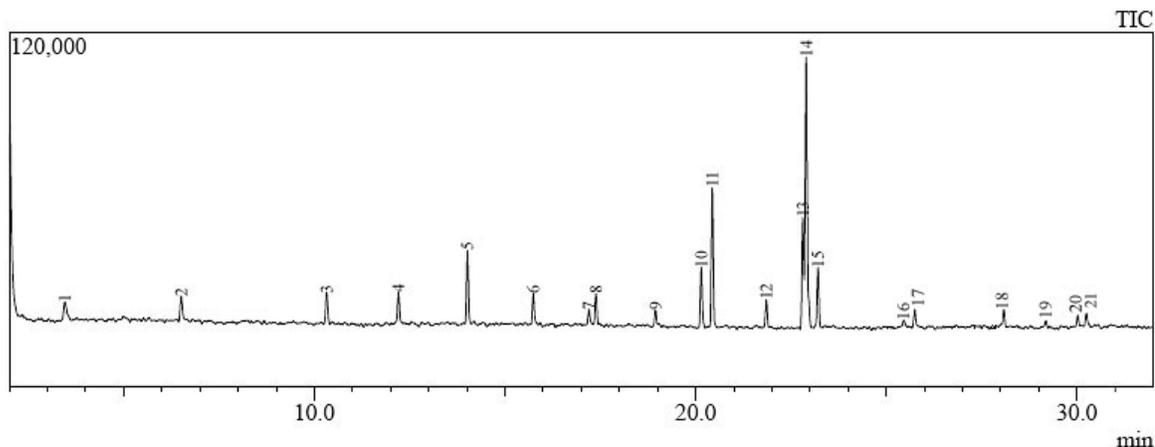


**Figura 12.** Espectro de masas por IE del metil palmitoleato.

Los  $m/z$  74 y 87 se atribuyen al rearrreglo de McLafferty, un estado de transición de seis miembros que resulta en una transferencia del hidrogeno  $\gamma$  y una ruptura  $\beta$  (figura 4). La intensidad de los fragmentos de McLafferty depende del número de enlaces  $\pi$  en la molécula y es comúnmente observado en el espectro de ésteres, cetonas y olefinas [3].

Comparando el estándar 35078 con el patrón a 500 ppm, no solo cambió el orden de elusión sino también la cantidad de compuestos que eluyeron, debido a los cambios en el método, columna (la cual no era específica para FAMES) y programación de la temperatura. El estándar tenía 28 compuestos, y en el scan por IE solo se identificaron 24.

El scan por el método IQ se realizó con el mismo patrón a las mismas condiciones. El cromatograma obtenido por este método de ionización se muestra en la figura 13.



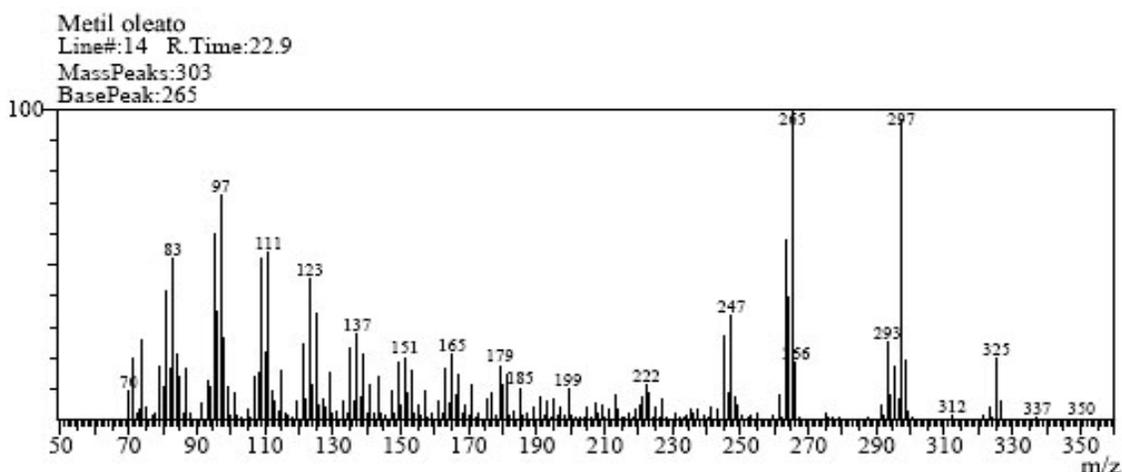
**Figura 13.** Cromatograma total de iones del patrón de 500 ppm por el método de IQ.

Los nombres y el orden de elusión de los compuestos identificados por IQ, se muestran en la tabla 5.

Nº DE ID	TIEMPO DE RETENCIÓN (s)	NOMBRE	m/z	PESO MOLECULAR	ÁREA
1	3,461	Metil hexanoato	131	130	19.666
2	6,508	Metil octanoato	159	158	16.086
3	10,321	Metil decanoato	187	186	15.087
4	12,205	Metil undecanoato	201	200	14.639
5	14,015	Metil laurato	215	214	30.194
6	15,741	Metil tridecanoato	229	228	13.090
7	17,200	Metil miristoleato	209	240	1.830
8	17,382	Metil miristato	243	242	11.612
9	18,945	Metil pentadecanoato	257	256	5.563
10	20,147	Metil palmitoleato	237	268	6.482
11	20,434	Metil palmitato	271	270	39.301
12	21,849	Metil heptadecanoato	285	284	7.309
13	22,808	Metil linolenato	263	292	7.161
14	22,895	Metil oleato	265	296	18.214
15	23,207	Metil estearato	299	298	15.755
16	25,451	Metil eicosanoato	293	324	955
17	25,745	Metil araquidato	327	326	4.551
18	28,080	Metil behenato	355	354	3.801
19	29,181	Metil tricosanoato	369	368	1.955
20	30,014	Metil nervonato	381	380	906
21	30,242	Metil lignocerato	383	382	2.754

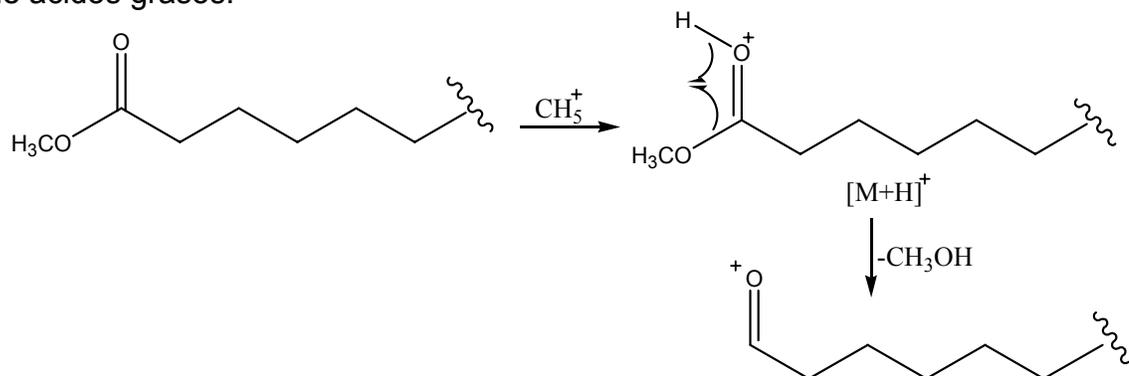
**Tabla 5.** Compuestos identificados por IQ

En los espectros de IQ (anexo 3), se presentan  $m/z [M - 31]^+$  los cuales representan la pérdida de  $\text{CH}_3\text{OH}$  del ión  $[M + 1]^+$  el cual se ve en los metilesteres de ácidos grasos monoinsaturados <sup>[3]</sup>. En la figura 14 se muestra el espectro de masas por IQ del metil oleato (18:1) con peso molecular de 296 umas.



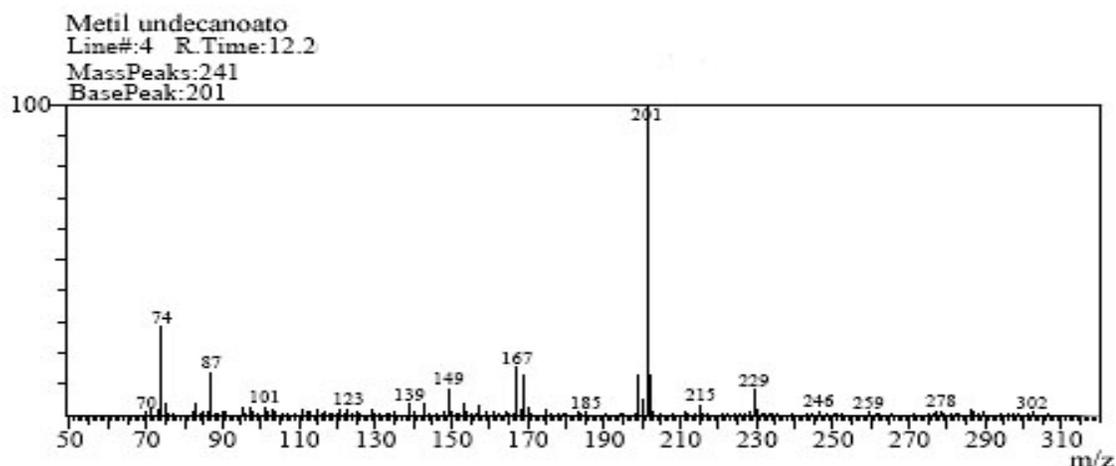
**Figura 14.** Espectro de masas del metil oleato obtenido por IQ.

En la figura 15, se muestra el esquema de fragmentación por IQ de metilesteres de ácidos grasos.



**Figura 15.** Esquema de fragmentación por IQ dando como resultado el ión  $[\text{M} - 31]^+$ .

En los espectros por IQ de metilesteres de los ácidos grasos saturados el único ión que se observa por encima de una abundancia de 50 es el ión  $[\text{M} + 1]^+$ , el cual tiene una abundancia de 100. En la figura 16 se muestra el espectro de masas del metil undecanoato (11:0) con peso molecular de 200 umas.



**Figura 16.** Espectro de masas del metil undecanoato obtenido por IQ.

Tanto el método de ionización por impacto electrónico, como el de ionización química, tienen sus pros y sus contras. Para IE, la sensibilidad es mayor, su escala es de 18.000.000 mientras que para IQ es de tan solo 120.000, usando el mismo patrón en la inyección. Por otro lado, al momento de hacer las curvas de calibración los  $m/z$  del método por ionización química son más selectivos que por el método IE, provocando menos errores al momento de identificar los picos de cada compuesto; debido a que por el método de IQ se pueden identificar  $m/z$  como el  $[M + 1]$  mientras que por el modo de IE se muestran  $m/z$  comunes como el 74, y 87.

### 3.2 CALIBRACIÓN

Para la calibración del método cromatográfico se usaron diluciones del estándar de mezcla de metilesteres de ácidos grasos en concentraciones que van desde 7,5 hasta las 500 ppm. Después de inyectados se seleccionaron los niveles de cada compuesto que mejor correlacionaban con en una línea recta.

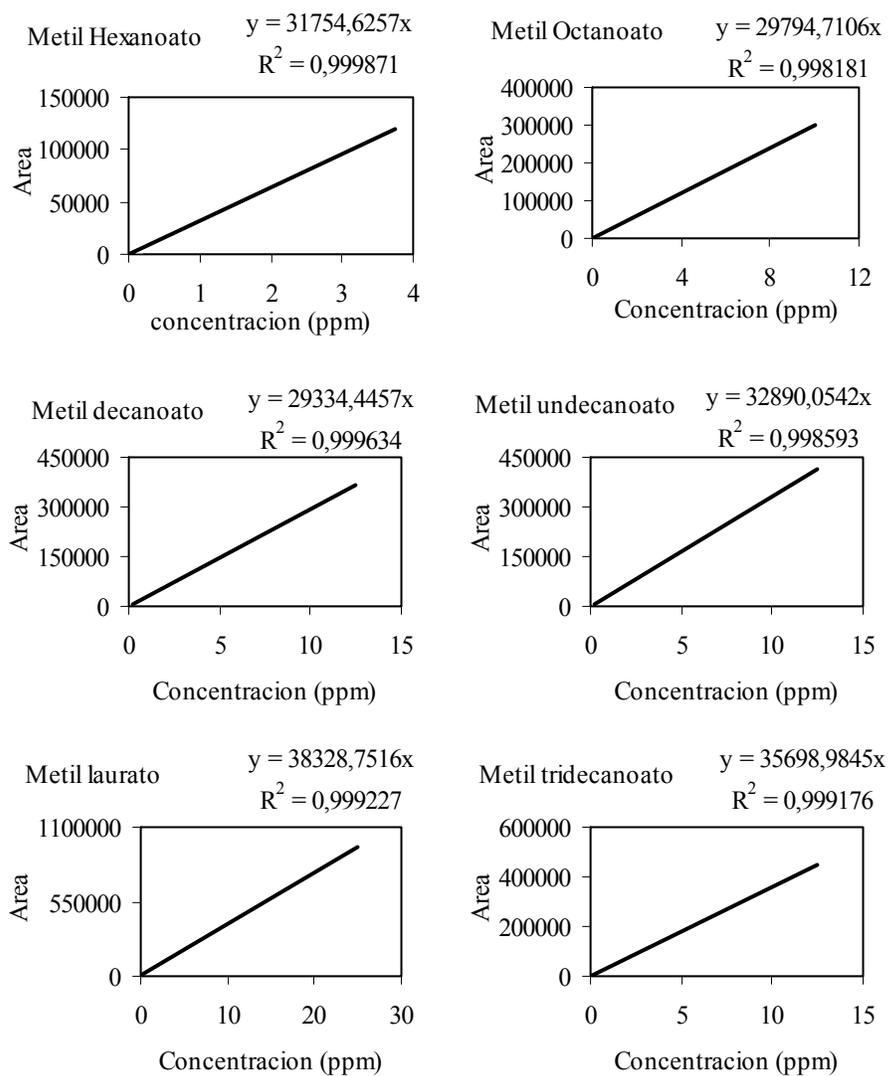
NIVEL	CONCENTRACIÓN (ppm)
1	2,5
2	5
3	7,6
4	25
5	50
6	76
7	100

8	250
9	500

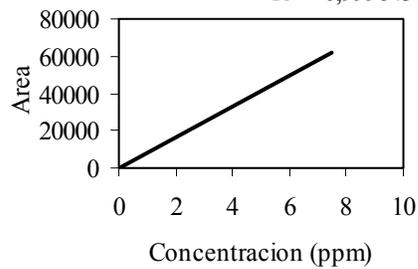
**Tabla 6.** Concentraciones de cada nivel inyectado.

Cada compuesto tenía una concentración diferentes en el estándar comercial, por tal motivo se realizó la calibración, individual para cada uno, usando los dos métodos de ionización.

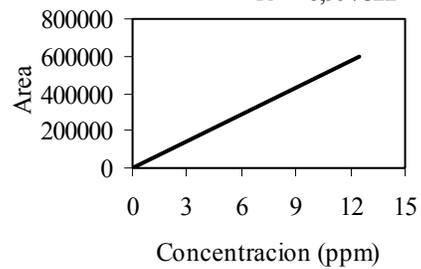
Las curvas de calibración de los 24 compuestos identificados por el modo de ionización de IE se muestran en la figura 17.



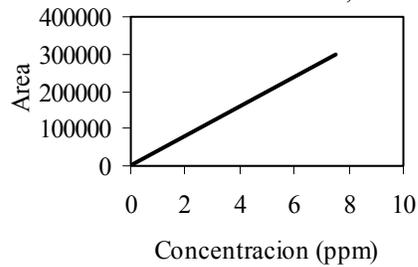
Metil miristoleato  $y = 8285,0543x$   
 $R^2 = 0,999645$



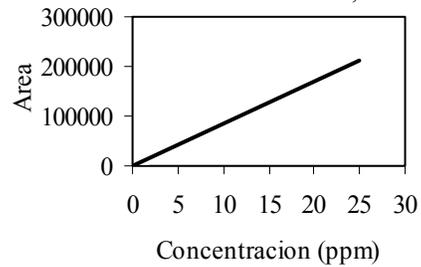
Metil miristato  $y = 47957,7496x$   
 $R^2 = 0,997822$



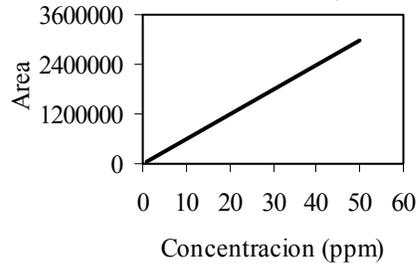
Metil pentadecanoato  $y = 39478,0653x$   
 $R^2 = 0,996535$



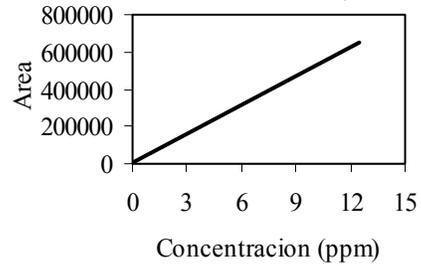
Metil palmitoleato  $y = 8482,7202x$   
 $R^2 = 0,996539$



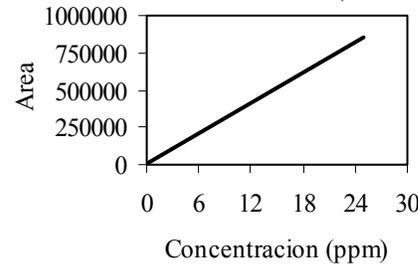
Metil palmitato  $y = 59322,3794x$   
 $R^2 = 0,998627$



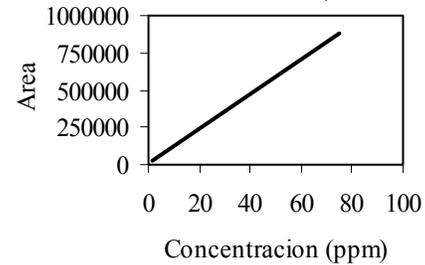
Metil heptadecanoato  $y = 51771,3069x$   
 $R^2 = 0,998340$



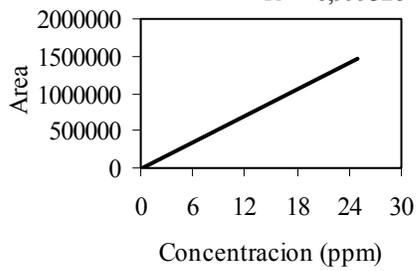
Metil linolenato  $y = 34289,9814x$   
 $R^2 = 0,999307$



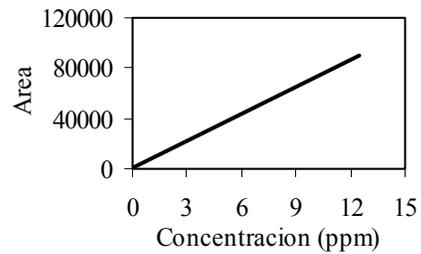
Metil oleato  $y = 11742,9754x$   
 $R^2 = 0,999123$



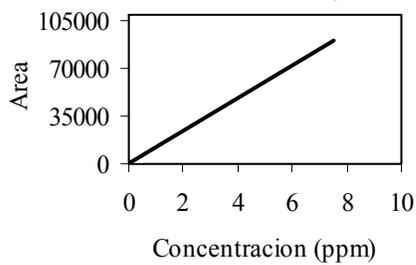
Metil estearato  $y = 58546,7106x$   
 $R^2 = 0,999326$



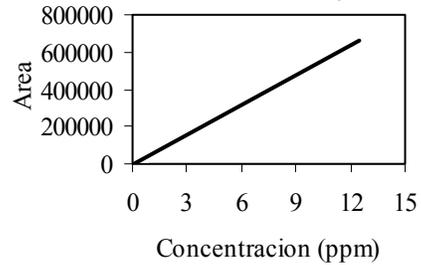
Metil eicosapentanoato  $y = 7241,2204x$   
 $R^2 = 0,998723$



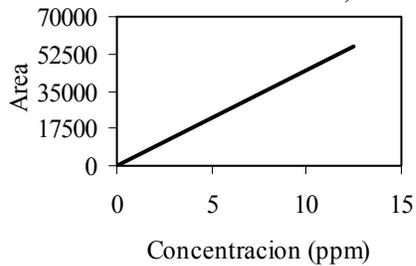
Metil eicosanoato  $y = 12142,7690x$   
 $R^2 = 0,997994$



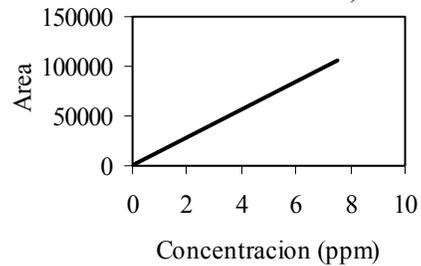
Metil araquidato  $y = 53210,0646x$   
 $R^2 = 0,998724$

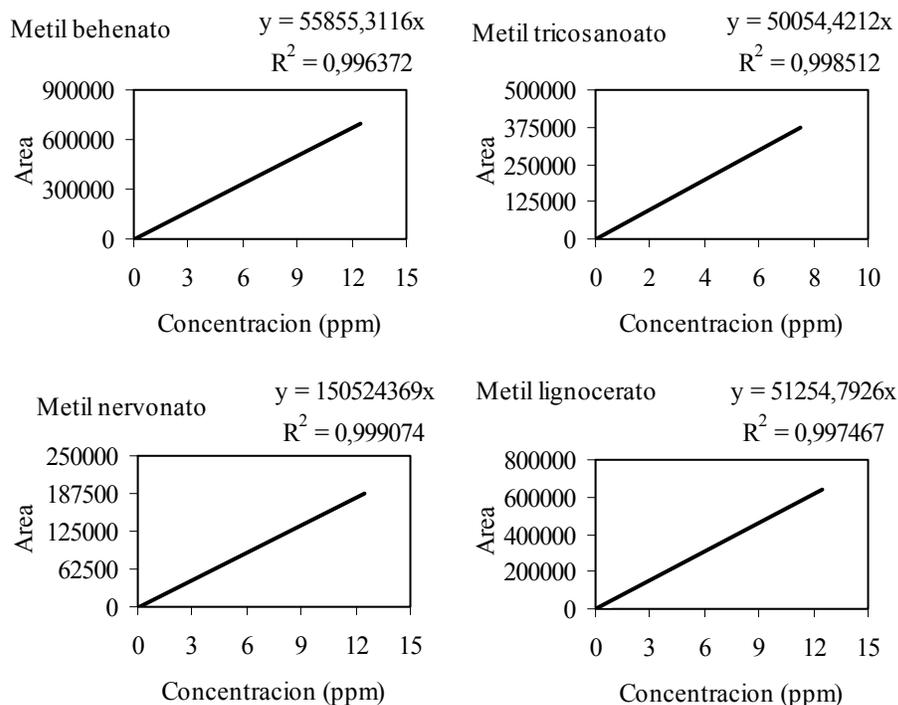


Metil docohexanoato  $y = 4445,3519x$   
 $R^2 = 0,999808$



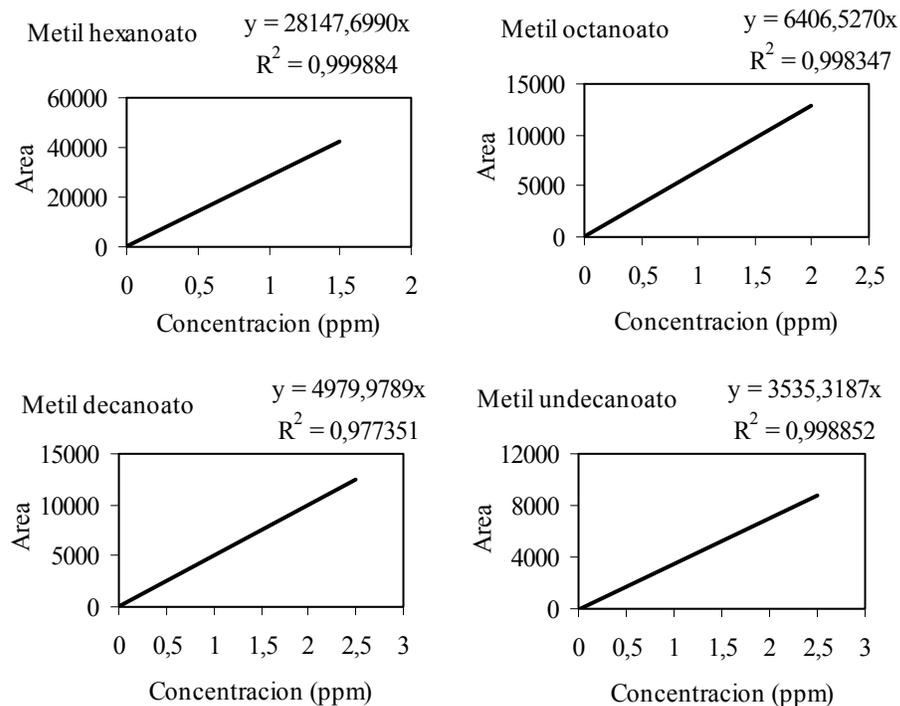
Metil erucato  $y = 14148,6363x$   
 $R^2 = 0,999484$

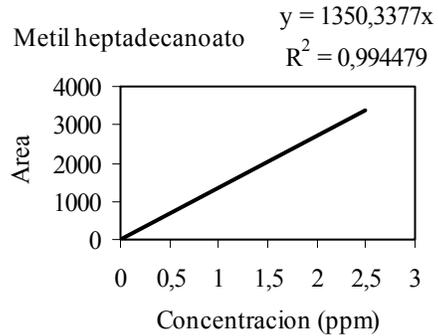
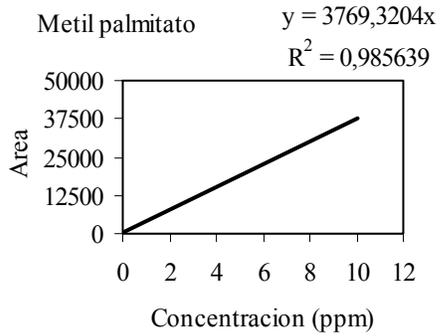
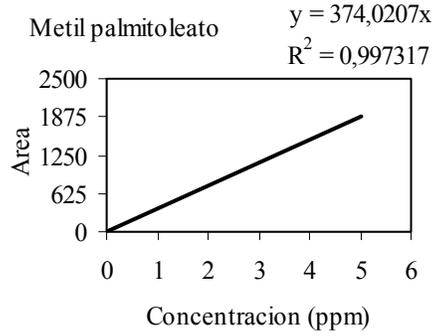
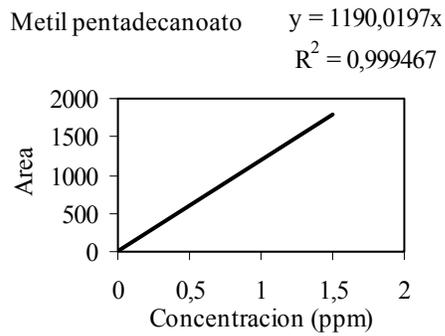
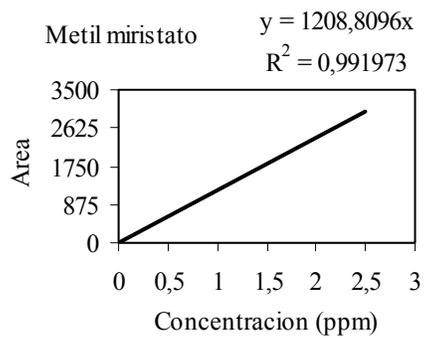
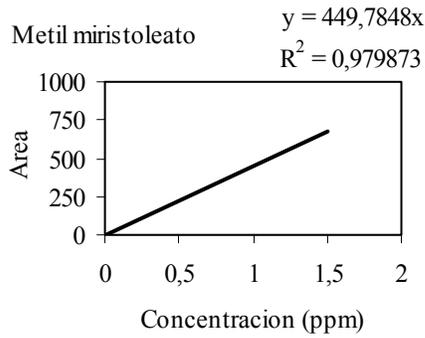
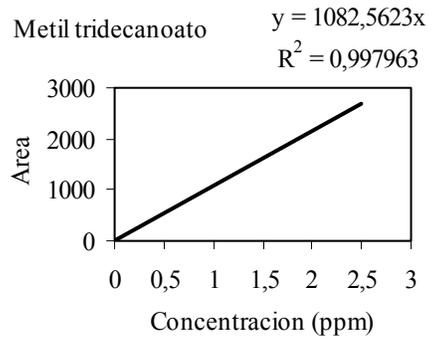
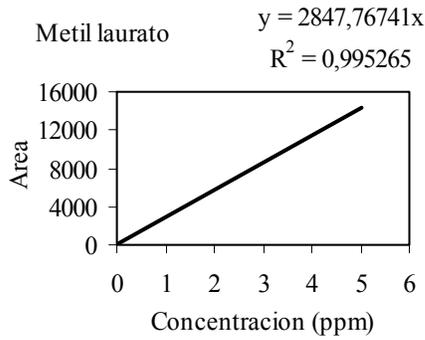


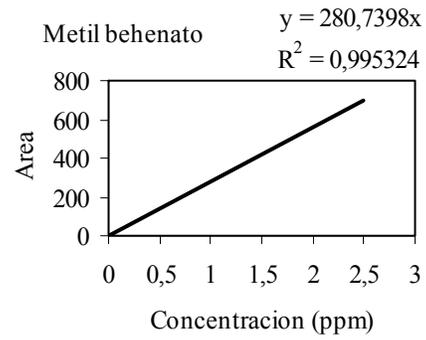
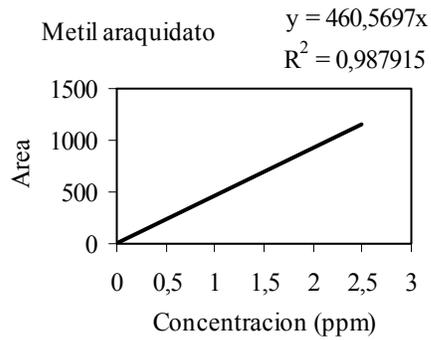
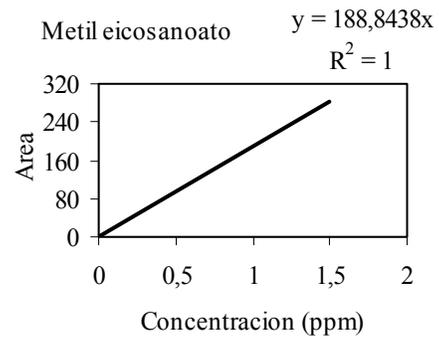
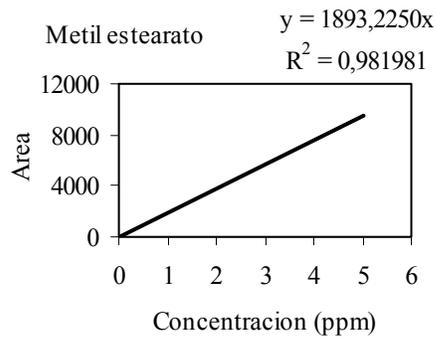
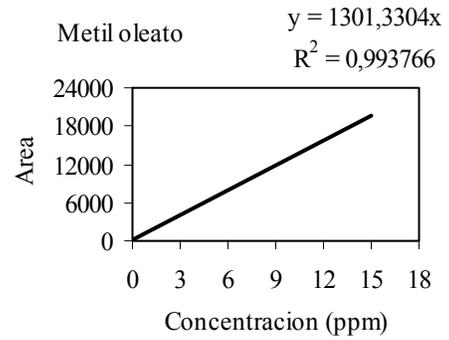
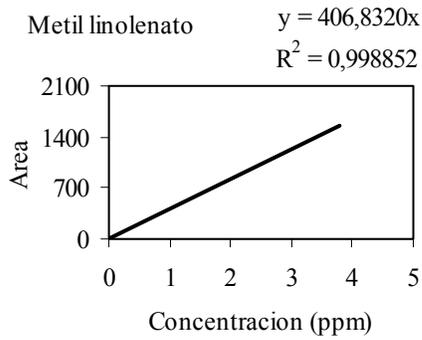


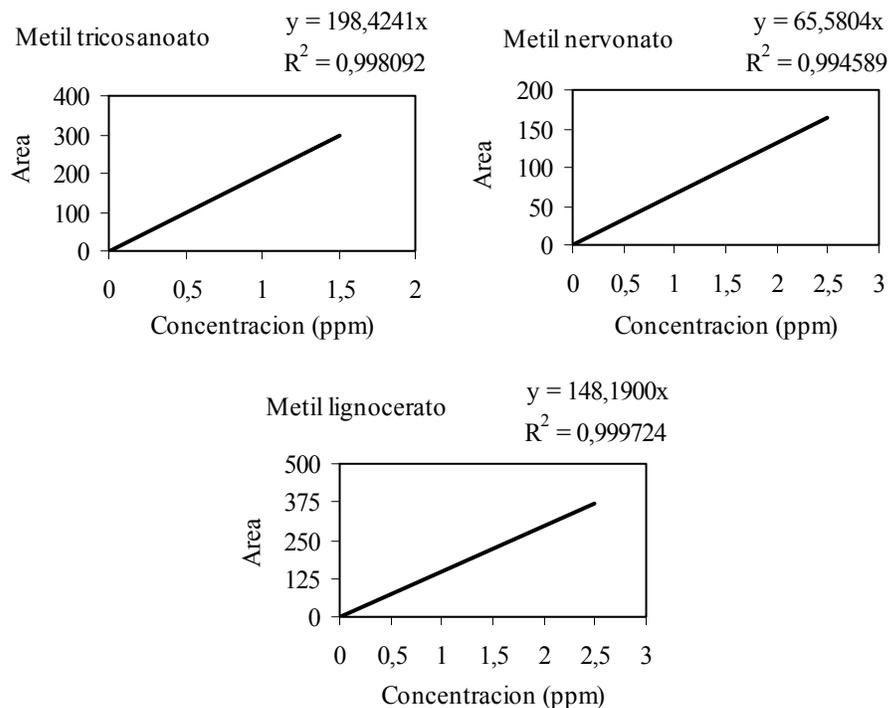
**Figura 17.** Curvas de calibración de los compuestos identificados por IE

Las curvas de calibración obtenidas de los 21 compuestos identificados por el modo de ionización química se muestran en la figura 18.









**Figura 18.** Curvas de calibración de los compuestos identificados por IQ.

### 3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para cada curva de calibración de cada compuesto, se calcularon datos estadísticos necesarios para la estandarización como:

$R^2$ : coeficiente de correlación

SD: desviación estándar

RSD: desviación estándar relativa

LD: límite de detección

LC: límite de cuantificación

LOL: límite de linealidad

Los valores de los parámetros  $R^2$ , SD, RSD, fueron suministrados por el software con el cual se maneja el cromatógrafo.

Los valores de los datos LD y LC se calcularon a partir de la relación señal/ruido; el cual es el más empleado para métodos instrumentales cromatográficos <sup>[1]</sup>. El LC se calculó para la concentración que proporcione una señal 10 (en ocasiones se debe subir este valor hasta 20) veces superior a la señal producida por el ruido de fondo (blanco), el LD será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a éste <sup>[1]</sup>.

El límite de linealidad (LOL) es la concentración a la que la curva de calibración se desvía de la linealidad. El intervalo entre LC y LOL se le denomina intervalo de linealidad <sup>[13]</sup>. Para la cuantificación de este parámetro, se dejó como el nivel del analito cuya concentración tenía buena correlación lineal y no se salía de la línea recta.

En las tablas 7 y 8 se muestran los valores calculado para estas medidas.

Nº de ID	NOMBRE	R <sup>2</sup>	SD (ppm)	RSD (ppmil)	LD (ppm)	LC (ppm)	SENSIBILIDAD (área/ppm)	LOL (ppm)
1	M. hexanoato	0,9999	6,363E+03	2,243E+01	5,520E-03	1,839E-02	3,175E+04	3,750
2	M. octanoato	0,9982	7,410E+03	3,250E+01	5,880E-03	1,960E-02	2,979E+04	10,00
3	M. decanoato	0,9996	1,080E+04	5,428E+01	5,970E-03	1,991E-02	2,933E+04	12,50
4	M. undecanoato	0,9986	8,639E+03	3,485E+01	5,330E-03	1,776E-02	3,289E+04	12,50
5	M. laurato	0,9992	1,143E+04	4,330E+01	4,570E-03	1,524E-02	3,833E+04	25,00
6	M. tridecanoato	0,9992	8,147E+03	3,032E+01	4,910E-03	1,636E-02	3,570E+04	12,50
7	M. miristoleato	0,9997	2,497E+03	3,709E+01	2,115E-02	7,049E-02	8,285E+03	7,500
8	M. miristato	0,9978	1,464E+04	4,621E+01	3,650E-03	1,218E-02	4,796E+04	12,50
9	M. pentadecanoato	0,9965	8,632E+03	2,936E+01	4,440E-03	1,479E-02	3,948E+04	7,500
10	M. palmitoleato	0,9965	2,361E+03	4,047E+01	2,065E-02	6,885E-02	8,483E+03	25,00
11	M. palmitato	0,9986	1,330E+04	3,044E+01	2,950E-03	9,840E-03	5,932E+04	50,00
12	M. heptadecanoato	0,9983	1,094E+04	2,652E+01	3,380E-03	1,128E-02	5,177E+04	12,50
13	M. linolenato	0,9993	6,555E+03	2,398E+01	5,110E-03	1,703E-02	3,429E+04	25,00
14	M. oleato	0,9991	2,432E+03	2,718E+01	1,492E-02	4,973E-02	1,174E+04	75,00
15	M. estearato	0,9993	9,683E+03	2,055E+01	2,990E-03	9,970E-03	5,855E+04	25,00
16	M. eicosapentanoato	0,9987	1,609E+03	2,864E+01	2,419E-02	8,065E-02	7,241E+03	12,50
17	M. eicosanoato	0,9980	3,241E+03	3,904E+01	1,443E-02	4,809E-02	1,214E+04	7,500
18	M. araquidato	0,9987	1,394E+04	3,761E+01	3,290E-03	1,098E-02	5,321E+04	12,50
19	M. docosahexanoato	0,9998	4,178E+02	1,006E+01	3,941E-02	1,314E-01	4,445E+03	12,50
20	M. erucato	0,9995	3,382E+03	3,195E+01	1,238E-02	4,128E-02	1,415E+04	7,500
21	M. behenato	0,9964	1,212E+04	3,000E+01	3,140E-03	1,046E-02	5,586E+04	12,50
22	M.tricosanoato	0,9985	1,267E+04	3,547E+01	3,500E-03	1,167E-02	5,005E+04	7,500
23	M. nervonato	0,9991	4,044E+03	3,776E+01	1,164E-02	3,880E-02	1,505E+04	12,50
24	M. lignocerato	0,9975	1,216E+04	3,351E+01	3,420E-03	1,139E-02	5,125E+04	12,50

**Tabla 7.** Datos estadísticos para la calibración por el modo IE.

Los valores R<sup>2</sup> se acercan mucho al valor ideal el cual es 1, el promedio de estos es de 0,99859, lo que indica que en general todas las curvas de calibración correlacionan con una línea recta.

La precisión del método la cual es expresada en términos de desviación estándar (SD) o desviación estándar relativa (RSD). Ambas indican que el método es reproducible. El promedio de los valores de RSD es de 32,64 ppmil, siendo la mayor de 54,278 ppmil siendo este el metil decanoato, a parte de este los valores de RSD no sobrepasan el 50 ppmil mostrando que el método es reproducible.

Para el LD menor es de 0,00295 ppm y el mayor es de 0,03941 ppm, estos valores son más que aceptables ya que los ácidos grasos se encuentran en aceites y grasas como componentes mayoritarios, por lo tanto sus concentraciones son muy elevadas. Además este parámetro es un dato cualitativo.

Para el LC tiene valores entre 0,00984 y 0,13137 ppm, también son valores muy buenos, porque como se dijo anteriormente los ácidos grasos son componentes mayoritarios, la mayoría de estos están en concentraciones mayores que estas.

Con estos valores tan bajos se pueden evitar los falsos positivos y falsos negativos <sup>[1]</sup>.

La sensibilidad de cada método se tomó como la pendiente de la curva de calibración, en general las curvas tienen una buena sensibilidad en con un promedio de 32545,34 (área/ppm)

El límite de linealidad varía entre los compuestos, para algunos ácidos grasos los cuales son mayoritarios en una gran cantidad de matrices, el límite es bajo, como por ejemplo el ácido oleico, palmítico, palmitoleico, linoleico, que al momento de hacer los análisis se pueden salir del rango de linealidad, haciendo necesario realizar diluciones de las muestras. Para otros ácidos grasos que no se encuentran en concentraciones tan altas, los límites de linealidad son aceptables, debido a que en general se encuentran en estos rangos.

Por el modo de IQ los coeficientes de correlación tienen en promedio un valor de 0,99365, indicando que existe correlación con una probabilidad elevada.

Las desviaciones estándar y las desviaciones estándar relativas muestran que el método es reproducible. Al no salir del valor límite de RSD el cual es de 50 ppmil, el promedio de este parámetro es de 10,78 ppmil, se muestra que el método es reproducible.

Los límites de detección por el modo de IQ también son adecuados, exceptuando al metil nervonato el cual tiene límites de detección y de cuantificación altos (en comparación con los demás) 2,67 y 8,90 ppm respectivamente. Para los demás, el promedio de estos valores es de 0,3161 y 1,0538 ppm, teniendo en cuenta como se dijo anteriormente que los ácidos grasos son componentes mayoritarios, estos valores son aceptables.

Nº de ID	NOMBRE	R <sup>2</sup>	SD (ppm)	RSD (ppmil)	LD (ppm)	LC (ppm)	SENSIBILIDAD (área/ppm)	LOL (ppm)
1	M. hexanoato	0,9999	1,848E+03	6,889	6,220E-03	2,075E-02	2,815E+04	1,500
2	M. octanoato	0,9984	6,505E+02	10,67	2,735E-02	9,116E-02	6407	2,000
3	M. decanoato	0,9774	5,277E+02	11,33	3,518E-02	0,1173	4980	2,500
4	M. undecanoato	0,9989	4,386E+02	13,23	4,956E-02	0,1652	3535	2,500
5	M. laurato	0,9953	2,460E+02	9,093	6,152E-02	0,2051	2848	5,000
6	M. tridecanoato	0,9980	6,768E+01	6,468	0,1618	0,5395	1083	2,500
7	M. miristoleato	0,9799	2,427E+01	5,468	0,3895	1,298	449,8	1,500
8	M. miristato	0,9920	8,561E+01	7,362	0,1449	0,4831	1209	2,500
9	M. pentadecanoato	0,9995	6,005E+01	5,153	0,1472	0,4908	1190	1,500
10	M. palmitoleato	0,9973	2,609E+01	7,257	0,4684	1,561	374,0	5,000
11	M. palmitato	0,9856	7,143E+02	21,36	4,648E-02	0,1549	3769	10,00
12	M. heptadecanoato	0,9945	1,189E+02	9,281	0,1298	0,4325	1350	2,500
13	M. linolenato	0,9989	1,207E+02	35,36	0,4306	1,435	406,8	3,800
14	M. oleato	0,9938	3,707E+02	34,10	0,1346	0,4488	1301	15,00
15	M. estearato	0,9820	3,138E+02	18,35	9,254E-02	0,3085	1893	5,000
16	M. eicosanoato	1,000	2,233	1,185	0,9278	3,093	188,8	1,500
17	M. araquidato	0,9879	3,402E+01	7,455	0,3804	1,268	460,6	2,500
18	M. behenato	0,9953	1,741E+01	6,325	0,6241	2,080	280,7	2,500
19	M. tricosanoato	0,9981	4,442	2,216	0,8830	2,943	198,4	1,500
20	M. nervonato	0,9946	4,415	6,646	2,672	8,905	65,58	2,500
21	M. lignocerato	0,9997	1,796	1,216	1,182	3,941	148,2	2,500

**Tabla 8.** Datos estadísticos para la calibración por el modo IQ.

La sensibilidad del modo de IQ es mas baja que la del modo de IE, en promedio es de 2870,75 área/ppm, pero a compuestos como el metil nervonato cuya sensibilidad es de 65,58 área/ppm.

Los límites de linealidad, también son más bajos por el modo de IQ, el valor más alto es el del metil oleato, siendo de 15 ppm, en comparación con el modo de IE este valor es muy bajo, aproximadamente 3,6 veces menor. El límite de linealidad en promedio tiene valor de 3,61 ppm, siendo bajo, teniendo en cuenta que los ácidos son mayoritarios.

Comparando los parámetros estadísticos entre el modo de IE y el de IQ, las curvas de calibración por ambos modos de ionización correlacionan con una línea recta.

También ambos métodos son repetibles con sus RSD por debajo del limite 50 ppmil, pero comparando los valores entre los dos modos, en general los valores de RSD son menores por el modo de IQ, aproximadamente los valores por IE son tres veces mayores que los de IQ.

Los límites de detección y de cuantificación son menores con el modo de IE. En general los límites de detección y cuantificación por IQ son 45 veces mayores que por IE, siendo mejores las cuantificaciones por el modo de ionización de IE cuando los ácidos grasos están en concentraciones bajas cercanas al 5%.

Como se pudo ver desde el scan de los patrones, la sensibilidad por el modo IE es mucho mayor que por el modo de IQ. En promedio la sensibilidad por el modo de ionización de IE es 11 veces mayor que la del modo de IQ. Lo que indica que por IE se puede diferenciar más fácilmente pequeñas diferencias entre concentraciones.

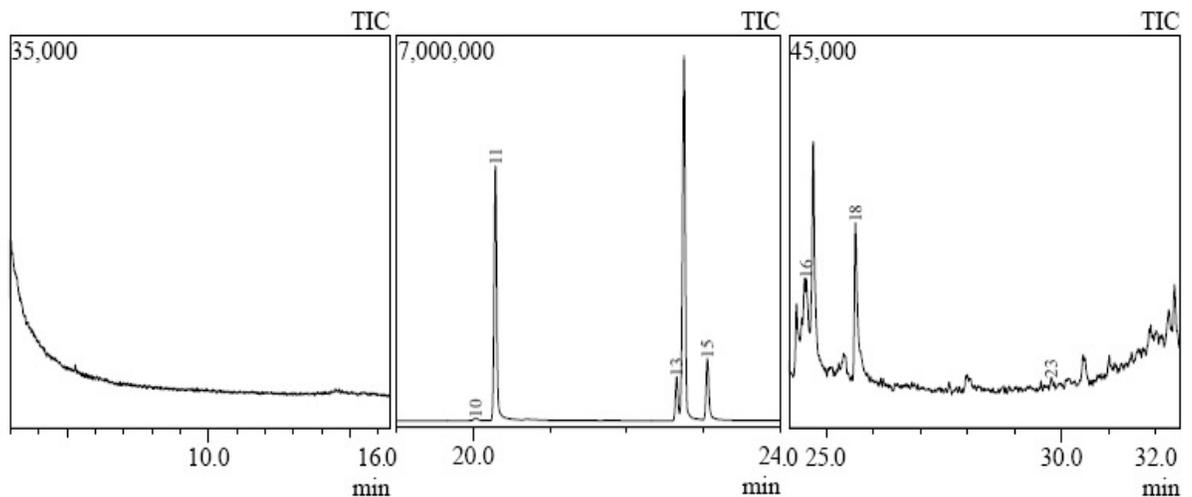
Los intervalos de linealidad que van desde el limite cuantificación hasta el limite de linealidad, para ambos modos de ionización son bajos, sabiendo que los ácidos grasos se encuentran en concentraciones altas, haciendo necesario en ocasiones la realización de diluciones de la muestra.

### 3.4 ANÁLISIS DE MUESTRA REAL

El análisis cromatográfico de la muestra de aceite de crisálida previamente esterificada, arrojó como resultado al ácido oleico se presenta en mayor proporción con un 43,752%, siguiéndole a este en concentración en la muestra aparece el ácido palmítico con un porcentaje de 26,300%.

Como ácidos en menor proporción, se encuentran los ácidos esteárico, linolénico, y palmítico en concentraciones menores al 10%.

En la figura 19 se muestra el cromatógrama total de iones del aceite de la crisálida del gusano de seda, este cromatógrama se muestra cortado, para exponer las abundancias de los picos más grandes sin afectar las de los picos más pequeños o menos abundantes.



**Figura 19.** Cromatógrama total de iones del aceite de crisálida de gusano de seda previamente esterificado.

En la tabla 9, se muestra los porcentajes de los ácidos grasos pertenecientes al aceite de la crisálida del gusano de seda.

ACIDO GRASO	PORCENTAJE (%)
Palmitoleico	0,851
Palmitico	26,300
Linolenico	5,656
Oleico	43,752
Esteárico	6,655

**Tabla 9.** Porcentaje de ácidos grasos en la muestra real (aceite de crisálida).

### 3.5 INTERFERENCIAS

Las interferencias se pueden originar en la fase pre-analítica y en la fase analítica de las pruebas <sup>[18]</sup>.

Las interferencias pre-analíticas se pueden producir en cualquiera de estas fases: al momento de la toma de la muestra; cuando la conservación de la muestra no se hace a temperaturas adecuadas; lapsos largos de tiempo entre extracción del aceite de la muestra, derivatización de la muestra y el momento del análisis cromatográfico, y al momento mismo de la extracción del aceite (si la muestra lo amerita) y la derivatización debida a la calidad de los reactivos utilizados.

Estas interferencias se pueden controlar, primero capacitando al personal que toma la muestra, minimizando el tiempo entre la toma y el análisis y manteniéndola refrigerada. El analista debe recibir la muestra y mantenerla refrigerada, si a la muestra se le debe practicar la extracción del aceite por el método soxhlet hacerlo en el menor tiempo después de recibida la muestra, si la muestra ya es una materia oleosa, se debe conservar protegida de la luz y a temperaturas adecuadas, evitando la degradación que puede ser fotoquímica, causada por hongos o por la temperatura.

Al momento de la extracción, el reactivo debe cumplir con una calidad previamente establecido, en caso de ser solvente reutilizado, debe ser procesado para eliminar contaminaciones. Los reactivos de la derivatización deben ser anhidros, por este motivo se utiliza la mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH por su fácil preparación en comparación con la mezcla HCl/MeOH al 5%, minimizando la probabilidad de que la mezcla quede con trazas de agua <sup>[16]</sup>. La concentración de la mezcla también debe ser baja, porque a concentraciones de 20% el ácido graso sufre oxidaciones en sus dobles enlaces, formando compuestos que podrían interferir posteriormente. El hexano utilizado para realizar la extracción del metiléster, después de ser derivatizado, debe ser calidad cromatográfica porque es el paso inmediatamente anterior al análisis cromatográfico.

Las inferencias analíticas se pueden clasificar en: interferías que cambian la concentración del analito e interferencias que afectan el equipo o sus componentes.

Las interferencias que cambian la concentración del analito, se pueden controlar gracias a la herramienta del cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, que es el modo SIM en español, monitoreo de ión seleccionado. Esta herramienta proporciona la opción de solo cuantificar los picos cromatográficos que cumplan con  $\frac{m}{z}$  en abundancias específicas, seleccionados por el analista.

Respecto a las interferencias que pueden afectar los componentes del equipo, se controlan a partir de la extracción misma del aceite usando el dedal de tela donde se encuentra el material sólido para extraérsele el aceite. Durante la esterificación se controla que el material volumétrico este seco, y al momento de la separación de los metilesteres con el hexano, se realizan centrifugaciones para eliminar partículas que puedan obstruir la columna del cromatógrafo de gases.

### 3.6 TIEMPO Y COSTOS DEL ANÁLISIS

Para hacer el cálculo de cuanto costaría un análisis, se debe tener en cuenta los costos ABC o costos directos. Estos costos equivalen a los costos de personal, materiales, uso de equipos y servicios públicos (en la UTP los laboratorios no pagan servicios públicos ni arriendo, pero un 20% de lo que cobran por análisis es apropiado por la Universidad).

En estos costos no se tienen en cuenta las ganancias o recaudos para reinversión en el laboratorio.

MATERIAL O REACTIVO USADO	PRECIO POR MUESTRA
Equipo soxhlet	\$ 46,60
Hexano	\$ 6.394,50
Rotavaporador	\$ 500,00
Plancha de calentamiento	\$ 21.000,00
Mechero	\$ 4.800,00
Balanza	\$ 694,00
Ácido sulfúrico concentrado	\$ 20,00
Metanol absoluto	\$ 50,11
Hexano calidad cromatográfica	\$ 2.020,00
Pipetas Pasteur (2 unid)	\$ 500,00
Centrifuga	\$ 45.000,00
Tubo centrifuga	\$ 2.000,00
Vial de 2 mL	\$ 2.300,00
Cromatógrafo	\$ 23.300,00
Analista	\$ 12.000,00

Dirección técnica	\$ 20.000,00
Estandarización (100 muestras)	\$ 3.417,91
Porcentaje para gastos administrativos de la UTP (20%)	\$ 28.808,62
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 172.851,74</b>

**Tabla 10.** Presupuesto para el análisis de una muestra.

Después de que la técnica fue estandarizada, el laboratorio de olequímica tiene una herramienta moderna, eficaz y económica para realizar análisis de ácidos grasos usando sus derivados, obteniendo resultados confiables y repetibles.

Comparando este valor con precios de laboratorios pertenecientes a universidades prestigiosas de la región el cual esta entre \$144.608 a \$240.000 para semi-cuantificaciones o solo perfiles cromatográficos, el primero con detector de EM y el segundo con detector de ionización en llama. Si se desea una cuantificación se debe mandar el estándar y su precio aumenta a \$173.068 con detector de EM.

A nivel internacional en países como Argentina y México los precios de estos análisis (perfiles cromatográficos) oscilan entre USD 77 y USD 123, que pasando estos valores a pesos colombianos es de \$141.804 y \$226.549 sin tener en cuenta el valor del envío,

Comparando el valor obtenido para la estandarización con los costos de laboratorios en otras universidades, el precio es competitivo sabiendo que en estos últimos solo hacen perfiles cromatográficos, mientras que si se prestaría el servicio a la comunidad seria una cuantificación.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, usando los modos de ionización de impacto electrónico e ionización química para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos grasos.
- La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para el análisis de metilesteres de ácidos grasos expuso muy buenos valores para los parámetros estadísticos necesarios para la cuantificación de estos;  $R^2$  cercanos a la unidad en promedio 0,99615; valores que se encuentran dentro de 2 SD, y RSD que no sobrepasan el límite de 50 ppmil.
- Los límites de detección y de cuantificación están por debajo de 0,0030 ppm y por encima de 0,0098 ppm respectivamente. Lo que permite un adecuado nivel de cuantificación de ácidos grasos están en concentraciones bajas, sin reportar falsos positivos y falsos negativos. Estos parámetros obtuvieron valores más altos por el modo de ionización por impacto electrónico (IE) (en promedio 0,00945 y 0,03150 ppm para LD y LC respectivamente) que por el modo de ionización química (IQ) (en promedio 0,42832 y 1,42774 ppm respectivamente), aunque esto no es de mucha relevancia, porque los ácidos grasos están en concentraciones altas y no en trazas.
- La sensibilidad es mucho mayor por el modo de IE que por el modo de IQ, aproximadamente 11,33 veces mayor, lo que demuestra que la cuantificación dará mejores resultados al hacerse por el modo de IE; aunque es bueno realizar la inyección de la muestra por el modo de IQ para una buena identificación, debido a que la identificación por IQ es un complemento a la de IE, debido a que en esta se utilizan m/z como 74, 81, 79, y 69, los cuales son comunes para la mayoría, algunos con abundancias relativas de 100 y otros con abundancias menores, haciendo que la identificación se ardua, mientras que con la ionización química aparecen m/z como  $[M+1]^+$  y  $[M-31]^+$  los cuales son únicos para muchos metilesteres de ácidos grasos saturados y monoinsaturados respectivamente.
- Los análisis reportaron como ácidos grasos mayoritarios en el aceite de la crisálida del gusano de seda, al ácido oleico con 43,752 %, ácido palmítico con 26,300% y a los ácidos esteárico, linolenico, palmitoleico en concentraciones menores a 10%, siendo el mayor de estos tres el ácido esteárico.

- Con la estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se proporciona una herramienta de análisis con la cual se puede reportar resultados confiables y repetibles, la cual es necesaria en un laboratorio como el de oleoquímica, donde se realizan investigaciones sobre aceites, oleorresinas, biocombustibles, entre otros.
- El control a las interferencias se hace desde el momento en que se hace al extracción del aceite de la muestra (crisálidas de gusano de seda en este caso), pasando por el control al momento de la esterificación interviniendo que la concentración de la solución sea la adecuada, y que contengan materiales que intervengan en el análisis. El mayor control de las interferencias se hace al momento del análisis cromatográfico, gracias a la herramienta del detector del cromatógrafo, que nos la opción de solo cuantificar los picos que cumplan con iones en abundancias determinadas.
- El precio del análisis después de estandarizada la técnica, es competitivo con los precios que tienen otros laboratorios de universidades prestigiosas de Colombia, teniendo en cuenta que el análisis hecho en estas universidades con perfiles cromatográficos o semi-cuantificaciones algunas de estas por detector de ionización en llama.

## 5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar una columna polar, específica para FAMES como por ejemplo FAMEWAX con el objeto de analizar y cuantificar isómeros de ácidos insaturados cis y trans; para totalizar los analitos del estándar comercial de la identificación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGUIRRE ORTEGA, L., et al., *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F. Industria. 2001, España.
2. RIUS, F.X., et al., *La validación de métodos analíticos*. Revista Técnicas de laboratorio, 2000. **252**: p. 382-385.
3. DAYHUFF, L.-E. and M.J.M. WELLS, *Identification of fatty acids in fishes collected from the Ohio River using gas chromatography-mass spectrometry in chemical ionization and electron impact modes*. Journal of Chromatography A, 2005. **1098**(1-2): p. 144-149.
4. NARVÁEZ RINCÓN, P.C., et al., *Determinación por cromatografía de gases de alquil ésteres (metílico y etílico) de ácidos grasos, en presencia de mono, di y triglicéridos*, in *Revista ingeniería e investigación*. 2005: Bogotá. p. 58 - 62.
5. SEPPANEN-LAAKSO, T., I. LAAKSO, and R. HILTUNEN, *Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition*. Analytica Chimica Acta, 2002. **465**(1-2): p. 39-62.
6. LONDOÑO DUQUE, B., *Diagnostico actual de la oleoquímica en Colombia*. 2004, Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. Tecnología Química.
7. CENIPALMA. [cited 2006 5 de abril]; Centro de investigación en palma de aceite. Oleoquímica (en línea). Available from: [www.cenipalma.org/oleoq.htm](http://www.cenipalma.org/oleoq.htm).
8. TABARES GAVIRIA, P.A., *Situación actual de la sericultura en Colombia frente a la sericultura en el mundo*. 2004, Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. Tecnología Química:
9. COY, G.A., *Protocolo. Estandarización de métodos analíticos*, ed. I.D.E.A.M.P.F. Ambiental. 1999, Bogotá. 4 - 5.
10. RILEY, C.M. and T.W. ROSANKE, *Development and validation of analytical methods*. 1 ed, ed. E. Science. 1996, Great Britain.
11. McNAIR, H.M. and J.M. MILLER, *Basic Gas Chromatography*, ed. I. JOHN WILEY & SONS. 1997.

12. McNAIR, H.M., *Cromatografía de gases*, ed. p.r.d.d.c.y.t. secretaria general de la OEA. 1981, Washington, D.C.
13. SKOOG, D.A., F.J. HOLLER, and A.T. NIEMAN, *Principios de análisis instrumental*. 5° ed, ed. M.G. Hill. 2001, España.
14. McLAFFERTY, F.W. and F. TURECEK, *Interpretation of mass spectra*. 4 ed, ed. U.s. books. 1993, Sausalito, California.
15. CARDONA P, L. and P.A. GONZALES P, *Obtención y caracterización de la resina del ajo (Allium sativum)*. 2007, Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. Tecnología Química.
16. CHRISTIE, W.W., *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. Advances in lipid methodology, 1993. 2: p. 69 - 111.
17. NIÑO OSORIO, J., *Manual de practicas. Química organica II*, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de química.
18. *REVISTA INFORMATIVA. ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA* [cited 2007 23 abril 2008]; Revista informativa, N°159 - 2000. Interferencias en los resultados de los análisis: un problema sin resolver]. Available from: [http://www.ab-online.org.ar/publicaciones/body\\_r\\_informat159\\_diferencias.htm](http://www.ab-online.org.ar/publicaciones/body_r_informat159_diferencias.htm).

## ANEXOS

### ANEXO 1. Certificado de análisis del estándar comercial



### CERTIFICATE OF ANALYSIS

110 Benner Circle  
Bellefonte, PA 16823-8812  
Tel.: (800)356-1688  
Fax: (814)353-1309

FOR LABORATORY USE ONLY—READ MSDS PRIOR TO USE.

Cat. No.: 35078 Lot No.: A038629  
Description: NLEA FAME Mix  
Expiration Date: August 2008 Storage: Freezer

Carbon Number	Compound	Percent Purity <sup>1</sup>	Composition (weight%) <sup>2</sup>	Percent Uncertainty <sup>3</sup>
4:0	Methyl butyrate	99.8%	1.5%	+/- 0.05%
6:0	Methyl hexanoate	99.9%	1.5%	+/- 0.05%
8:0	Methyl octanoate	99.6%	2.0%	+/- 0.04%
10:0	Methyl decanoate	99.8%	2.5%	+/- 0.03%
11:0	Methyl undecanoate	99.6%	2.5%	+/- 0.03%
12:0	Methyl laurate	99.7%	5.0%	+/- 0.02%
13:0	Methyl tridecanoate	99.7%	2.5%	+/- 0.03%
14:0	Methyl myristate	99.8%	2.5%	+/- 0.03%
14:1	Methyl myristoleate (cis-9)	99.4%	1.5%	+/- 0.05%
15:0	Methyl pentadecanoate	99.9%	1.5%	+/- 0.05%
16:0	Methyl palmitate	99.7%	10.0%	+/- 0.01%
16:1	Methyl palmitoleate (cis-9)	99.8%	5.0%	+/- 0.02%
17:0	Methyl heptadecanoate	99.9%	2.5%	+/- 0.03%
18:0	Methyl stearate	99.7%	5.0%	+/- 0.01%
18:1	Methyl oleate (cis-9)	99.6%	15.0%	+/- 0.03%
18:1	Methyl elaidate (trans-9)	99.8%	2.5%	+/- 0.03%
18:2	Methyl linoleate (cis-9,12)	99.8%	10.0%	+/- 0.01%
18:2	Methyl linoelaidate (trans-9,12)	99.5%	2.5%	+/- 0.03%
18:3	Methyl linolenate (cis-9,12,15)	99.6%	5.0%	+/- 0.01%
20:0	Methyl arachidate	99.6%	2.5%	+/- 0.03%
20:1	Methyl eicosenoate (cis-11)	99.4%	1.5%	+/- 0.05%
22:0	Methyl behenate	99.9%	2.5%	+/- 0.03%
22:1	Methyl erucate (cis-13)	99.9%	1.5%	+/- 0.05%
23:0	Methyl tricosanoate	99.9%	1.5%	+/- 0.05%
24:0	Methyl lignocerate	99.6%	2.5%	+/- 0.03%
20:5	Methyl eicosapentaenoate (cis-5,8,11,14,17)	99.3%	2.5%	+/- 0.03%
24:1	Methyl nervonate (cis-15)	99.5%	2.5%	+/- 0.03%
22:6	Methyl docosahexaenoate(cis-4,7,10,13,16,19)	99.8%	2.5%	+/- 0.03%
<b>Solvent:</b>	Methylene Chloride	99.9%		

NOTES: Weight % of each compound listed above is before dilution in Methylene Chloride.

Actual concentration of the standard is 30 mg/ml.



<sup>1</sup>As determined by capillary GC/FID. Value rounded to the nearest tenth of a percent.

<sup>2</sup>Based upon gravimetric preparation with balance calibration verified using NIST traceable weights.

<sup>3</sup>Percent uncertainty based upon balance accuracy.

MANUFACTURED UNDER RESTEK'S ISO 9001  
REGISTERED QUALITY SYSTEM



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

PAGE 2

FOR LABORATORY USE ONLY—READ MSDS PRIOR TO USE.

Cat. No.: 35078 Lot No.: A038629  
Description: NLEA FAME Mix

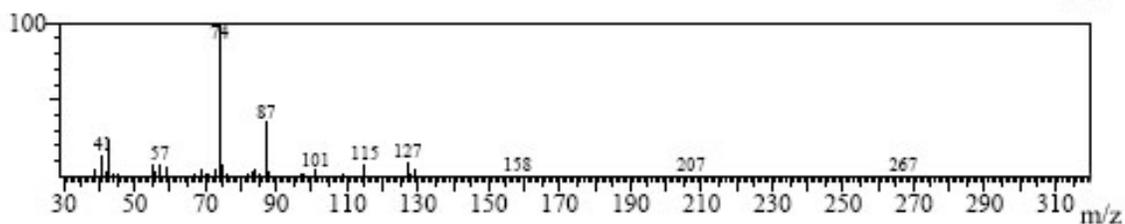
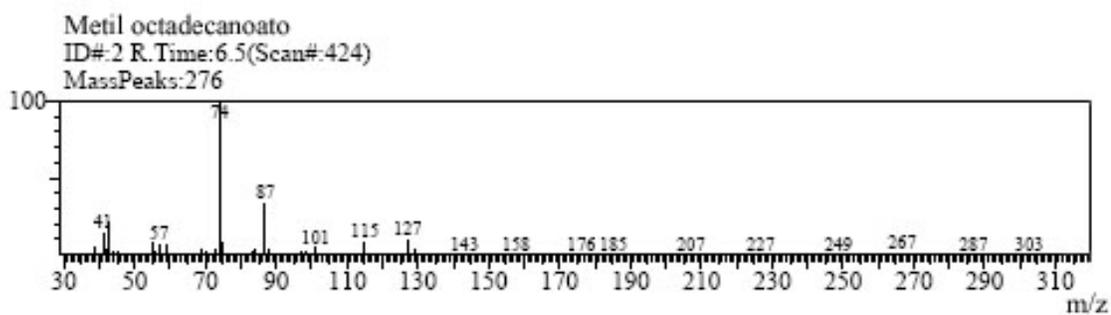
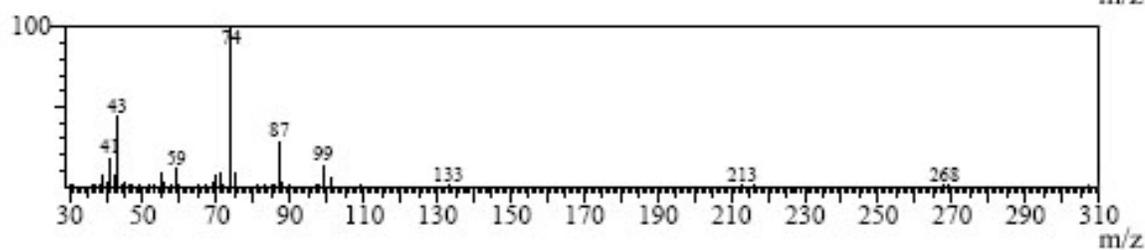
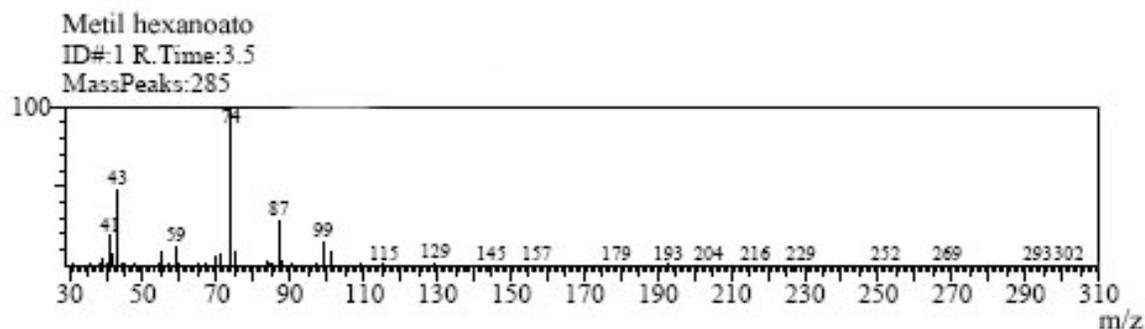
Elution Order	Compound
1	Methyl butyrate
2	Methyl hexanoate
3	Methyl octanoate
4	Methyl decanoate
5	Methyl undecanoate
6	Methyl laurate
7	Methyl tridecanoate
8	Methyl myristate
9	Methyl myristoleate(cis-9)
10	Methyl pentadecanoate
11	Methyl palmitate
12	Methyl palmitoleate(cis-9)
13	Methyl heptadecanoate
14	Methyl stearate
15	Methyl elaidate(trans-9)
16	Methyl oleate(cis-9)
17	Methyl linoelaidate(trans-9,12)
18	Methyl linoleate(cis-9,12)
19	Methyl arachidate
20	Methyl eicosenoate(cis-11)
21	Methyl linolenate(cis-9,12,15)
22	Methyl behenate
23	Methyl erucate(cis-13)
24	Methyl tricosanoate
25	Methyl eicosapentaenoate(cis-5,8,11,14,17)
26	Methyl lignocerate
27	Methyl nervonate(cis-15)
28	Methyl docosahexaenoate(cis-4,7,10,13,16,19)

Column: 30m .32mm .25µm  
**Famewax (cat.#12498)**  
Carrier gas: hydrogen @ 40cm/sec.  
Temp. program: 100°C (hold 4 min.)  
to 240°C @ 3°C/min.  
Inj. temp.: 200°C  
Det. temp.: 250°C  
Detector type: FID

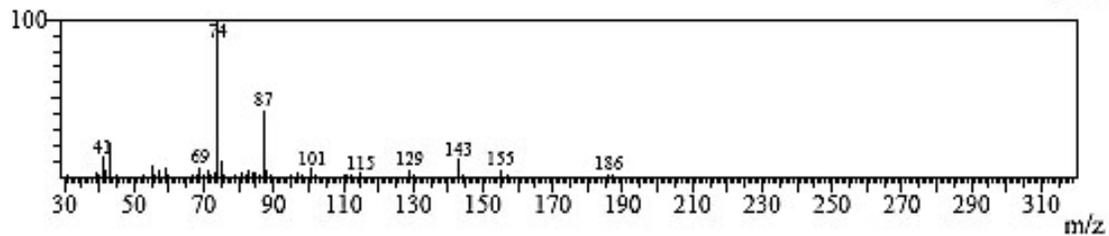
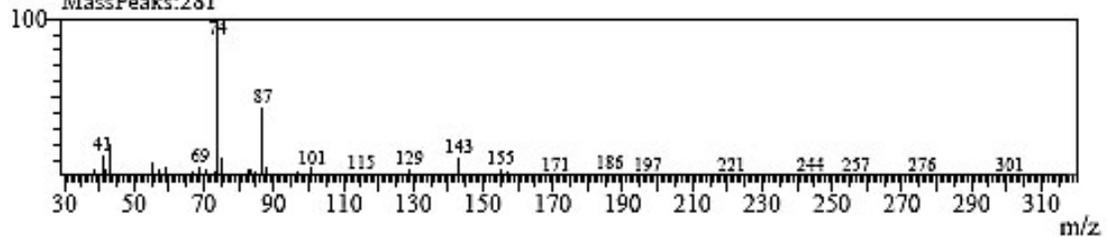
John Lidgett—QA Analyst

MANUFACTURED UNDER RESTEK'S ISO 9001  
REGISTERED QUALITY SYSTEM

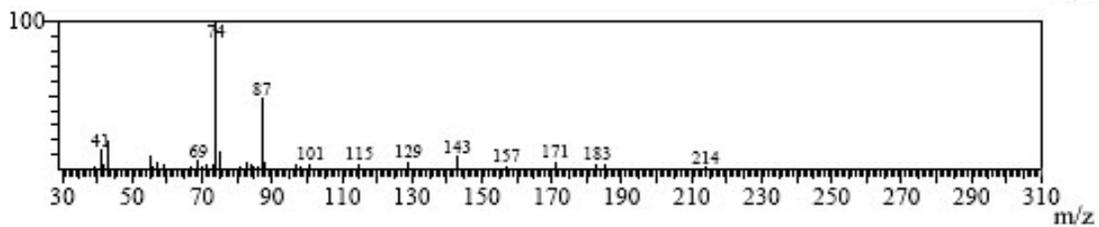
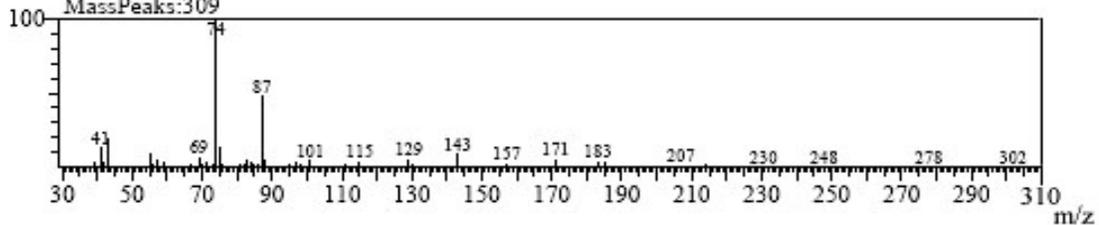
**ANEXO 2. Espectros de masas por impacto electrónico de los compuestos identificados del estándar y su comparación.**



Metil decanoato  
ID#3 R.Time:10.3  
MassPeaks:281



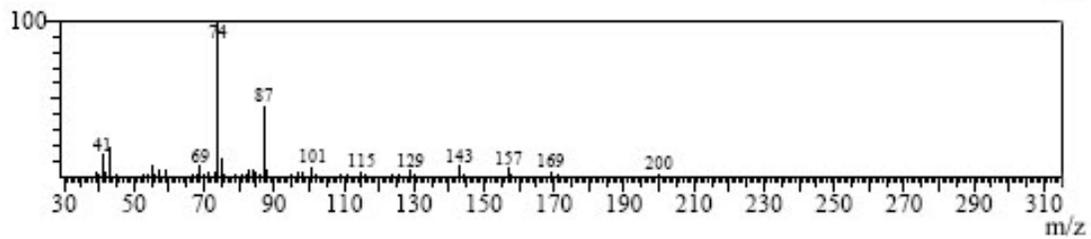
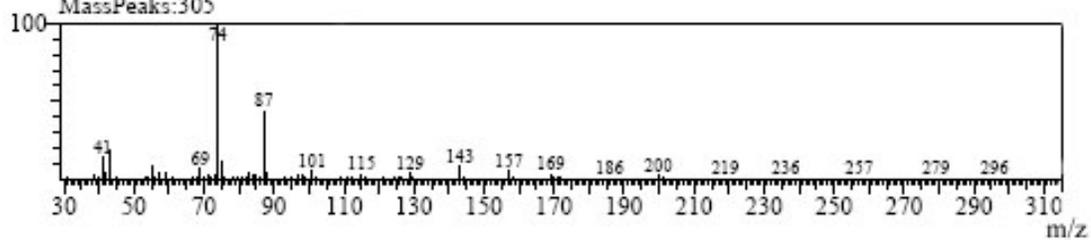
Metil laurato  
ID#5 R.Time:14.0  
MassPeaks:309



Metil undecanoato

ID#:4 R.Time:12.2

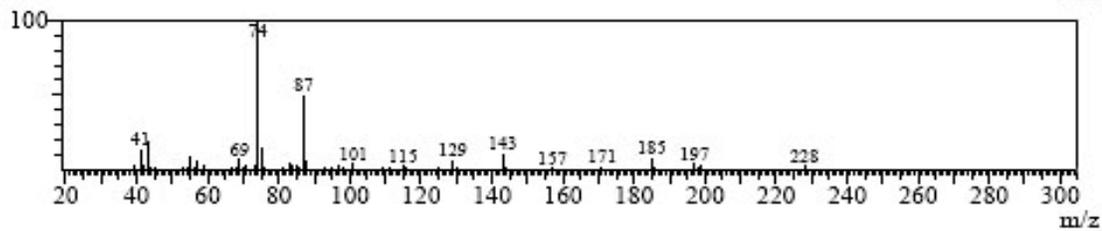
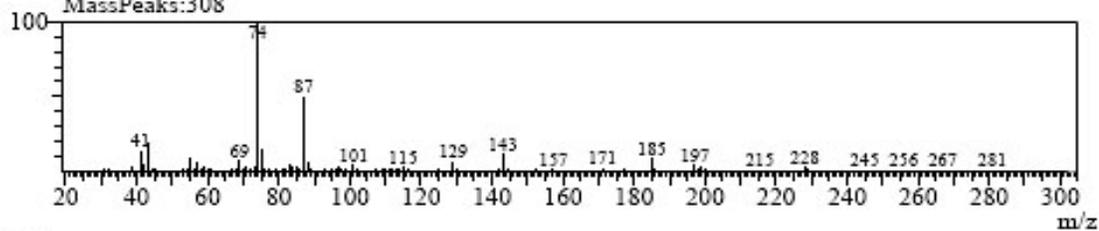
MassPeaks:305



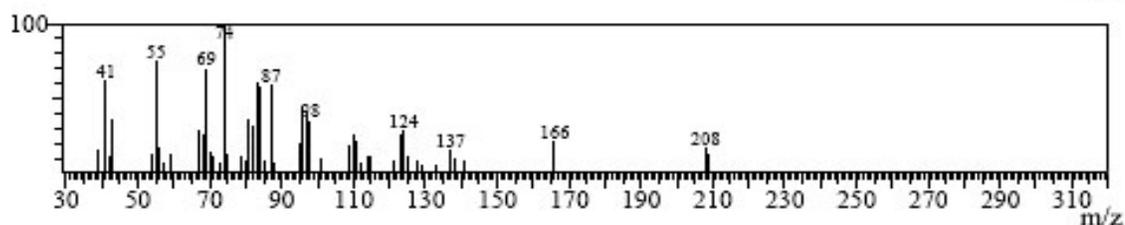
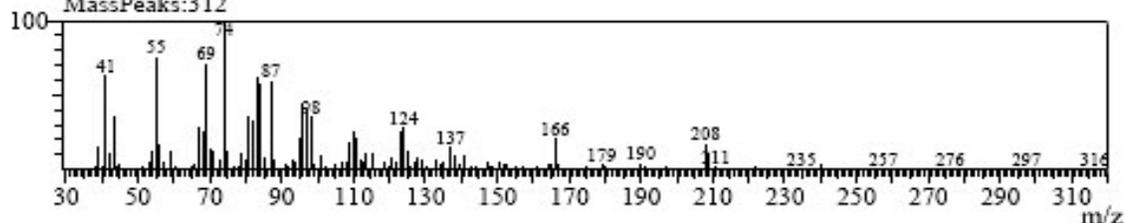
Metil tridecanoato

ID#:6 R.Time:15.8

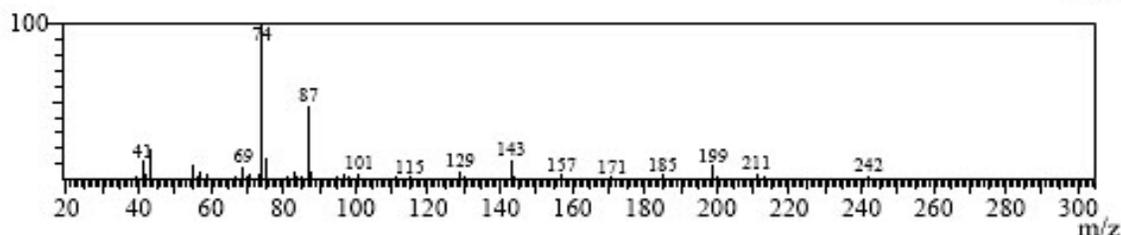
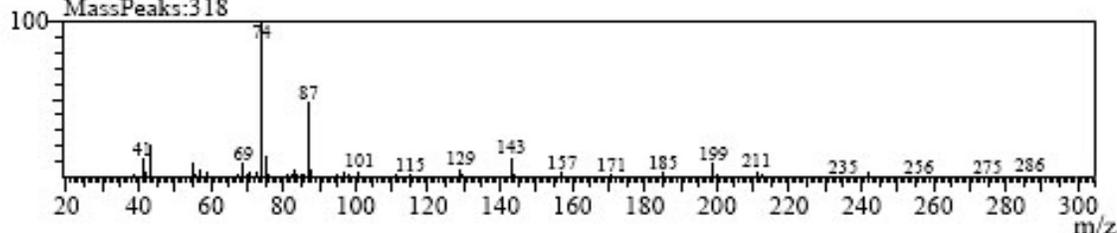
MassPeaks:308



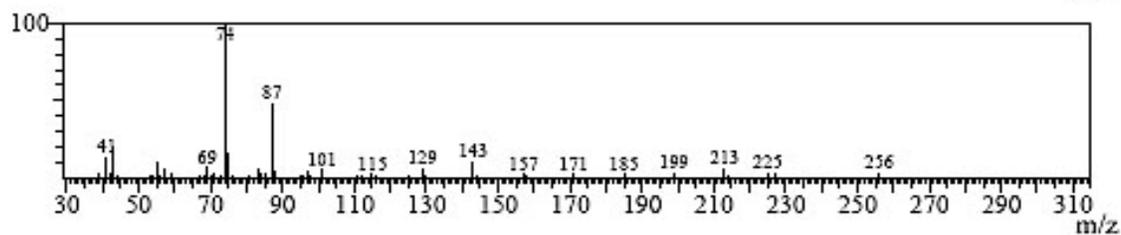
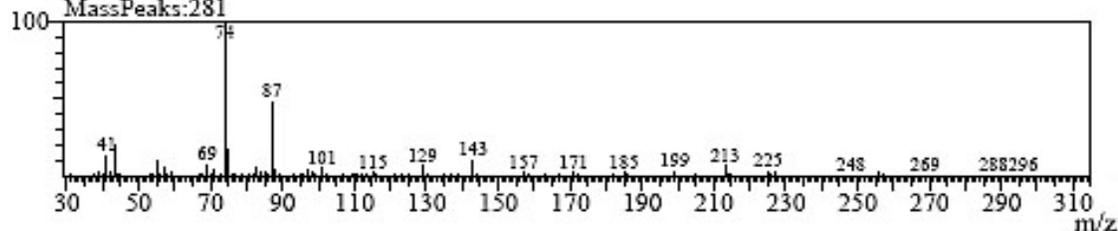
Metil miristoleato  
ID#: 7 R.Time:17.2  
MassPeaks:312

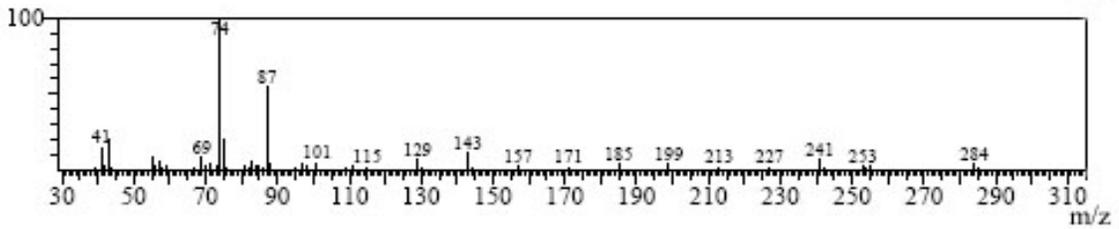
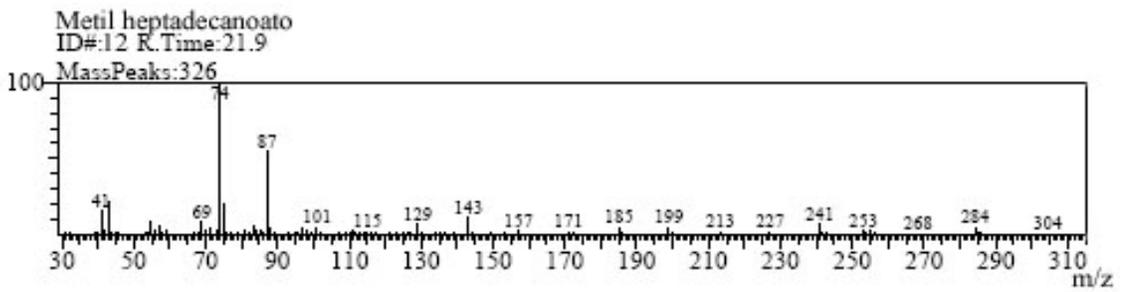
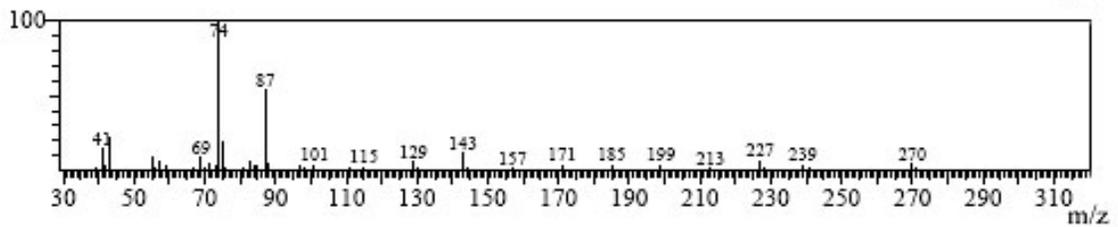
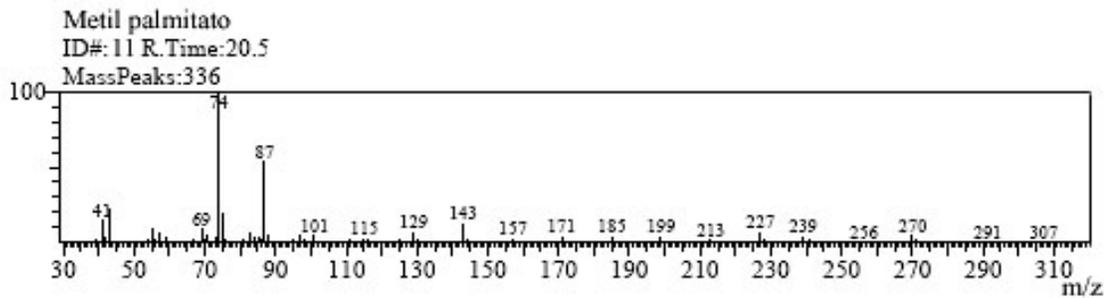
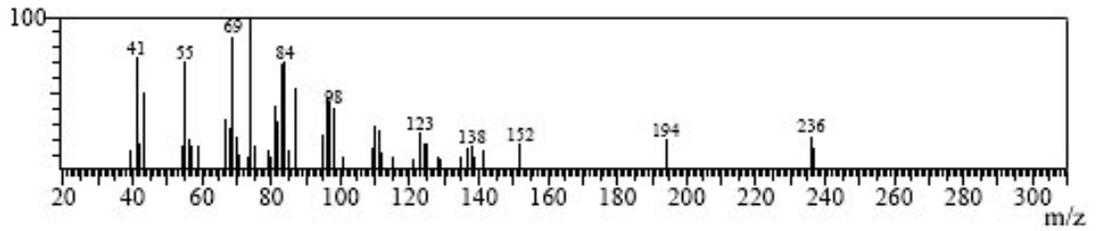
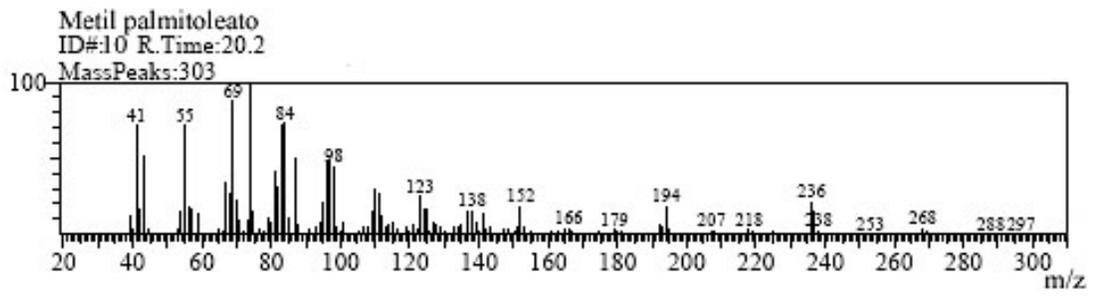


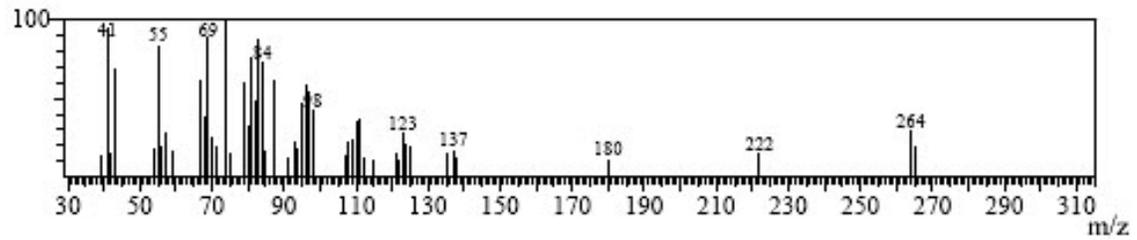
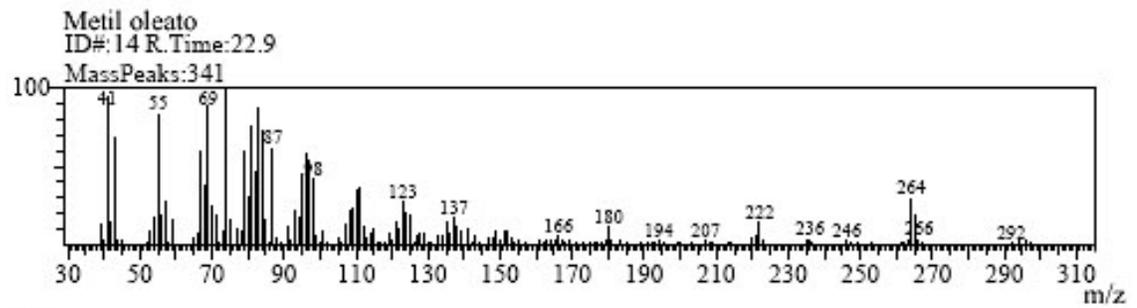
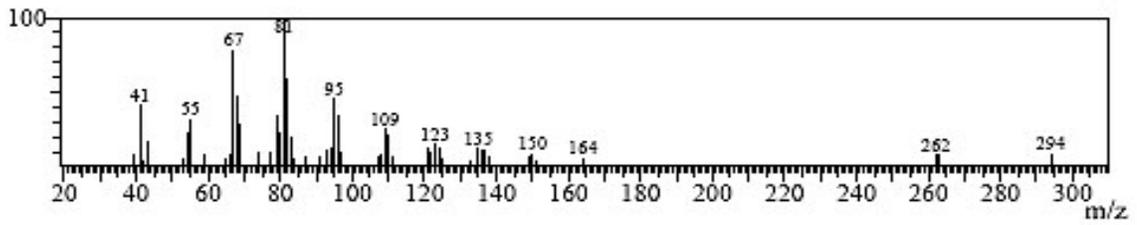
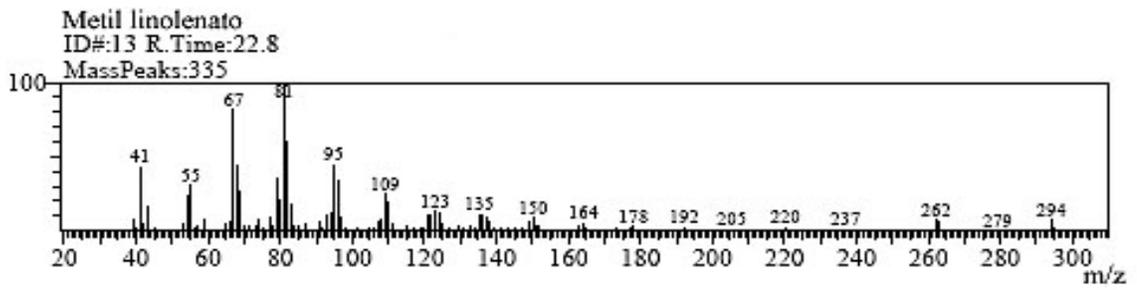
Metil miristato  
ID#: 8 R.Time:17.4  
MassPeaks:318



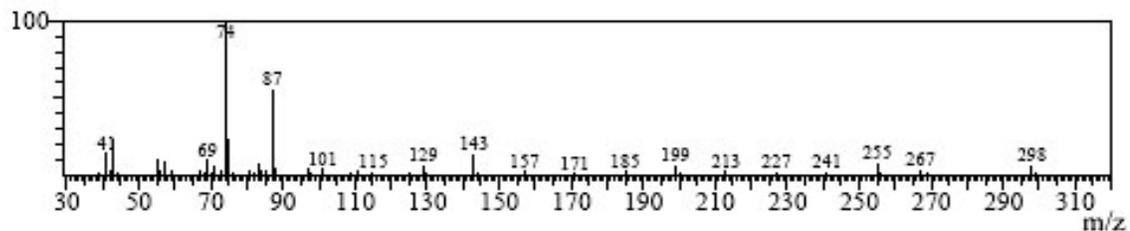
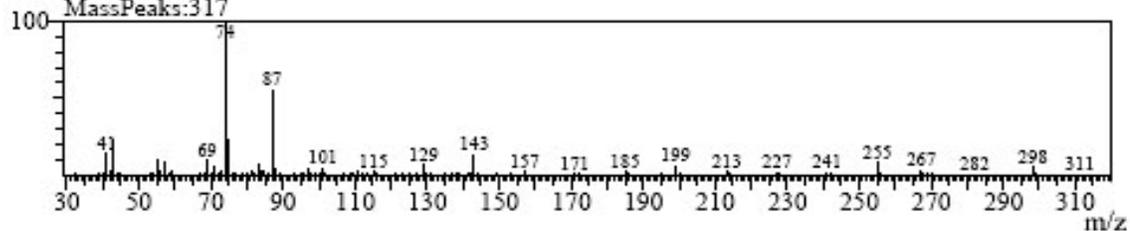
Metil pentadecanoato  
ID#: 9 R.Time:19.0  
MassPeaks:281



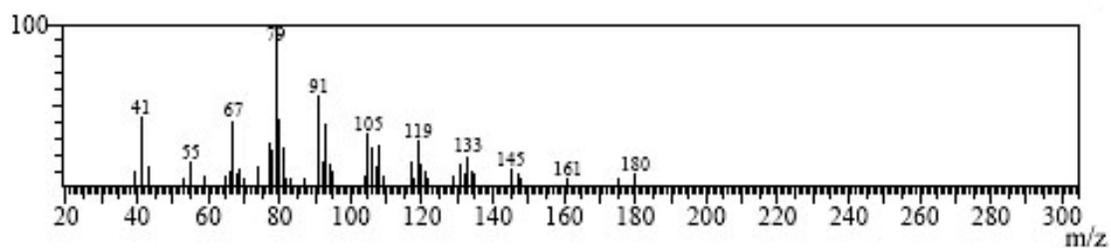
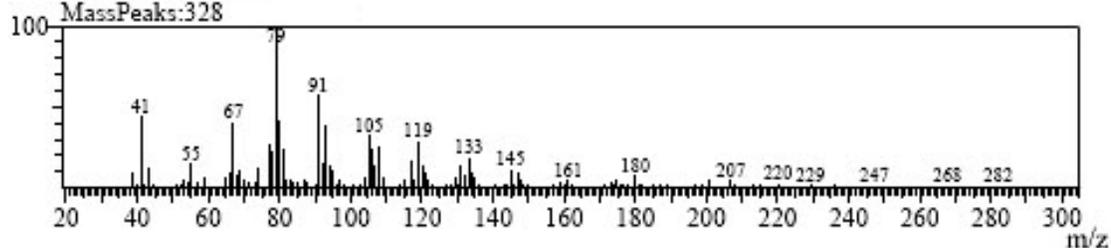




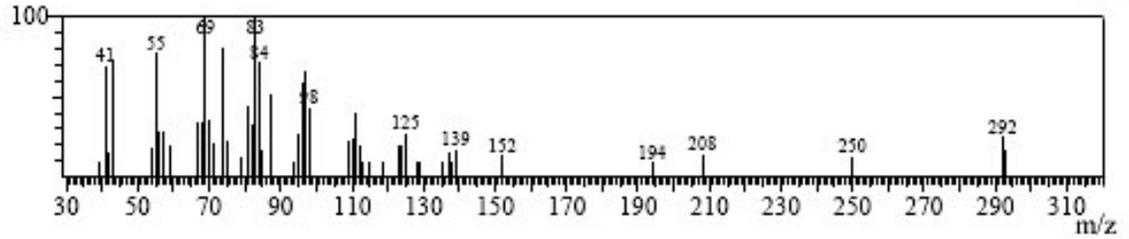
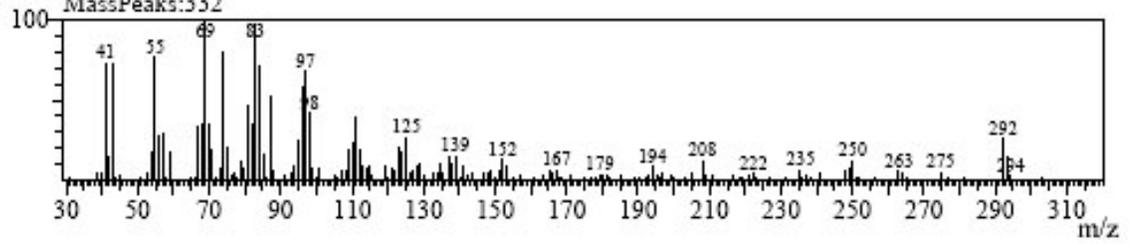
Metil estearato  
ID#:15 R.Time:23.2  
MassPeaks:317



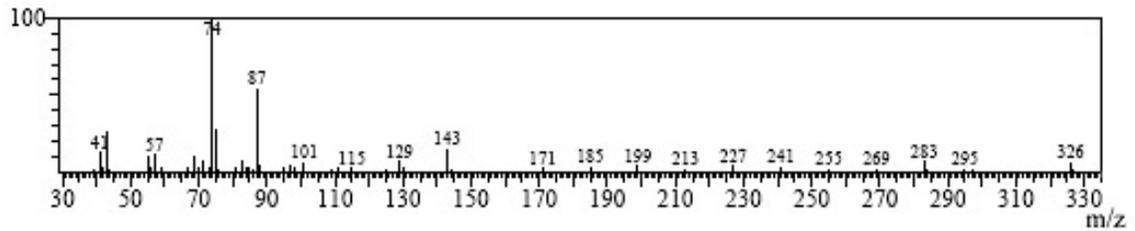
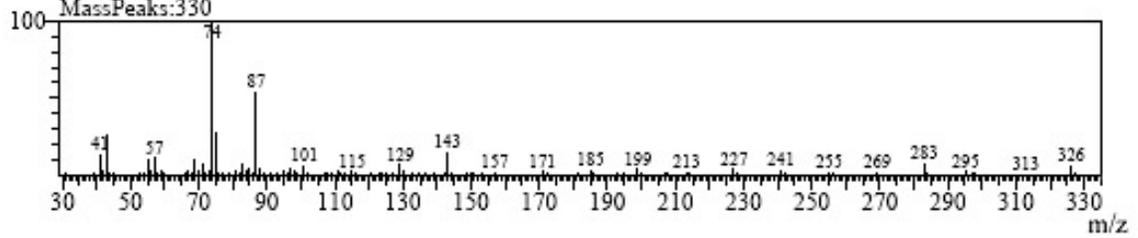
Metil eicosapentano  
ID#:16 R.Time:25.1  
MassPeaks:328



Metil eicosanoato  
ID#:17 R.Time:25.5  
MassPeaks:332



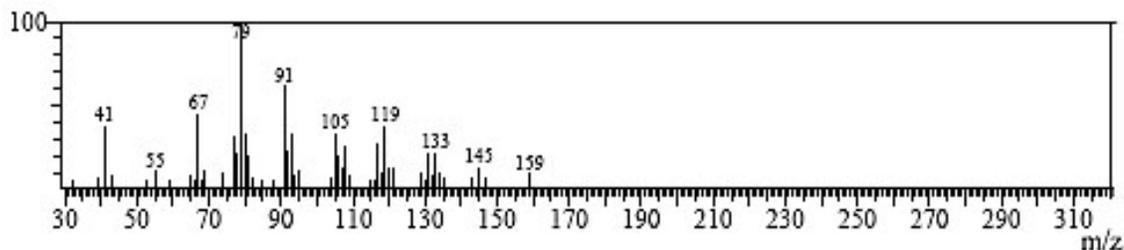
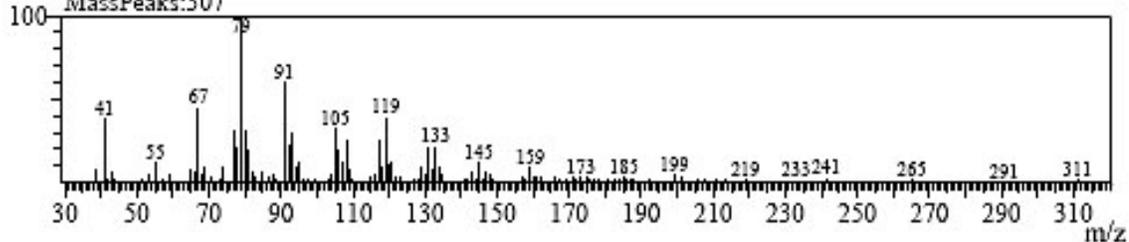
Metil araquidato  
ID#:18 R.Time:25.8  
MassPeaks:330



Metil docosahecanoato

ID#:19 R.Time:27.3

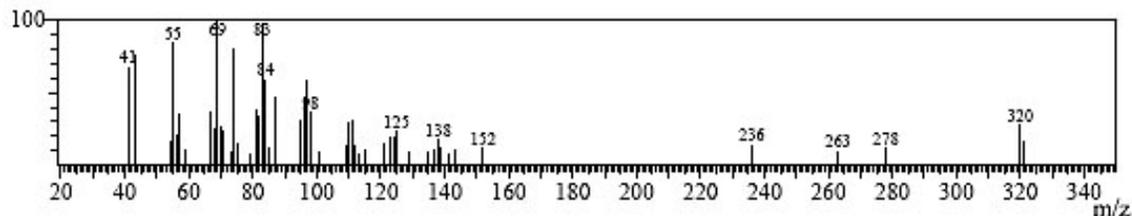
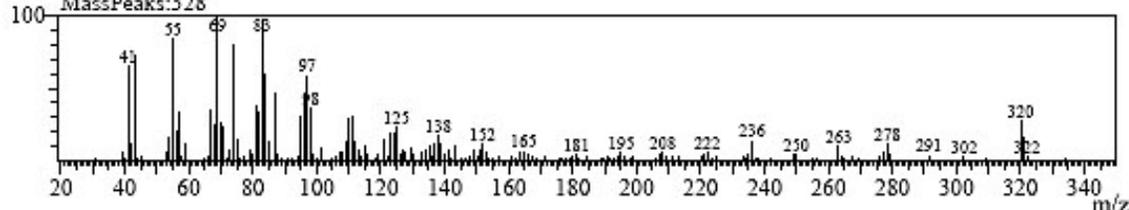
MassPeaks:307



Metil erucato

ID#:20 R.Time:27.9

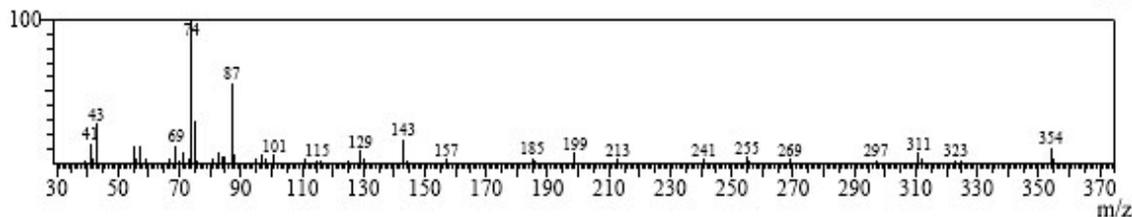
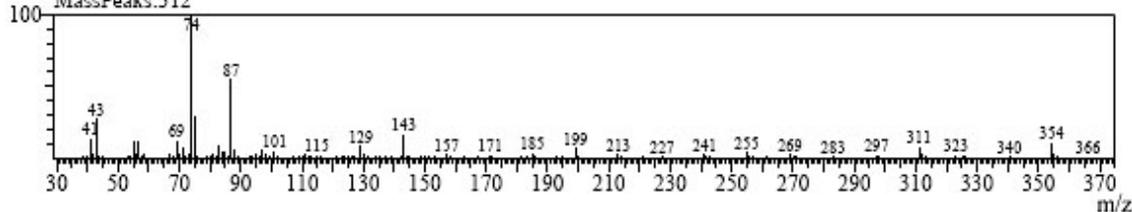
MassPeaks:328

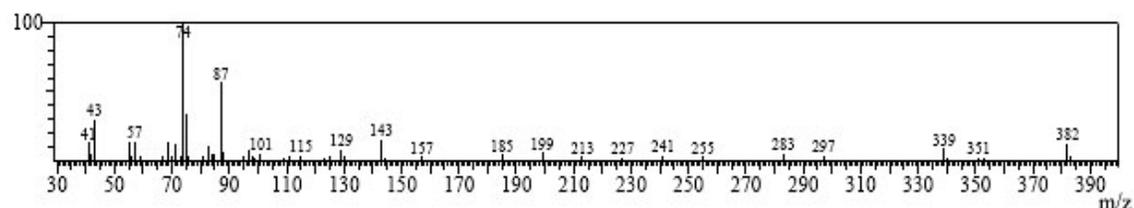
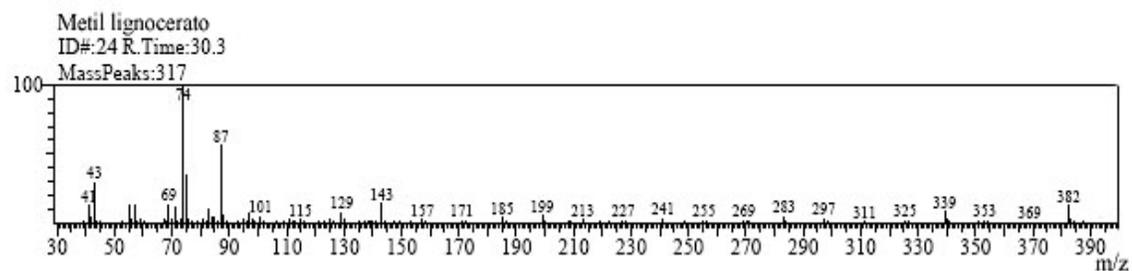
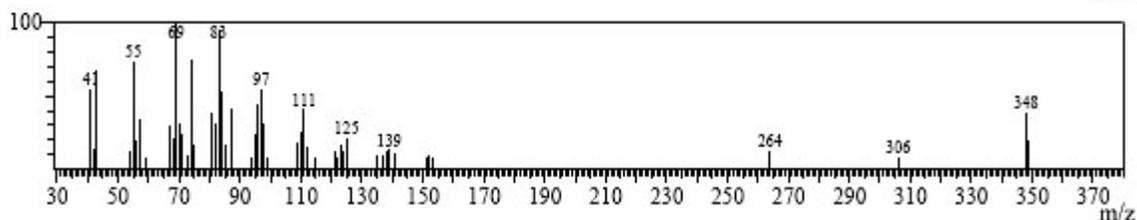
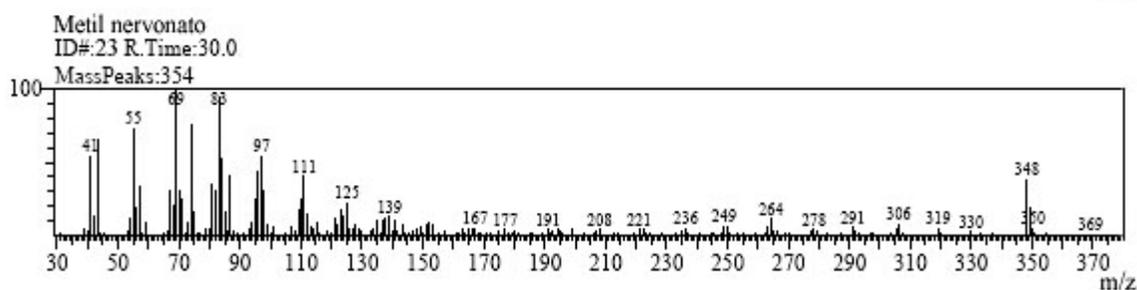
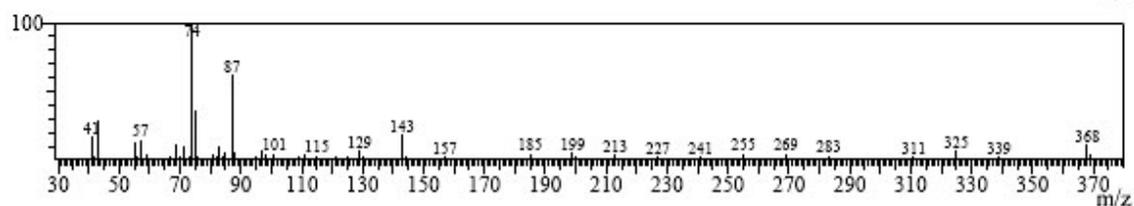
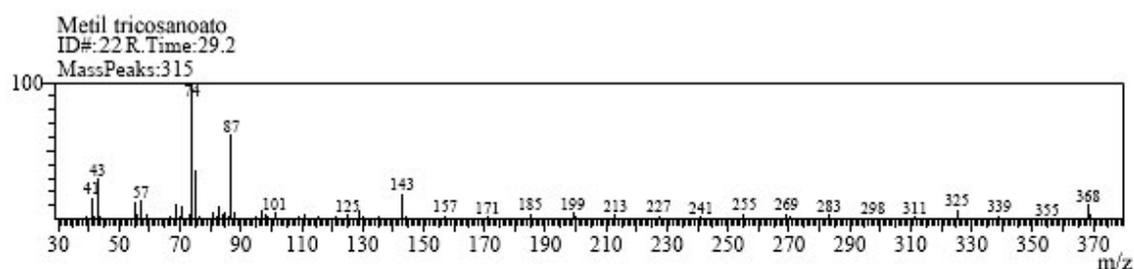


Metil behenato

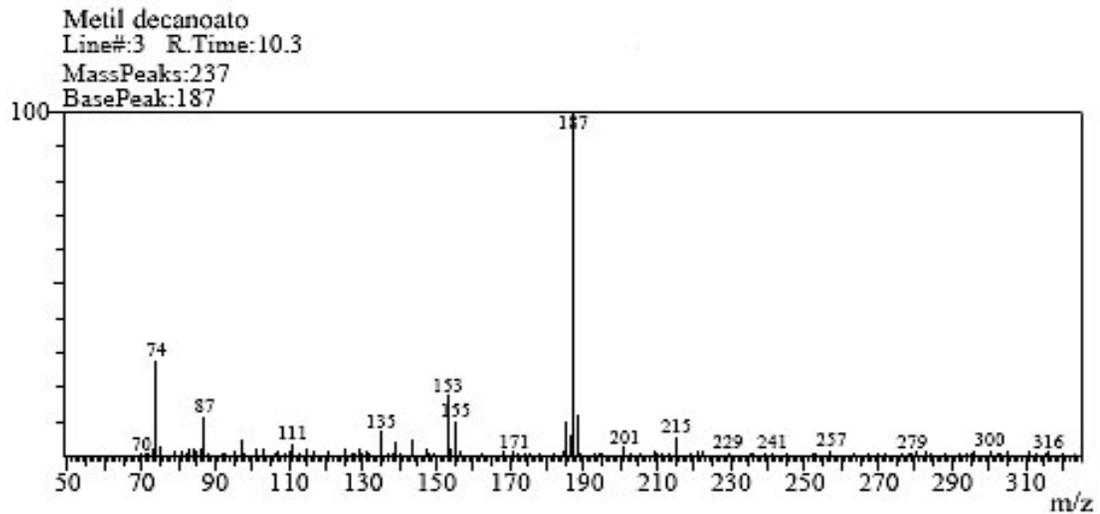
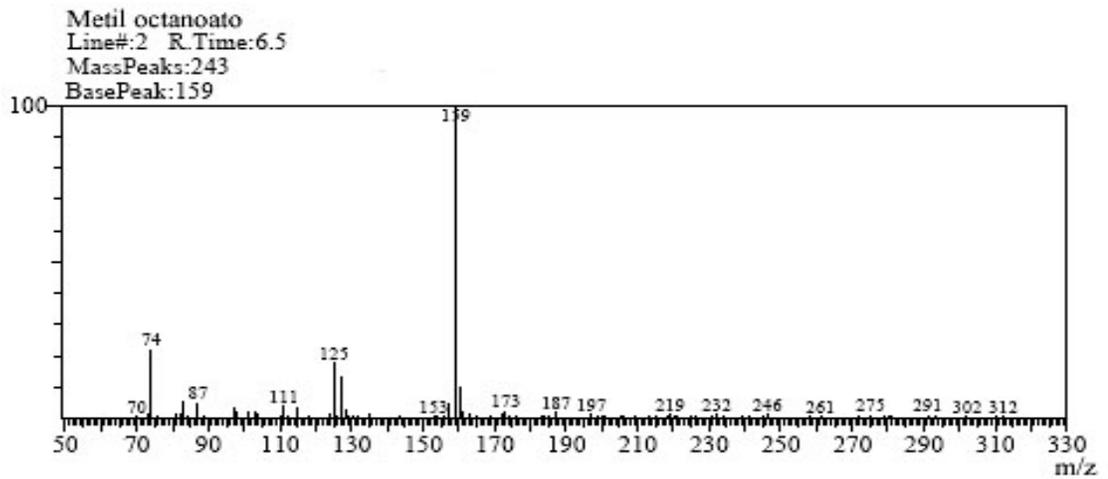
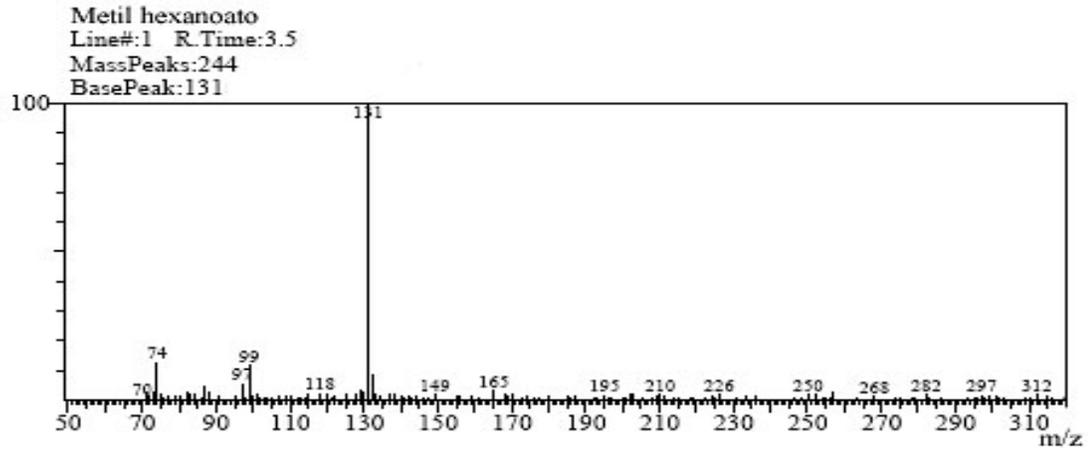
ID#:21 R.Time:28.1

MassPeaks:312

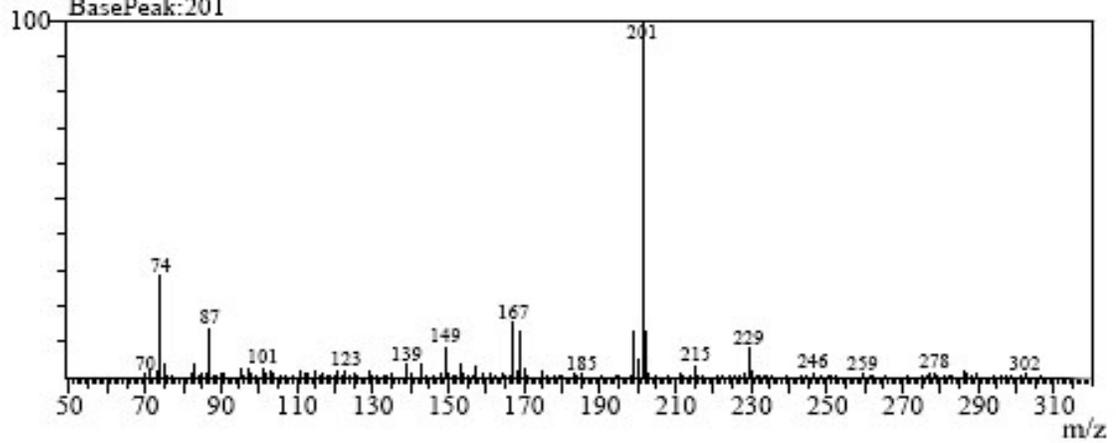




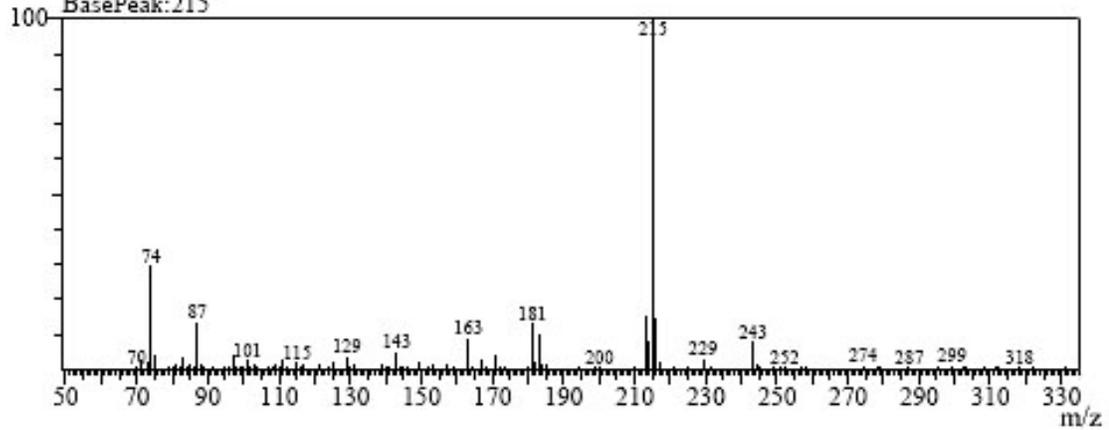
**ANEXO 3. Espectros de masas por ionización química de los compuestos identificados del estándar.**



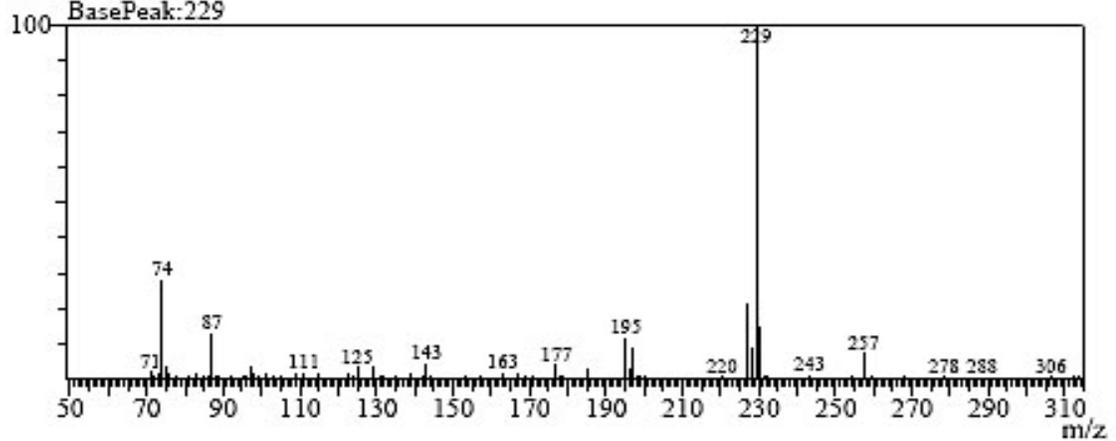
Metil undecanoato  
Line#:4 R.Time:12.2  
MassPeaks:241  
BasePeak:201



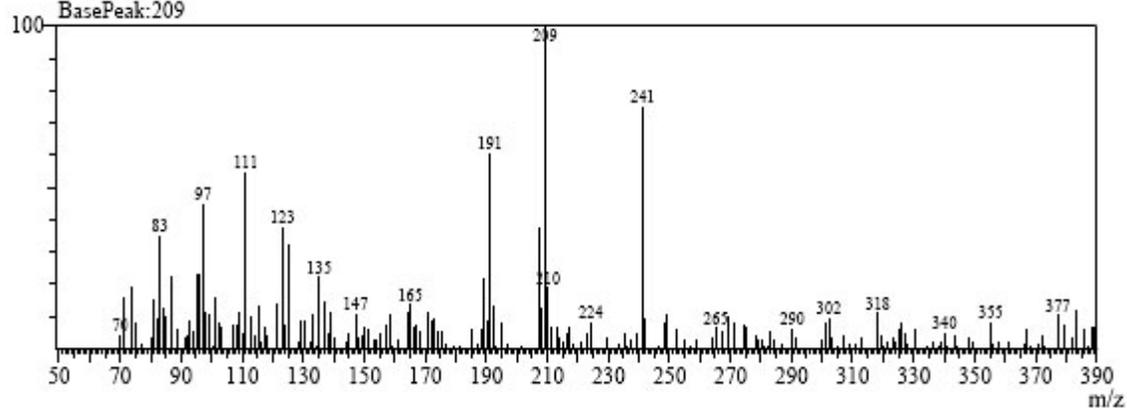
Metil laurato  
Line#:5 R.Time:14.0  
MassPeaks:269  
BasePeak:215



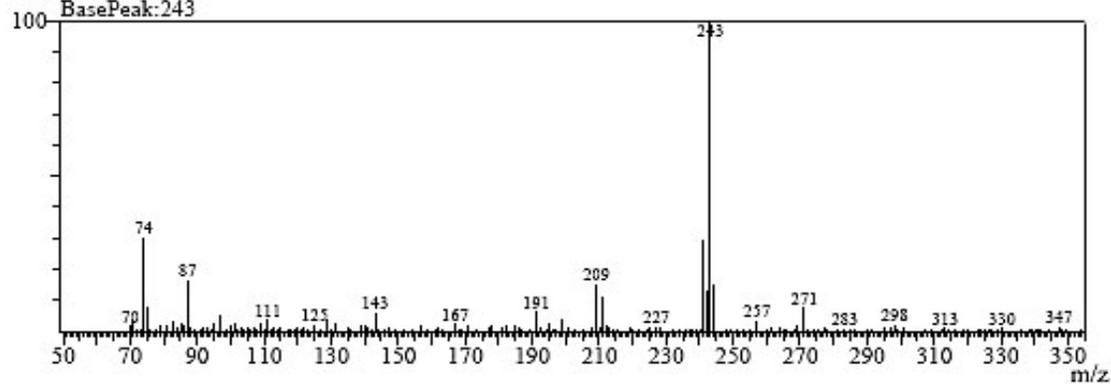
Metil tridecano  
Line#:6 R.Time:15.7  
MassPeaks:234  
BasePeak:229



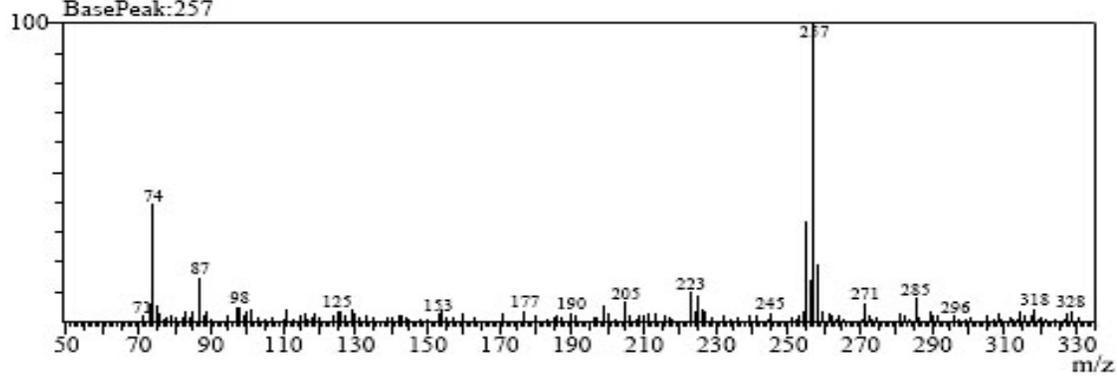
Metil miristoleato  
Line#:7 R.Time:17.2  
MassPeaks:241  
BasePeak:209



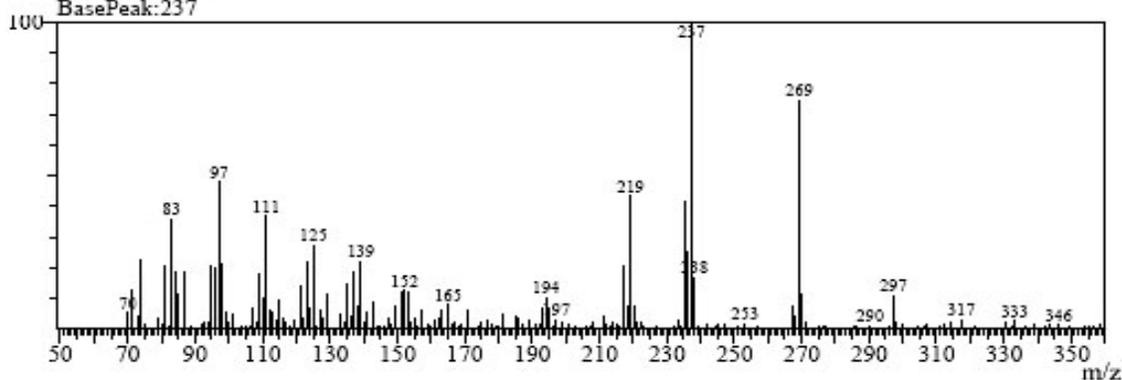
Metil miristato  
Line#:8 R.Time:17.4  
MassPeaks:237  
BasePeak:243



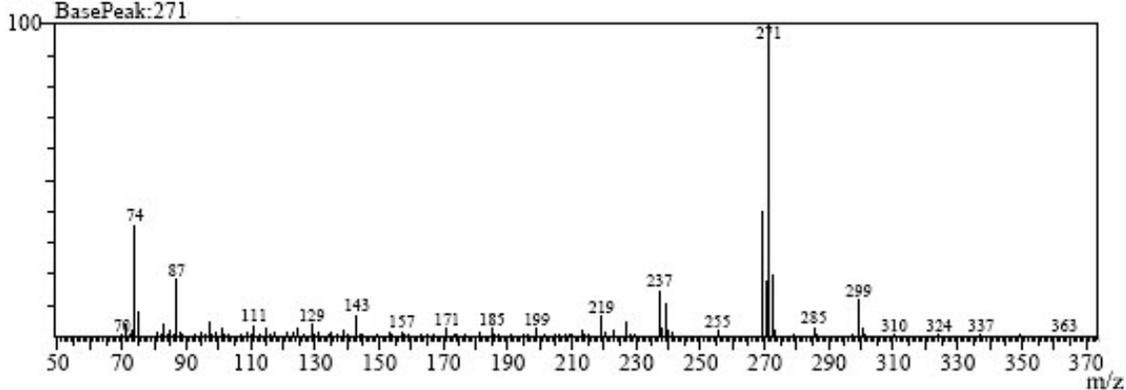
Metil pentadecanoato  
Line#:9 R.Time:18.9  
MassPeaks:253  
BasePeak:257



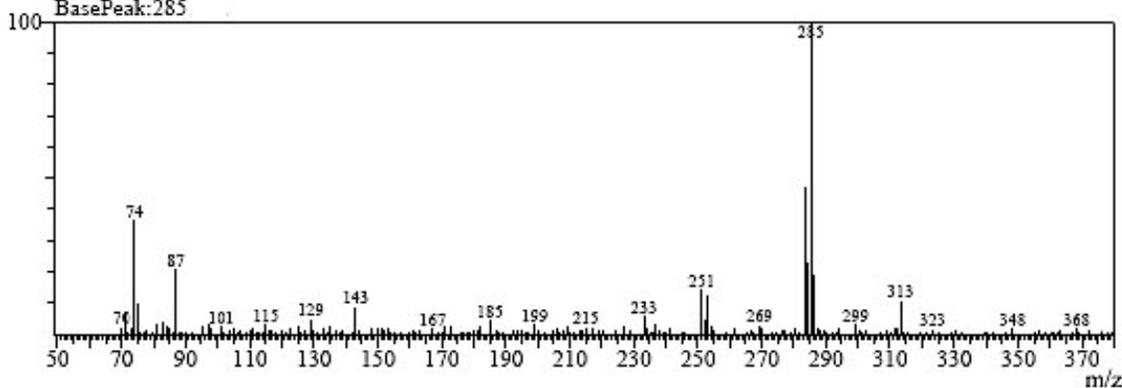
Metil palmitoleato  
Line#:10 R.Time:20.2  
MassPeaks:284  
BasePeak:237



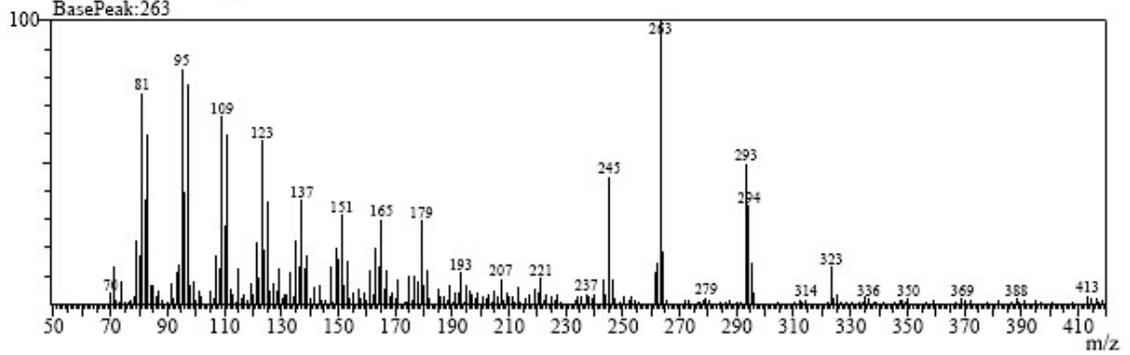
Metil palmitato  
Line#:11 R.Time:20.4  
MassPeaks:279  
BasePeak:271



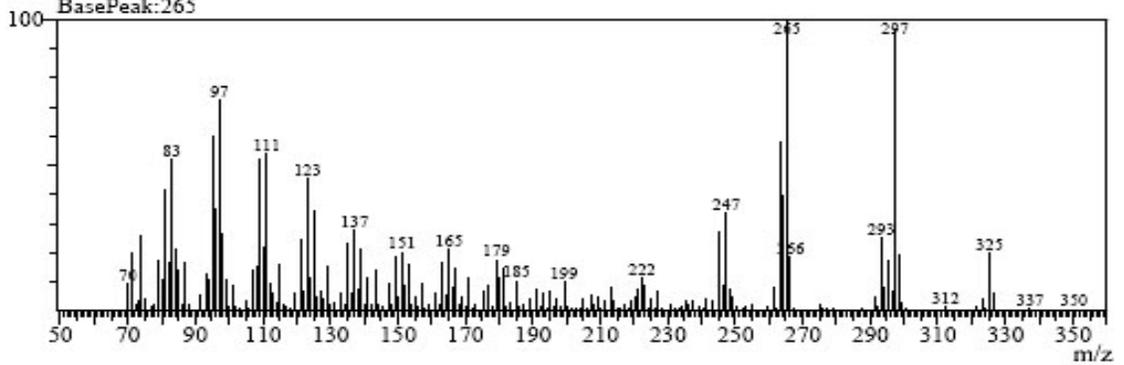
Metil heptadecanoato  
Line#:12 R.Time:21.9  
MassPeaks:253  
BasePeak:285



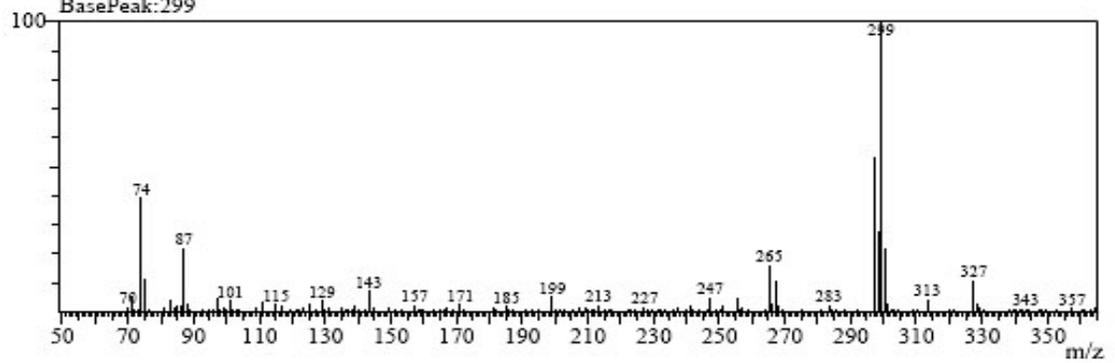
Metil linolenato  
Line#:13 R.Time:22.8  
MassPeaks:284  
BasePeak:263



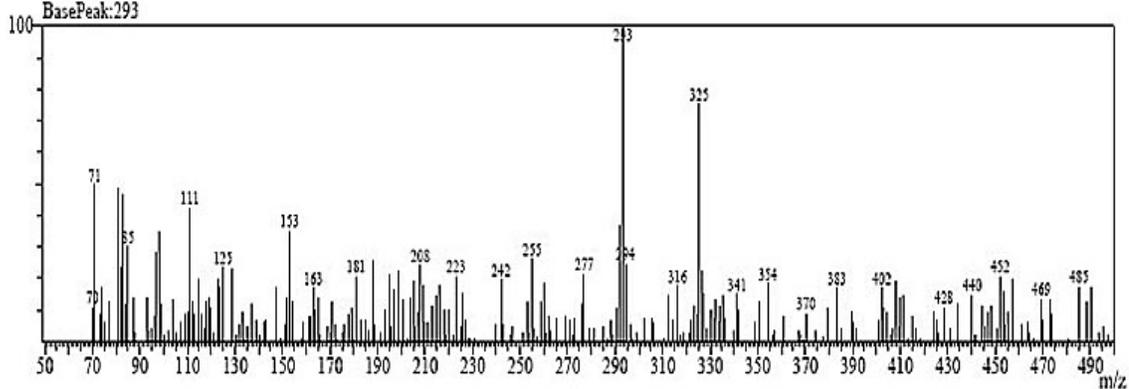
Metil oleato  
Line#:14 R.Time:22.9  
MassPeaks:303  
BasePeak:265



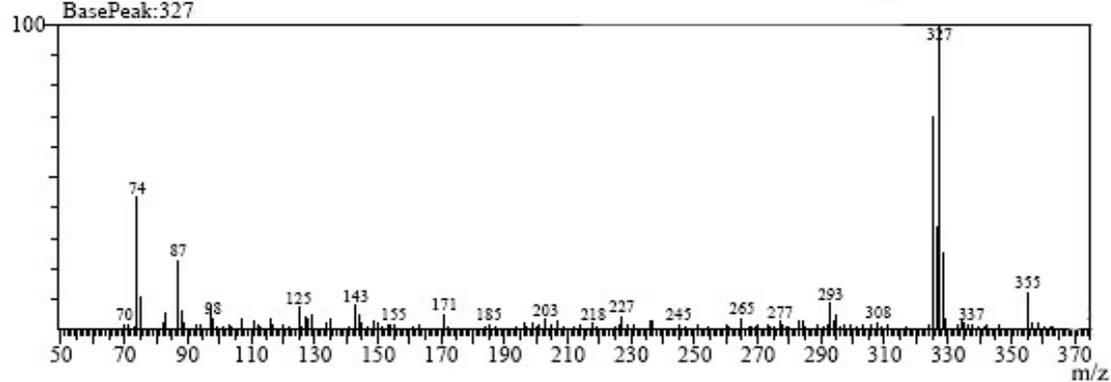
Metil estearato  
Line#:15 R.Time:23.2  
MassPeaks:281  
BasePeak:299



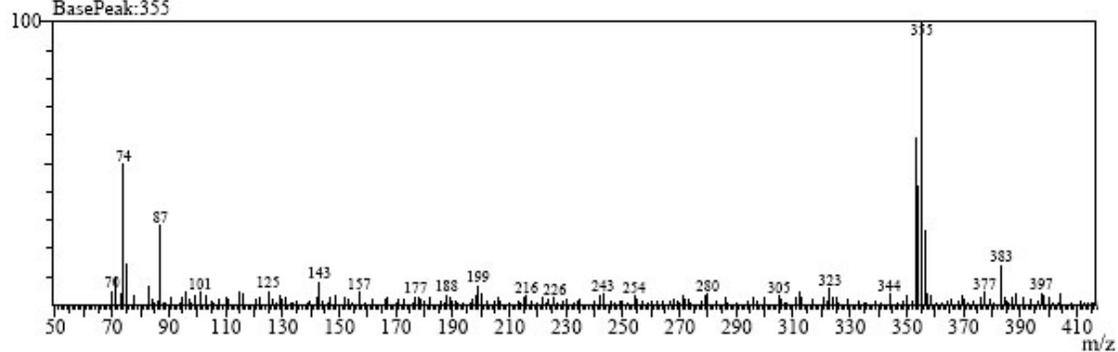
Metil eicosanoato  
Line#:16 R.Time:25.5  
MassPeaks:240  
BasePeak:293



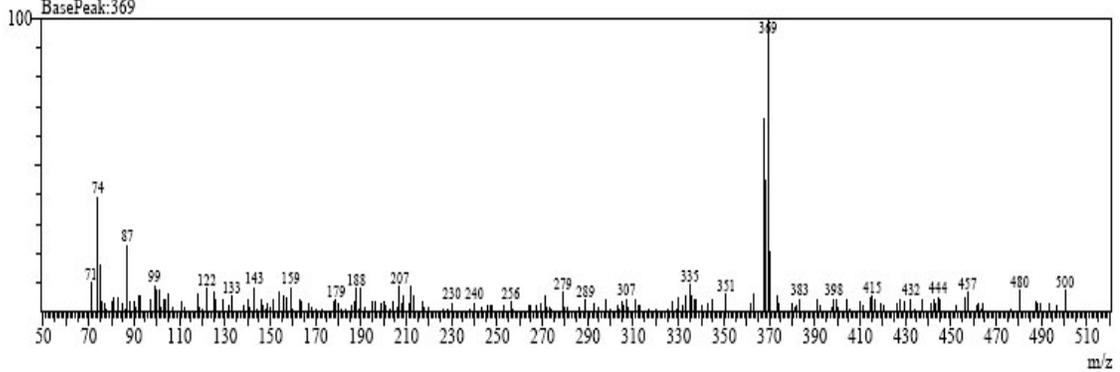
Metil araquidato  
Line#:17 R.Time:25.7  
MassPeaks:250  
BasePeak:327



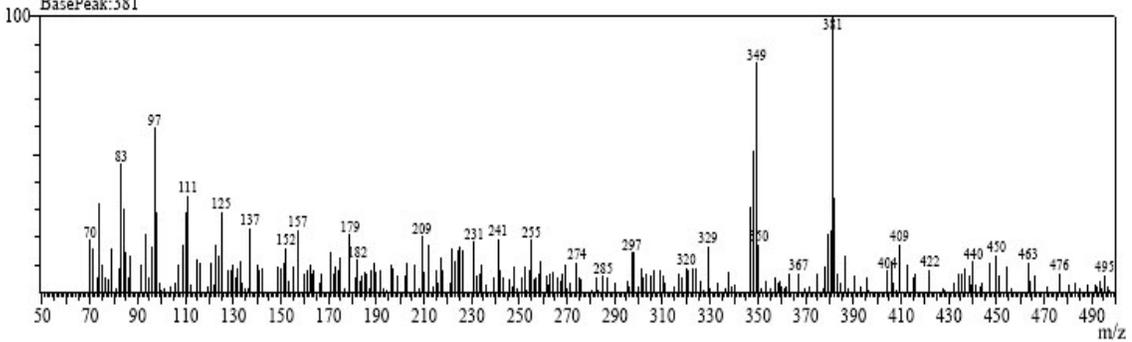
Metil behenato  
Line#:18 R.Time:28.1  
MassPeaks:256  
BasePeak:355



Metil tricosanoato  
Line#:19 R.Time:29.2  
MassPeaks:219  
BasePeak:369



Metil nervonato  
Line#:20 R.Time:30.0  
MassPeaks:255  
BasePeak:381



Metil lignocerato  
Line#:21 R.Time:30.2  
MassPeaks:231  
BasePeak:383

