

Garantía de la idoneidad del sistema para el análisis de FAME *cis-trans* con el método AOAC 2012.13 en un sistema GC Agilent 8890 con congelación de tiempos de retención

Autor

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El método AOAC 2012.13 determina el contenido de ácidos grasos en productos lácteos y preparados para lactantes mediante cromatografía de gases capilar con detección de ionización de llama. Este método se aplicó en un sistema GC Agilent 8890 con una columna de 100 m CP-Sil 88 y, además de un conjunto común de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos, se analizó la eficiencia de la separación de los ácidos oleico, linoleico y linolénico de forma más detallada para lo cual se utilizaron 19 isómeros *cis-trans* monoinsaturados y poliinsaturados de la familia del C18. Se evaluó la resolución entre los pares críticos clave de FAME *cis-* y *trans-* con un estándar cualitativo. Por último, se aplicó también la congelación de tiempos de retención (RTL) a fin de evitar la necesidad de una nueva alineación después del mantenimiento de la columna.

Introducción

Las grasas lácteas y vegetales contienen triglicéridos, que son ésteres de glicerol acoplados a tres cadenas de ácidos grasos. Los ácidos grasos constan de un grupo carboxilo terminal conectado a una cadena de hidrocarburos que puede ser corta o larga, lineal o ramificada y saturada, mono o poliinsaturada. La configuración y ubicación del doble enlace en las grasas insaturadas da como resultado numerosos isómeros posicionales y *cis-trans*. La identificación adecuada de los isómeros es crítica para lograr un etiquetado nutricional preciso.

La separación e identificación de los homólogos e isómeros de los ácidos grasos de una matriz compleja es una tarea compleja. Después de la esterificación, los correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se pueden analizar de forma reproducible mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama. El orden de elución del isómero y la eficiencia de separación dependen en gran medida del tipo y longitud de la fase estacionaria de la columna. Aunque ninguna columna puede resolver por completo la diversa gama de isómeros *cis-trans* de los FAME, una columna capilar de 100 metros recubierta con una fase estacionaria de cianopropil altamente polar como la CP-Sil 88 permite una separación detallada y fiable de la mayor parte de los isómeros *cis* y *trans* de los FAME. A diferencia de las columnas de cera tradicionales, los isómeros *trans* se eluyen antes que los isómeros *cis* en la fase estacionaria cianopropílica altamente polar.

Experimento

Para generar los datos se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 8890 configurado con un inyector split/splitless (SSL), un detector de ionización de llama (FID) y un muestreador automático de líquidos Agilent 7693A (ALS).

Productos químicos

Se compraron patrones analíticos para evaluar la prestación de la columna de los FAME:

- Una mezcla de 37 FAME (47885-U) con FAME de C4 a C24 en el intervalo de concentración de 100 a 600 µg/ml
- Una mezcla de cuatro componentes de cuatro componentes con éster metílico de ácido linoleico total *cis-trans* de 10 mg/ml (CRM47791)

- Una mezcla de isómeros de éster metílico de ácido linoléico de ocho componentes (L6031) con un contenido de % en peso para cada componente en el intervalo del 3 al 30 %
- Una mezcla de prestación de la columna de FAME *cis-trans* (40495-U) con varios FAME a 2,5 mg/ml

Todas las mezclas anteriores se compraron a MilliporeSigma (St. Louis, MO). Se compró a Restek (Bellefonte, PA) una mezcla de FAME *cis-trans* de ocho componentes (35079).

Tabla 1. Condiciones del instrumento.

Condiciones del GC Agilent 8890 - Método oficial de la AOAC 2012.13	
Inyección	
Tamaño de jeringa	10 µl, ref. G4513-80204
Volumen de inyección	1 µl
Inyector	inyector split/splitless, modo split
Temperatura	250 °C
Relación de split	10:1
Flujo de purga del séptum	3 ml/min
Columna	Agilent CP-Sil 88, ref. CP7489
Dimensiones	100 m x 0,25 mm, 0,20 µm
Gas portador	Flujo constante de 0,8 ml/min
Horno	
Temperatura inicial	60 °C
Tiempo de mantenimiento inicial	5 minutos
Rampa	15 °C/min hasta 165 °C, mantener 1 minutos, 2 °C/min hasta 225 °C, mantener 20 minutos
Detector	
Tipo	FID
Temperatura	250 °C
Flujo de aire	400 ml/min
Flujo de combustible H ₂	40 ml/min
Flujo de N ₂ auxiliar	25 ml/min

Resultados y comentarios

Para evaluar la separación en todo el intervalo (Figura 1), se inyectó una mezcla de 37 FAME de C4:0 a C24:0 en disolvente de diclorometano. El valor programado de 60 °C para la temperatura inicial del horno y el tiempo de mantenimiento garantizan la separación de C4:0 del frente del disolvente, un indicador importante de la calidad de la leche. El programa de temperatura del horno en rampa permite la separación eficiente de los isómeros de FAME *cis-trans* y los poliinsaturados de cadena larga, con excepción de la coelución entre los picos C23:0 y C20:4n6 en aproximadamente 48 minutos. Sin embargo, el C23:0 no se encuentra comúnmente en los productos lácteos; por lo tanto, no es motivo de preocupación.

Se realizó una separación detallada de los isómeros *cis-trans* con mezclas de estándar de referencia disponibles en el mercado. La mezcla de FAME de ocho componentes *cis-trans* en diclorometano de Restek se diluyó 20 veces en diclorometano y se inyectó en el GC. El método es muy adecuado para la resolución de los seis isómeros de FAME *cis-trans* C18:1 (Figura 2).

Si bien existe una coelución menor entre los isómeros *trans*, el grupo está bien separado de los isómeros monoinsaturados C18, lo cual es necesario ya que los ácidos grasos *trans* se presentan como grupo en el Método Oficial de la AOAC 2012.13.

Para caracterizar la separación de los isómeros C18:2, se diluyó una mezcla de FAME de éster metílico de ácido linoleico en diclorometano (MilliporeSigma CRM47791) hasta una concentración final de 500 mg/l. La Figura 3 muestra que todos los isómeros de FAME linoleicos están bien resueltos.

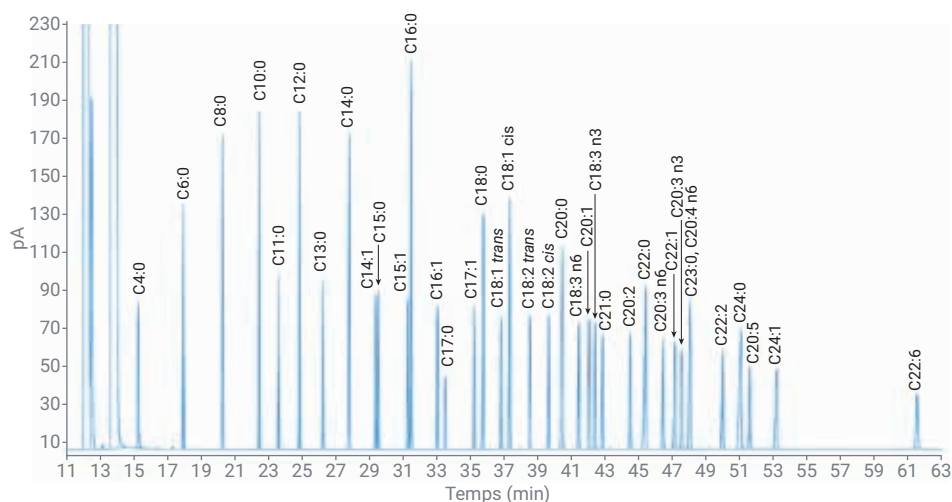


Figura 1. Cromatograma de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos.

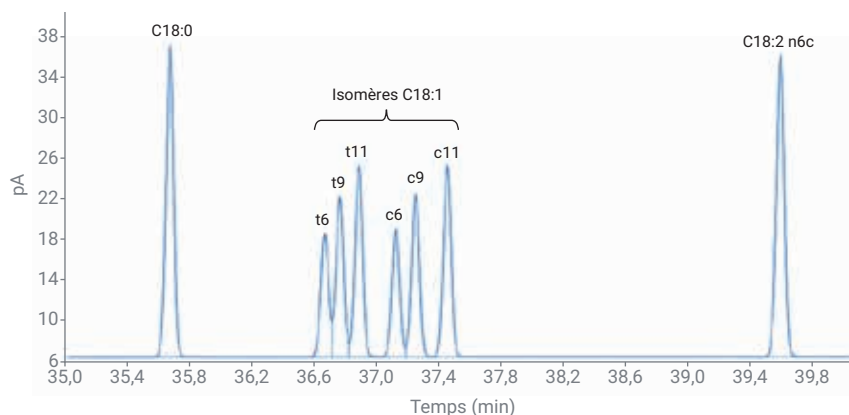


Figura 2. Cromatograma ampliado de isómeros C18:1 por la AOAC 2012.13.

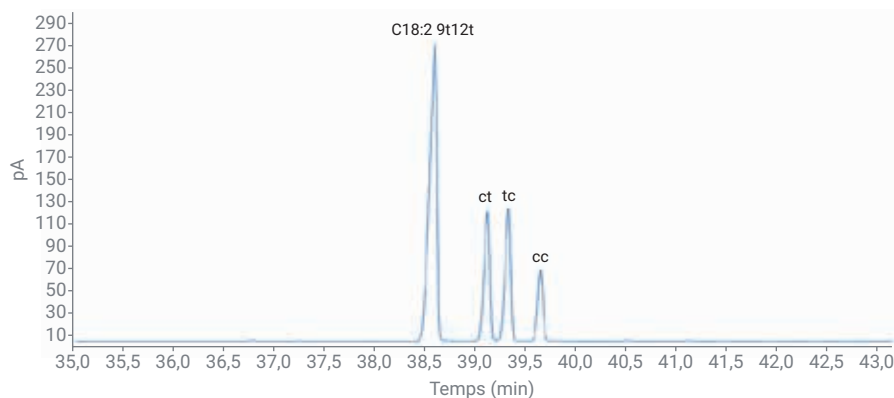


Figura 3. Cromatograma ampliado de isómeros C18:2 por la AOAC método 2012.13.

Por último, se examinó la prestación de la columna del método para los isómeros C18:3 mediante la inyección de una mezcla de éster metílico de ácido linoléico (MilliporeSigma L6031), diluido a 2,5 mg/ml en diclorometano (Figura 4). Ninguna columna puede resolver completamente los isómeros del ácido linoléico; sin embargo, para fines de información nutricional, los isómeros que contienen *trans* están bien separados del éster metílico del ácido *alpha*-linoléico.

El método AOAC 2012.13 requiere una verificación de la prestación de la columna antes de la calibración. La resolución se determina entre *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t y el pico *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c (Figura 5, recuadro). Mediante la Ecuación 1, se logra una resolución aceptable cuando el valor calculado de R es equivalente o superior a 1,00. Se inyectaron cinco réplicas de una mezcla cualitativa de prestación de la columna de FAME *cis-trans* (MilliporeSigma 40495-U) para evaluar la resolución y la reproducibilidad del área/tiempo de retención.

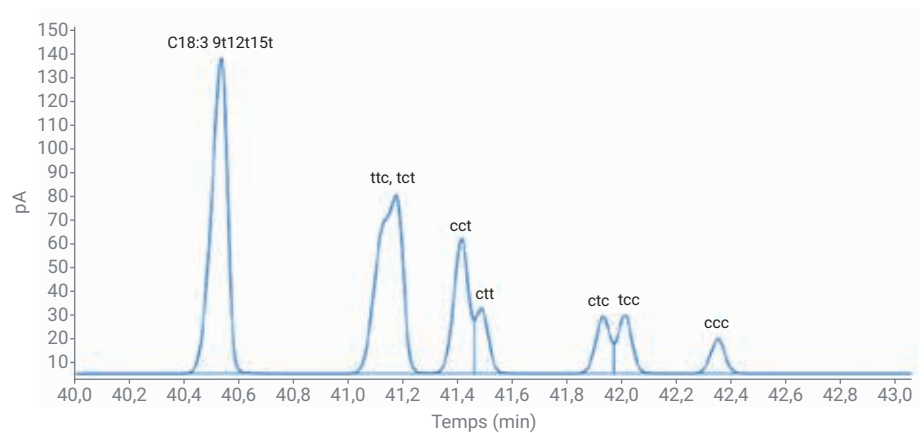


Figura 4. Cromatograma ampliado que muestra la resolución de isómeros C18:3 por la AOAC método 2012.13.

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

Ecuación 1. Resolución de pico a la mitad de la altura.

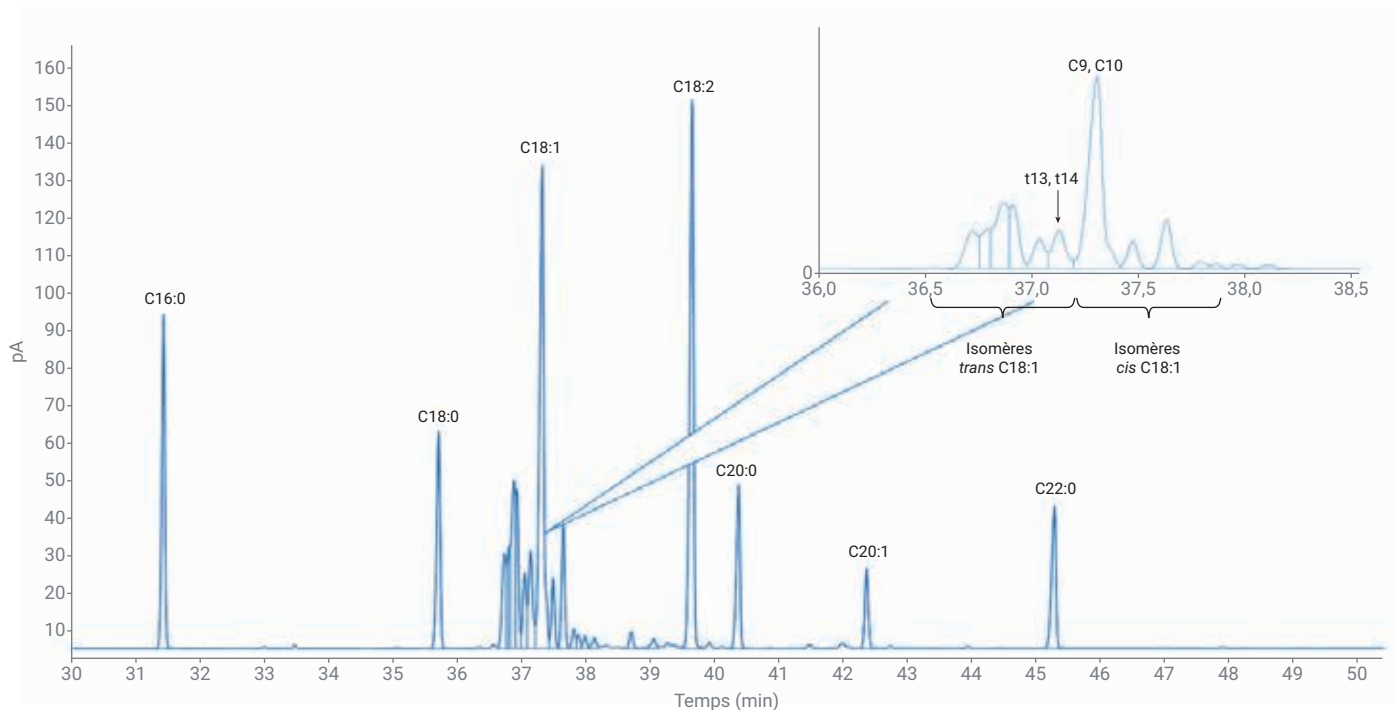


Figura 5. Cromatograma ampliado del estándar de prestación cualitativa de la columna.

La Tabla 2 resume los resultados del par crítico utilizado en la verificación de la resolución: la reproducibilidad del tiempo de retención para ambos isómeros es excelente, con una desviación estándar relativa (RSD) del 0,007 %. La precisión del área de pico es inferior al 2,5 % de RSD en todos los isómeros. La resolución media de los picos a media altura de 1,494 excede el requisito mínimo de resolución del método.

Congelación de tiempos de retención

El conjunto de FAME determinado por la AOAC 2012.13 requiere tanto precisión de temperatura como de flujo para una identificación adecuada; por lo tanto, es un excelente candidato para la RTL. La función RTL de Agilent proporciona una buena reproducibilidad a largo plazo en un instrumento determinado y evita tener que ajustar los tiempos de retención después del mantenimiento de la columna. Puede mantener los mismos tiempos de retención después de transferir el método a un GC diferente, lo que facilita la transferencia del método y simplifica las comparaciones entre laboratorios. La RTL ajusta y congela correctamente los tiempos de retención de un compuesto específico mediante el estudio de la relación entre los parámetros del inyector y el tiempo de retención durante una serie de análisis de referencia, la calibración del sistema con los resultados y el almacenamiento de la relación en el archivo del método.

Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition incluye un asistente de RTL para guiar al operador a través del proceso mediante la selección de un método de adquisición para la congelación y elección de un compuesto diana a partir de un archivo de datos previamente adquirido. A continuación, el asistente de RTL configura una serie de calibraciones de presión en función de los parámetros especificados por el método de adquisición designado. Se realiza un análisis con el valor programado de presión original y dos análisis con una desviación de la presión del 15 % por encima o por debajo del valor programado del método, respectivamente.

La desviación en los valores programados de presión simula cambios en la longitud de la columna que se encuentran comúnmente después del mantenimiento, como, por ejemplo, después del recorte de la columna. Los métodos bloqueados no requieren la realineación del tiempo de retención después del mantenimiento o sustitución de la columna; antes bien, los tiempos de retención del instrumento

original se pueden ajustar a través de un simple estándar de rebloqueo. Si el estándar de rebloqueo sirve también como estándar de evaluación de la prestación de la columna, los usuarios pueden satisfacer los requisitos de evaluación de la prestación de la columna especificados por el método AOAC 2012.13 en un solo paso.

Tabla 2. Resultados de cinco inyecciones repetidas de una mezcla de estándar de FAME de prestación cualitativa de la columna.

Valor	Descripción	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	RSD
t_{R1}	Tiempo de retención en minutos, pico t13/t14	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007%
t_{R2}	Retención 2 en min, pico c9/c10	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007%
	Área de pico t13/t14	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356%
	Área de pico c9/c10	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458%
$W_{0,5h1}$	Anchura a media altura, pico t13/t14	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969%
$W_{0,5h2}$	Anchura a media altura, pico c9/c10	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646%
R	Resolución de pico a la mitad de la altura	1,496	1,506	1,496	1,496	1,475	0,77%

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	- 15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+ 15%	29.323 psi	107

Injection Source: GC Injektor - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.

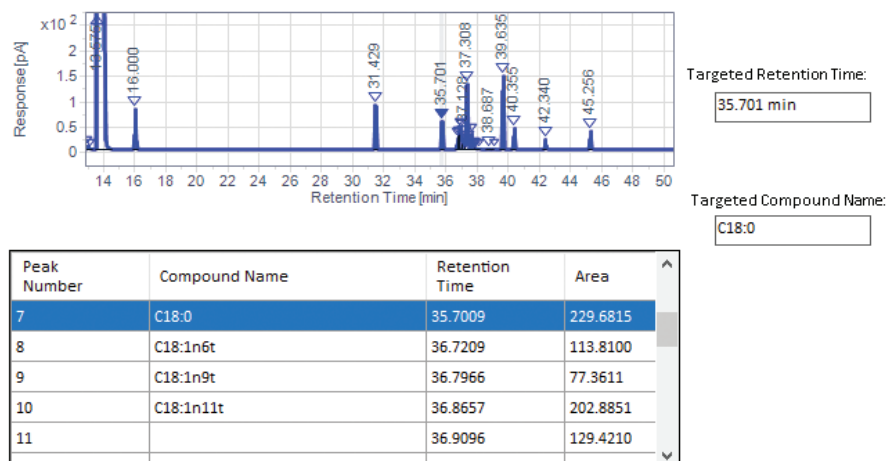


Figura 6. Pantalla de configuración del asistente de congelación de tiempos de retención.

Se utilizó el estándar de mezcla de prestación de la columna de FAME *cis-trans* para bloquear el método. Se seleccionaron un método de adquisición, un método de procesamiento y un archivo de resultados procesados de una inyección previamente adquirida del estándar de mezcla de prestación de la columna. Se eligió el C18:0 como el compuesto diana para la RTL. Como se muestra en la Figura 6, el asistente de RTL guió el proceso de calibración de presión mediante el pico C18:0 con un tiempo de retención diana de 35,701 minutos. La curva de calibración de presión lograda a partir de la serie de tres análisis programados automáticamente por el asistente de RTL reveló una excelente correlación (Figura 7). A continuación, se bloqueó el método analítico a la presión indicada de 25,498 psi. Posteriormente, se llevó a cabo el mantenimiento de la columna recortando aproximadamente 0,5 m desde la cabeza de la columna CP-Sil 88 100 m.

Para evaluar el grado de pérdida de retención por el cambio en la longitud de la columna, se volvió a analizar el estándar de la mezcla de prestación de la columna de FAME *cis-trans* después del mantenimiento;

el tiempo de retención del pico C18:0 objetivo se adelantó en aproximadamente 0,232 minutos. Si el sistema no se hubiera bloqueado, el operador tendría que haber analizado un estándar con el conjunto completo de FAME deseados y volver a introducir manualmente los tiempos de retención de analitos en el método de procesamiento de datos.

En lugar de volver a introducir manualmente los nuevos tiempos de retención del analito, el método analítico se volvió a bloquear con el asistente de RTL y se aplicó un nuevo valor programado de presión de 25,253 psi. Este nuevo valor programado de la presión se adapta al cambio en la longitud de la columna para determinar los tiempos de retención esperados, lo que facilita una preparación más rápida

del sistema. El estándar de mezcla de prestación de la columna de FAME *cis-trans* se volvió a inyectar para determinar si los nuevos valores programados de presión daban como resultado los tiempos de retención esperados. La Figura 8 muestra un resumen de los resultados, junto con una superposición cromatográfica. Los tiempos de retención de los recortes de postcolumna rebloqueados coincidieron en gran medida con los tiempos de retención originales antes del recorte, y los cambios en los tiempos de retención oscilaron entre 0,000 y 0,009 minutos para cada uno de los analitos clave en la columna de 100 m. Obsérvese el tiempo de retención real de C18:0 de 35,700 frente al tiempo de retención inicialmente previsto de 35,701 minutos, una diferencia porcentual relativa de 0,0028 %.



Figura 7. Resultados de la calibración de presión con congelación del tiempo de retención.

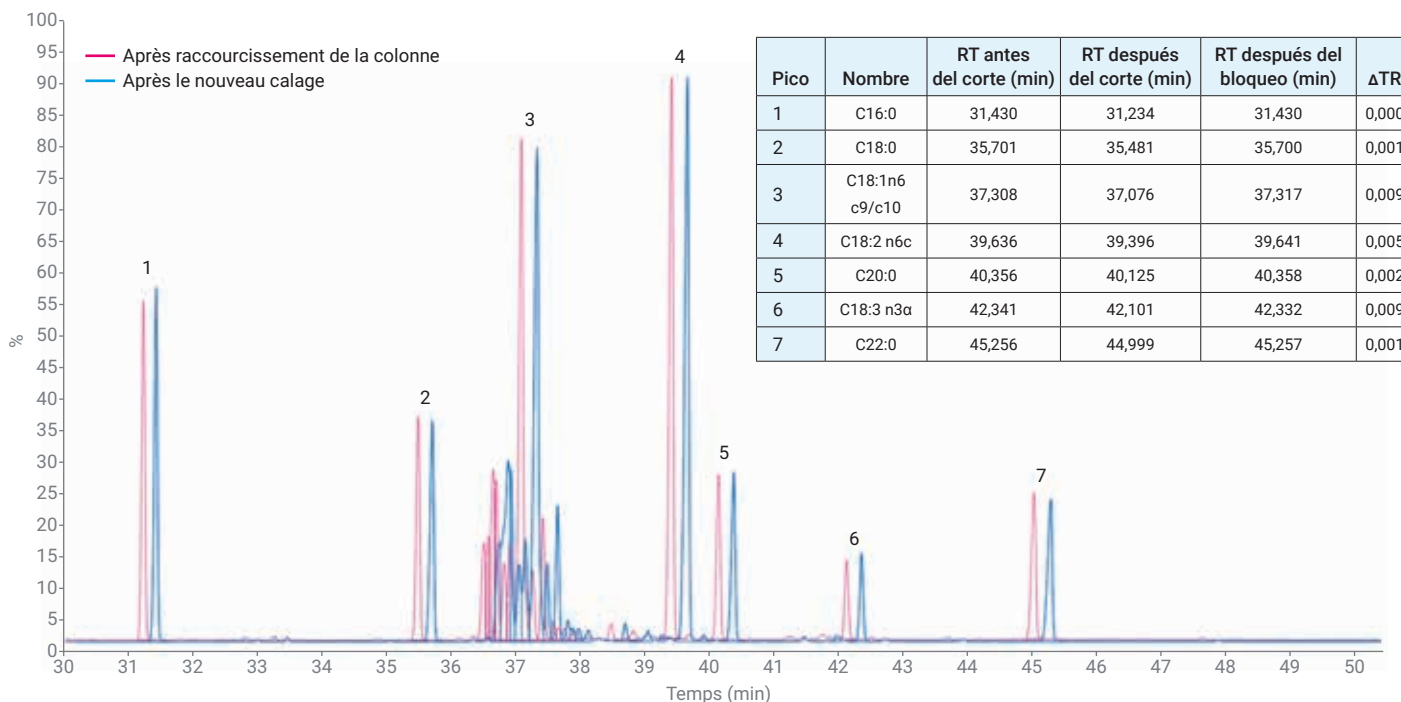


Figura 8. Resultados y superposición cromatográfica ampliada del estándar de prestación de la columna antes y después del rebloqueo.

Conclusión

La separación de los isómeros de FAME con una columna Agilent CP-Sil 88 de 100 m en un sistema GC Agilent 8890 permite una resolución fiable que excede los requisitos mínimos de evaluación de la prestación de la columna especificados por el método AOAC 2012.13. Se obtuvo una excelente reproducibilidad de inyección de un estándar de prestación de la columna FAME especializado, con una RSD del tiempo de retención de 0,007 % para dos isómeros clave de C18. Por último, el uso de un estándar de prestación de la columna junto con la función RTL exclusiva de Agilent permite identificar correctamente los isómeros de FAME de forma sistemática, acelerar el tiempo de funcionamiento continuado después del mantenimiento instrumental y facilitar las comparaciones entre laboratorios.

Referencias

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5989-3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Mejora del análisis de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-8706ES, **2018**.

www.agilent.com/chem

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Impreso en EE.UU., 15 de noviembre de 2019
5994-1184ES

