

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 22.1
ÁCIDOS GRASOS POR CG		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden ser separados y cuantificados por cromatografía de gases.

La separación y cuantificación de los ácidos grasos constituye un método fiable y rápido para la tipificación y clasificación de una grasa.

La metilación tiene lugar en dos fases; una primera fase consiste en la interacción con metilato de sodio como agente saponificante en medio metanólico (agente esterificante) y una segunda fase mediante la acción del metanol acidificado con ácido clorhídrico.

MATERIAL

Balanza analítica.

Balanza granataria.

Balón de 250 ml, esmerilado.

Columna de las características indicadas en la metodología.

Cromatógrafo de gases provisto de registrador-integrador, equipamiento complementario y detector de ionización de llama.

Cronómetro.

Flujómetro de burbuja.

Matraz aforado de 100 ml.

Microjeringa para C.G., graduada, de 10 μ l.

Pipetas aforadas de 25 ml.

Placa calefactora.

Refrigerante de reflujo.

Tubos de ensayo, de 10 ml, con tapón roscado.

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 1'25N en alcohol metílico (Obtener ácido clorhídrico gaseoso y anhidro dejando caer ácido sulfúrico gota a gota sobre ácido clorhídrico concentrado, según se ve en el esquema adjunto. Trabajar en vitrina de gases y tomar las debidas precauciones para evitar succiones, observando continuamente el proceso. La cantidad absorbida de HCl se determina por pesadas sucesivas, hasta llegar a una concentración ligeramente superior a la deseada. Se admite cierta tolerancia, per la cual podemos utilizar una balanza granataria).

Aire sintético calidad cromatográfica.

Disolución saturada de NaCl (disolver NaCl pa en agua destilada hasta saturación).

Hexano pa.

Hidrógeno calidad cromatográfica

Metilato de sodio 0'2N (disolver 1'102 gramos de metilato de sodio ps hasta 1 litro en alcohol metílico pa).

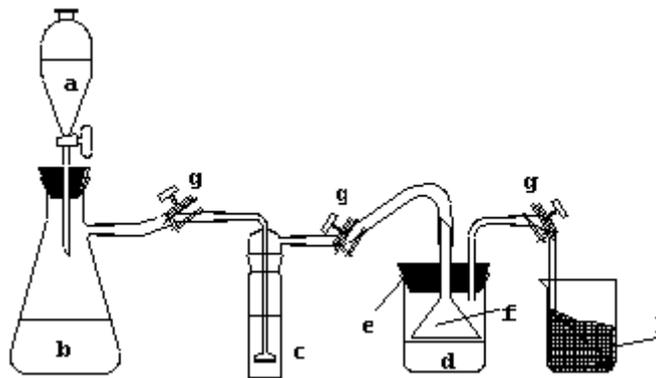
Nitrógeno calidad cromatográfica.

Trioleato de glicerina pa.

Esquema montaje para preparar HCl en metanol:

a)Ácido sulfúrico concentrado. b)Ácido clorhídrico concentrado (35 %). c)Torre de desecación d)Metanol

e)Tapón. f)Embudo. g)Pinzas de Hoffman. h)Gel de sílice.



METODOLOGÍA

- 1.- Pesar alrededor de 1 gramo de grasa perfectamente homogeneizada en el balón de 250 ml.
- 2.- Añadir 25 ml de disolución de metilato de sodio 0'2N, conectar el refrigerante de reflujo y llevar a ebullición, manteniéndola un mínimo de 5 minutos.
- 3.- Interrumpir la calefacción y añadir 25 ml de la disolución metanólica de ácido clorhídrico; conectar de nuevo el refrigerante de reflujo y llevar a ebullición como mínimo 5 minutos más.
- 4.- Enfriar, pero no demasiado (el balón debe de quedar entre tibio y caliente) y transferir a un recipiente de cuello largo y estrecho (puede servir un matraz aforado de 100 ml), lavando con 10 ml de hexano, que se pasan también al matraz aforado.
- 5.- Agitar imprimiendo movimientos suaves de rotación durante 1 o 2 minutos.
- 6.- Añadir disolución saturada de cloruro de sodio, hasta que la fase hexánica ocupe la zona del cuello del matraz. Dejar sedimentar hasta que la disolución hexánica quede bien clarificada (podemos ayudar al proceso imprimiendo rotaciones muy suaves al matraz, en posición vertical, manteniendo la base del mismo apoyada sobre la mesa de trabajo).
- 7.- Tomar con microjeringa, previamente limpiada con hexano, unos 2 μ l de la fase hexánica e inyectar en el cromatógrafo de gases (si no se inyecta al momento, pueden guardarse 4 o 5 ml de fase hexánica en tubos de 10 ml con tapón roscado, durante unos cuantos días).

Parámetros cromatográficos :

Gas portador = nitrógeno

Flujo gas portador = 50 ml/mn.

Columna = 15% etilenglicolsuccinato sobre polvo refractario de 40/60 mallas. 2 m X 4 mm diam int. Acondicionada de 15 a 24 horas a 220°C (sin conectar al detector) a un flujo de gas portador de 20 ml/mn.

Detector = Ionización de llama (FID), con llama de hidrógeno-aire

Temperatura de columna = 200 °C

Temperatura inyección = 250 °C.

Temperatura detector = 250 °C.

Atenuación de sensibilidad = entre 1.000 y 2.000.

Velocidad registro = 5 mm/mn.

El flujo de gas portador se verifica con un flujómetro de burbuja y un cronómetro a la salida de la columna. El valor que aquí sugerimos es únicamente orientativo. El valor óptimo puede determinarse experimentalmente de manera que el metiloleato (preparado a partir de un patrón de trioleato de glicerina) presente un tiempo de retención de alrededor de 14 o 15 minutos. Una vez establecido el flujo óptimo, lo utilizaremos en todas las determinaciones hasta que la columna empiece a envejecer.

CÁLCULOS

Expresaremos el resultado como composición relativa de los ácidos grasos en %, referidos al total de ácidos grasos. Consideremos que la cantidad de cada componente es proporcional al área del pico correspondiente (esta aproximación no es, en general, del todo exacta, pero para los ácidos grasos se considera aceptablemente satisfactoria).

El porcentaje de un determinado ácido graso será:

$$p(\%) = \frac{A_i}{A_T} \cdot 100$$

siendo A_i el área correspondiente del pico del ácido graso y A_T la suma de las áreas de todos los picos de todos los ácidos grasos.

OBSERVACIONES

Antes de realizar esta práctica deberá efectuarse un estudio previo y unas cuantas prácticas sencillas para familiarizar al estudiante con el uso del cromatógrafo de gases, en el caso de que no se tenga experiencia previa.

Para un cálculo más exacto deberían considerarse los factores de respuesta de los diferentes ácidos grasos, determinados teóricamente considerando la estructura de los ésteres metílicos y la respuesta relativa del FID para cada configuración química o, todavía mejor, experimentalmente utilizando patrones de los diferentes ácidos grasos; de todas formas, el cálculo sin tomar en consideración esos factores es, en general, suficientemente aproximado para efectos de la caracterización y clasificación de la grasa analizada.

Si se trata de ácidos grasos libres o de oleinas industriales de acidez superior al 80 %, puede omitirse la metanolisis alcalina.

El método no es apto para grasas con contenido insaponificable superior al 2 % (la mayoría de grasas no superan este valor).

Cuestionario 22.1. - Ácidos grasos por CG

1.- Por qué la temperatura de acondicionamiento de la columna es superior a la temperatura de trabajo?

- 2.- Como se detecta el envejecimiento de la columna?
- 3.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos.
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 6.- Per qué puede omitirse la metanolisis alcalina en los ácidos grasos libres?
- 7.- Como serian los cálculos teniendo en cuenta los factores de respuesta?
- 8.- Idear el esquema de un protocolo de análisis para calcular los factores de respuesta, trabajando con patrones puros de ácidos grasos.