

ESTANDARIZACION DE ANALISIS DE METILESTERES DE ÁCIDOS GRASOS POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Analysis of fatty acids methyl esters standardization by the gas chromatography coupled to mass spectrometry technique.

RESUMEN

Se realizó la estandarización del análisis de metilésteres de ácidos grasos (FAME's) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) utilizando impacto electrónico (EI) e ionización química (CI).

En este estudio se evaluaron los parámetros estadísticos: precisión, linealidad, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y coeficiente de correlación.

Los resultados mostraron que el análisis por impacto electrónico presentó valores estadísticos adecuados para la identificación y cuantificación de los metilesteres, sin embargo los espectros de masas de los FAME's presentaron como ión molecular a $[M + 1]^+$ y no tienen iones comunes, luego es más fácil la identificación mediante CI.

La muestra real fue aceite de crisálida del *Bombix mori* Linn obtenidas de crisálidas del *Hibrido Pilamo 1* cultivado en la región cafetera. El aceite mostró ácido oleico y ácido palmítico como componentes mayoritarios (43,752 y 26,300% respectivamente)

PALABRAS CLAVES: ácido graso, cromatografía de gases, espectrometría de masas, impacto electrónico, ionización química, metiléster, derivatización,

ABSTRACT

A fatty acids methyl esters (FAME's) analysis standardization was made by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using electronic (EI) and chemical ionization (CI). Accuracy, linearity, detection and quantification limit, sensibility and correlation coefficient were evaluated as statistical parameters. Results showed that the EI analysis exhibits satisfactory statistical values for identification and quantification of FAME's. However, FAME's mass spectra have $[M + 1]^+$ as a molecular ion and don't have common ions; for this reason the FAME's identification through CI is easier.

The real sample was chrysalises' Bombix mori Linn soil obtained from Hybrid Pilamo 1 chrysalises growth in the coffee growing region of Colombia. The oil showed both oleic and palmitic acids as main components (43,752 y 26,300% respectively).

KEYWORDS: fatty acid, gas chromatography, mass spectra, electronic impact, chemical ionization, methyl ester, FAME, derivatization.

1. INTRODUCCIÓN

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. [1]

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. [2]

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés) 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 estables.

La cromatografía de gases se ha convertido en la herramienta más empleada en la separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos convertidos primero metilesteres de ácidos grasos (Fatty Acids Methyl Esters, FAME's); cuya exactitud está limitada por la complejidad del proceso de calibración, la pureza de las sustancias empleadas como estándares y la imposibilidad de identificar los compuestos en las muestras. [3-5]

JUAN PABLO LOPEZ V.

Tecnólogo en Química
Estudiante de Química Industrial
Universidad Tecnológica de Pereira

juanplop1@hotmail.com

JUAN PABLO ARRUBLA V.

Químico MSc.
Profesor Asistente Escuela de Química.
Universidad Tecnológica de Pereira.

juanpablo77@utp.edu.co

GLORIA

GUERRERO

Química Ph D.
Profesor Asistente. Escuela de Química. Universidad Tecnológica de Pereira.
gguerrero@utp.edu.co

EDITH

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para FAME's (GC-MS, siglas en inglés) por el método de impacto electrónico (EI) resultan en una fragmentación fuerte y reestructuración de la molécula que a menudo no produce un ión molecular $[M]^+$, este realmente aumenta con pesos moleculares elevados (>6 átomos de carbono), aunque decrece con ramificaciones en la cadena [4-6]. El modo de ionización química usando como gas reactivo el metano, permite que el $[M+1]^+$ sea más estable, y se muestre un pico más legible.

Con estos dos métodos de ionización, y con el uso de un estándar comercial de una mezcla de metilesteres de ácidos grasos se realizó la identificación de cada pico y la calibración para cada compuesto separado.

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 la industria cosmética, alimenticia, de combustibles, etc.[7]. En la Universidad Tecnológica de Pereira, en la Escuela de Química, se ha conformado un grupo de investigación en OLEOQUÍMICA, con el objetivo de estudiar la posible utilización de los productos y subproductos de la sericultura y otras ramas de la oleoquímica [8]. La estandarización se hizo con el fin de apoyar las investigaciones del grupo de investigación de oleoquímica en el campo de la sericultura, oleorresinas y bio-combustibles, entre otros.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material de muestra.

Como estándar de referencia, se usó la mezcla de metilesteres de ácidos grasos NLEA, marca RESTEK, código de catálogo 35078.

Como material de muestra real, se usó la crisálida del gusano de seda *Bombix mori Linn Híbrido Pilamo 1* procedente del corregimiento de Santa Rosa, departamento del Valle del Cauca. La extracción del aceite se hizo con la técnica soxhlet, usando hexano como solvente, en proporciones muestra solvente 1:10; obteniendo porcentajes de rendimiento de 34% según estudios previos. [9]

2.2. Preparación de la muestra.

La muestra de aceite se esterificó (derivativizó) con una solución de ácido sulfúrico concentrado en metanol al 2%, posteriormente se extrajo con hexano los metilesteres de ácidos grasos, se centrifugaron y se concentraron por evaporación. [10]

2.3. Parámetros instrumentales.

El equipo utilizado para la estandarización fue el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro 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, sistema de inserción directa controlado por el software GCMS solution. Columna Rtx-CLPesticides Restek (30 m × 0,25 mm DI, 0,25 μm espesor de película) y base de datos de fragmentogramas Wiley, 7^o edición, 2003.

Las condiciones de los análisis cromatográficos fueron: para EI temperatura inyector 250 °C, temperatura del horno 100 °C durante 2 minutos, después se llevó hasta 300 °C con una razón de 7 °C/min, y se mantuvo allí durante 5 minutos. Volumen de inyección 2 μL, modo de inyección de split 4:1, modo de control de flujo velocidad lineal, flujo en la columna 1,0 mL/min, velocidad lineal del gas 37,2 cm/s, gas de arrastre helio, temperatura de fuente de iones 260 °C, temperatura de interfase 280 °C, tiempo de inicio 3 min, tiempo de finalización 35 min, m/z inicial 30, m/z final 500. Para el modo de CI, las condiciones cromatográficas fueron las mismas, solo se modificaron las condiciones espectrométricas empleando temperatura de fuente de iones 210 °C, temperatura de interfase 280 °C, tiempo de inicio 2 min, tiempo de finalización 32 min, m/z inicial 70, m/z final 500.

2.4. Estandarización de la técnica cromatográfica.

Al cambiar las condiciones del certificado de análisis del proveedor, como la columna y detector, se hizo necesaria la identificación de los picos del estándar la cual se realizó por comparación de los fragmentogramas obtenidos por EI con la base de datos Wiley del equipo; y con los espectros de masas por el modo de CI comparando estos con el peso molecular de cada compuesto.

Con los compuestos identificados se calibraron, en concentraciones que van desde 0,110 ppm hasta 75 ppm para el caso del metil oleato. Se calcularon los parámetros estadísticos: precisión (desviación estándar y desviación estándar relativa), linealidad, límite de detección y cuantificación y sensibilidad. Las curvas de calibración se forzaron por cero automáticamente con el fin de minimizar el error estadístico.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Calibración.

Por el modo de EI, se identificaron 24 compuestos (Fig. 1) presentes en el estándar. Por el modo de CI se identificaron 21 compuestos (Fig. 2). A estos compuestos se les calibró, para hallar los valores estadísticos

necesarios para cuantificar los metilesteres del aceite de la crisálida del gusano de seda.

En los fragmentogramas por EI, se observan por lo general los iones 74 y 87 los cuales son los más abundantes. En la figura 3 se observa el espectro de masas del metil estearato el cual muestra como iones más abundantes a los iones 74 y 87, y como iones de menor abundancia al ión de peso molecular $[M]^+$ (298 para el metil estearato) y al ión $[M - 31]^+$.

Los iones 74 y 87 se atribuyen al rearreglo de McLafferty, un estado de transición de seis miembros que resulta en una transferencia del hidrógeno γ y una ruptura β (fig. 5). La intensidad de los fragmentos de McLafferty depende del numero de enlaces π en la molécula y es comúnmente observado en el espectro de esteres, cetonas y olefinas [4].

Los iones $[M - 31]^+$ fueron producidos por la perdida de CH_3O $[M]^+$ del (Fig. 6). Este ión es producido cuando una simple ruptura homolítica del enlace metoxi produce un ión acilo comúnmente observado [4].

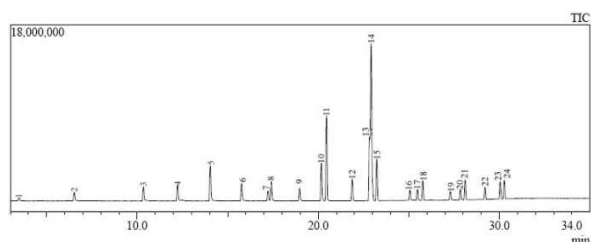


Figura 1. Cromatógrama total de iones del estándar por EI

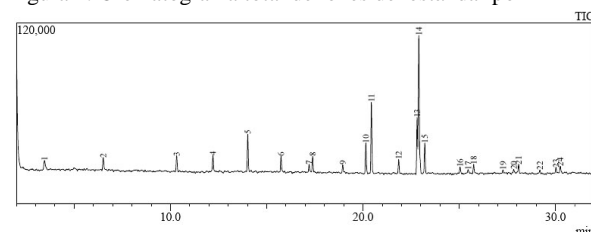


Figura 2. Cromatógrama total de iones del estándar por CI.

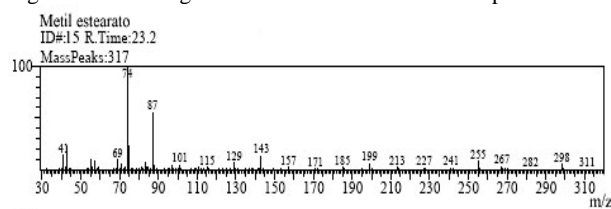


Figura 3. Fragmentogramas por EI del metil estearato.

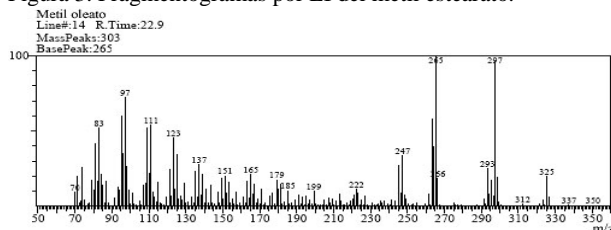


Figura 4. Fragmentograma por CI del metil oleato.

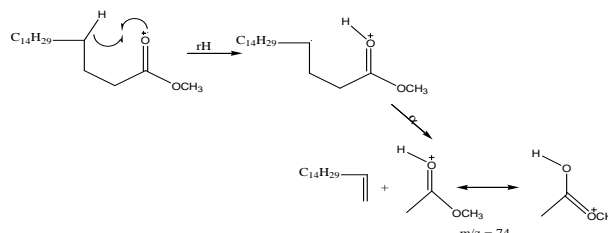


Figura 5. Rearreglo de McLafferty resultando el ión 74.

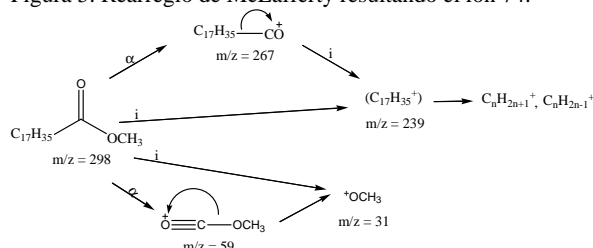


Figura 6. Esquema de fragmentación con EI resultando el ión $[M - 31]^+$.

Se observan los iones $[M - 32]^+$ en abundancias mayores a las del ión $[M - 31]^+$ en FAME's monoinsaturados.

En los espectros de CI de los FAMES monoinsaturados fueron mostrados los iones $[M - 31]^+$ debidos a la perdida de CH_3OH del ión $[M + 1]^+$ el cual se ve en los (fig. 7).

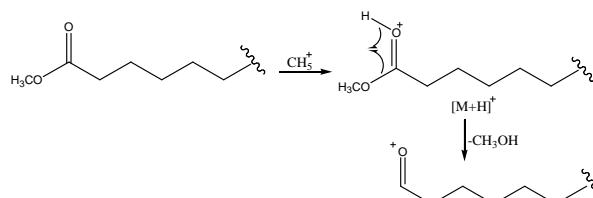


Figura 7. Esquema de fragmentación por CI resultando el ión $[M - 31]^+$

En los espectros por CI de los ácidos grasos saturados el único ión que se observa por encima de una abundancia de 50 es el ión $[M + 1]^+$ con una abundancia de 100.

Para la calibración del método se usaron diluciones del estándar de mezcla de FAME's en concentraciones desde 7,5 hasta 100 ppm. Inyectando estos, y seleccionando los niveles que mejor correlacionaran con la recta.

En la figura 8, se presentan una de las curvas de calibración realizadas por el modo de EI para uno de los metilesteres de ácidos grasos más representativos.

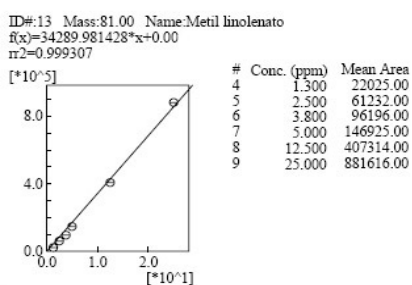


Figura 8. Curvas de calibración del metil linolenato por GC-EM con EI.

En las tablas 1 y 2 se pueden observar los datos estadísticos, empleados para la calibración de los compuestos.

R^2 : coeficiente de correlación

SD: desviación estándar

RSD: desviación estándar relativa.

LD: limite de detección

LC: limite de cuantificación

LOL: limite de linealidad

N° de ID	NOMBRE	R^2	SD (ppm) * 10-3	RSD (ppmil)	LD (ppm)	LC (ppm)	SENSIBILIDAD (area)
1	M. hexanoato	0,99987	6362,9	22,4344	0,00552	0,01839	31754,6
2	M. octanoato	0,99818	7410,1	32,4978	0,00588	0,01960	29794,7
3	M. decanoato	0,99963	10801,3	54,2778	0,00597	0,01991	29334,4
4	M. undecanoato	0,99859	8638,8	34,8513	0,00533	0,01776	32890,1
5	M. laurato	0,99923	11426,5	43,2965	0,00457	0,01524	38328,8
6	M. tridecanoato	0,99918	8147,2	30,3210	0,00491	0,01636	35698,9
7	M. miristoleato	0,99965	2497,4	37,0945	0,02115	0,07049	8285,1
8	M. miristato	0,99782	14636,9	46,2061	0,00365	0,01218	47957,7
9	M. pentadecanoato	0,99654	8631,7	29,3594	0,00444	0,01479	39478,1
10	M. palmitoleato	0,99654	2361,4	40,4698	0,02065	0,06885	8482,7
11	M. palmitato	0,99863	13295,5	30,4398	0,00295	0,00984	59322,4
12	M. heptadecanoato	0,99834	10938,1	26,5214	0,00338	0,01128	51771,3
13	M. linolenato	0,99931	6554,5	23,9824	0,00511	0,01703	34289,9
14	M. oleato	0,99912	2431,8	27,1780	0,01492	0,04973	11742,9
15	M. estearato	0,99933	9683,1	20,5477	0,00299	0,00997	58546,7
16	M. eicosapentanoato	0,99872	1608,9	28,6442	0,02419	0,08065	7241,2
17	M. eicosanoato	0,99799	3241,4	39,0353	0,01443	0,04809	12142,8
18	M. araquidato	0,99872	13936,5	37,6062	0,00329	0,01098	53210,1
19	M. docosahexanoato	0,99981	417,8	10,0584	0,03941	0,13137	4445,4
20	M. erucato	0,99948	3382,3	31,9511	0,01238	0,04128	14148,6
21	M. behenato	0,99637	12118,2	29,9979	0,00314	0,01046	55855,3
22	M.tricosanoato	0,99851	12668,4	35,4698	0,00350	0,01167	50054,4
23	M. nervonato	0,99907	4043,9	37,7635	0,01164	0,03880	15052,4
24	M. lignocerato	0,99747	12155,0	33,5130	0,00342	0,01139	51254,8

Tabla 1. Datos estadísticos para la calibración por el modo de EI.

En la figura 9 se expone una de las curvas de calibración para el análisis de metilesteres de ácidos grasos por el modo de CI.

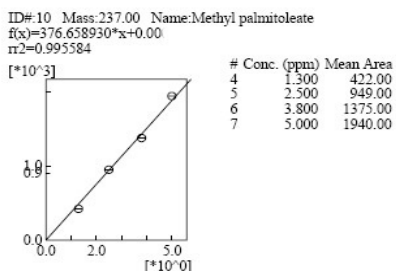


Figura 9. Curva de calibración del metil palmitoleato por GC-EM con CI.

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos fueron mayores a 0,975; indicando que existe correlación con una probabilidad elevada [1].

En cuanto a la precisión del método evaluada con los parámetros de desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD) se encuentran dentro de los valores aceptados ($RSD < 50$ ppmil) indicando que el grado de concordancia entre los resultados obtenidos a partir de replicas de la misma muestra es alto y que los análisis son repetibles [11]

Tanto los valores de R^2 , SD y RSD fueron suministrados por el software del equipo.

N° de ID	NOMBRE	R ²	SD (ppm)x10-3	RSD (ppmil)	LD (ppm)	LC (ppm)	SENSIBILIDAD (area)
1	M. hexanoato	0,99988	1848,0	6,8892	0,00622	0,02075	28147,6
2	M. octanoato	0,99835	650,52	10,6706	0,02735	0,09116	6406,52
3	M. decanoato	0,97735	527,66	11,3280	0,03518	0,11727	4979,97
4	M. undecanoato	0,99885	438,58	13,2335	0,04956	0,16519	3535,32
5	M. laurato	0,99527	246,03	9,0931	0,06152	0,20508	2847,67
6	M. tridecanoato	0,99796	67,684	6,4683	0,16184	0,53946	1082,56
7	M. miristoleato	0,97987	24,267	5,4675	0,38952	1,29840	449,784
8	M. miristato	0,99197	85,613	7,3624	0,14494	0,48312	1208,81
9	M. pentadecanoato	0,99947	60,054	5,1527	0,14722	0,49075	1190,02
10	M. palmitoleato	0,99732	26,018	7,2571	0,46842	1,56141	374,020
11	M. palmitato	0,98564	714,29	21,3555	0,04648	0,15494	3769,32
12	M. heptadecanoato	0,99448	118,91	9,2808	0,12975	0,43248	1350,34
13	M. linolenato	0,99885	120,66	35,3591	0,43064	1,43548	406,832
14	M. oleato	0,99377	370,73	34,0984	0,13463	0,44877	1301,330
15	M. estearato	0,98198	313,80	18,3514	0,09254	0,30847	1893,22
16	M. eicosanoato	1,00000	2,2329	1,1850	0,92775	3,09250	188,843
17	M. araquidato	0,98792	34,023	7,4552	0,38040	1,26799	460,570
18	M. behenato	0,99532	17,408	6,3253	0,62407	2,08022	280,739
19	M. tricosanoato	0,99809	4,4421	2,2162	0,88296	2,94319	198,424
20	M. nervonato	0,99459	4,4145	6,6463	2,67153	8,90510	65,5804
21	M. lignocerato	0,99972	1,7955	1,2161	1,18227	3,94089	148,189

Tabla 2. Datos estadísticos para la calibración por el modo de CI.

Para la determinación de los parámetros de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) existen cantidad de métodos. El método empleado en el presente estudio, fue el que expone que el LC es igual a la concentración del analito que proporcione una señal 10 veces superior a la señal de ruido (en ocasiones 20) y que el LD es igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a la señal de ruido. [1]

Como se aprecia en la tabla 2, para la mínima cantidad de analito detectable (LD) todos los valores están por encima de 0,0030 ppm; mientras que para la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar (LC) [1] todos están por debajo de 0,0098 ppm; teniendo en cuenta que los ácidos grasos son componentes mayoritarios de los aceites de cualquier matriz oleica, evitando de esta manera falsos positivos y falsos negativos.

Todas las curvas de calibración realizadas fueron forzadas a pasar por cero para disminuir el error estadístico, por lo tanto las pendientes de las curvas son iguales a la sensibilidad y el intercepto es 0.

Las sensibilidades obtenidas por ambos métodos de ionización defieren mucho, se puede advertir fácilmente que la sensibilidad por EI es mucho mayor que por CI, lo que nos indica que la habilidad de distinguir entre

diferentes concentraciones del analito es mucho mayor con la ionización por impacto electrónico.

Para la determinación de el límite de linealidad, se tomó como el rango entre el límite de cuantificación y la concentración del analito a la cual la curva de calibración pierde su linealidad (LOL). [12]

Para algunos compuestos, los límites de linealidad son bajos comparando estos con sus porcentajes en la muestras, por ejemplo, para el metil oleato, el cual es de 75 ppm por EI y de 15 ppm por CI, el cual es un ácido mayoritario en muchos aceites. Para la cuantificación de estos es necesario hacer una dilución de la muestra.

3.2. Análisis de muestras reales.

Se selecciono el aceite de la crisálida de *Bombix mori* Linn *Hibrido Pilamo 1* como muestra real por su importancia para el grupo de investigación de OLEOQUÍMICA en la Universidad Tecnológica de Pereira.

El análisis del aceite de crisálida de *Bombix mori* Linn *Hibrido Pilamo 1* (figura 10) reporta como ácido mayoritario al ácido oleico con 43,752 % de abundancia (tabla 3). Demostrando que el método es apto para el análisis de FAME's.

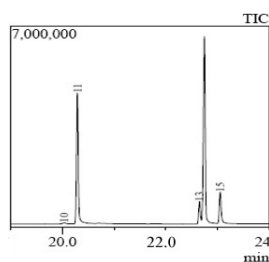


Figura 10. Cromatograma de los metilesteres del aceite de crisálida.

ACIDO GRASO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	PORCENTAJE (%)
Palmitoleico	20,027	0,851
Palmitico	20,289	26,300
Linolenico	22,655	5,656
Oleico	22,750	43,752
Estearico	23,057	6,655

Tabla 3. Porcentajes de ácidos grasos en la muestra real.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica cromatográfica acoplada a espectrometría de masas para el análisis de metilesteres de ácidos grasos, mostró valores estadísticos adecuados para la cuantificación de estos; coeficientes de correlación (R^2) cercanos a la unidad, intervalos de linealidad amplios, entre 0,0098 hasta 75 ppm, cubriendo así un rango amplio de concentraciones, límites de detección por debajo de 0,0030 ppm y cuantificación por encima de 0,0098, y altos valores de sensibilidad, especialmente con ionización por impacto electrónico donde la curva con menor sensibilidad es la del metil docohexanoato con 4.4445,4; lo que permite una adecuada diferenciación entre dos concentraciones cercanas.

Aunque las curvas por el modo de EI fueron más sensible que por CI, en promedio 60 veces (llegando hasta 300 veces), presenta la desventaja de que la mayoría de los compuestos tienen como ión de mayor abundancia a m/z 74 y no presenta el ión molecular, lo que hace ardua la identificación de los picos de los cromatogramas. Pero la ventaja de la ionización química en los metilesteres es que la mayoría de estos, presenta su ión molecular como $[M+1]^+$ y no tienen iones comunes, haciendo más sencilla la identificación de los compuestos derivatizados de ácidos grasos de cualquier matriz.

Aunque los dos modos de ionización tienen sus pros y sus contras, se recomienda la realización del análisis por ambos métodos, debido a la fácil identificación por el modo de CI y a la adecuada cuantificación por el modo de EI.

Se recomienda utilizar una columna polar, específica para FAME's con el objetivo de analizar y cuantificar isómeros de ácidos insaturados cis y trans.

Con la estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se deja una buena herramienta de análisis al grupo de olequímica, no solo para estudios en el área de la sericultura, sino también en las diferentes áreas de estudio del grupo como las oleorresinas y bio-combustibles.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE ORTEGA, L., et al., *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F. Industria. 2001, España.
- RIUS, F.X., et al., *La validación de métodos analíticos*. Revista Técnicas de laboratorio, 2000. **252**: p. 382-385.
- 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.
- 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.
- 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.
- McLAFFERTY, F.W. and F. TURECEK, *Interpretation of mass spectra*. 4 ed, ed. U.s. books. 1993, Sausalito, California.
- LONDOÑO DUQUE, B., *Diagnostico actual de la oleoquímica en Colombia*. 2004, Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. Tecnología Química.
- 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: .
- 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.
- NIÑO OSORIO, J., *Manual de practicas. Química organica II*, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de química.
- COY, G.A., *Protocolo. Estandarización de métodos analíticos*, ed. I.D.E.A.M.P.F. Ambiental. 1999, Bogotá. 4 - 5.
- SKOOG, D.A., F.J. HOLLER, and A.T. NIEMAN, *Principios de análisis instrumental*. 5° ed, ed. M.G. Hill. 2001, España.