

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE  
CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**GONZALEZ CASADO, ANTONIO  
CURSO 95-96**

**TESIS DOCTORAL**

**Antonio González Casado  
Granada, 1996**



Biblioteca Universitaria de Granada



01534164

T. Prov. 16/85

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

T  
16  
46

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE  
CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

***TESIS DOCTORAL***

***Antonio González Casado  
Granada, 1996***

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**GRANADA**  
Nº Documento 619681707  
Nº Copia 12123128X

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE  
CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**por**

***Antonio González Casado***

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

VISADA en Granada, a 4 de Junio de 1996.



Fdo.- Prof. Dr. D. ***José Luis Vilchez Quero***,  
Profesor Titular del Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de Granada y Prof.  
Dr. D. ***Enrique J. Alonso Hernández***, Profesor  
Titular del mismo Departamento.

**MEMORIA** presentada para  
aspirar al Grado de Doctor en  
Ciencias, Sección de Químicas.

Granada, a 4 de Junio e 1996.



Fdo.- ***Antonio González Casado***  
Licenciado en Ciencias,  
Sección de Químicas.



---

OBJETO DE LA TESIS .....	1
INTRODUCCIÓN .....	5
1.- Ácidos grasos saturados .....	8
2.- Ácidos grasos insaturados .....	9
3.- Propiedades de los ácidos grasos .....	12
3.1.- Solubilidad en agua .....	12
3.2.- Adición de iodo .....	13
3.3.- Oxidación de ácidos grasos saturados .....	14
3.4.- Oxidación de ácidos grasos insaturados .....	15
3.5.- Saponificación .....	15
3.6.- Detergencia .....	17
4.- Compuestos sintéticos con actividad superficial .....	17
4.1.- Surfactantes aniónicos .....	20
4.2.- Surfactantes catiónicos .....	21
4.3.- Surfactantes no iónicos .....	21
4.4.- Surfactantes anfóteros .....	21
5.- Mercado actual de los detergentes .....	22
6.- Análisis de los ácidos grasos .....	24
6.1.- Extracción .....	24
6.2.- Espectroscopía UV .....	25

---

6.3.- Espectroscopía VIS .....	26
6.4.- Espectroscopía IR .....	26
6.5.- Espectroscopía de RMN .....	27
6.6.- Fluorescencia .....	28
6.7.- Espectrometría de masas .....	29
6.8.- Inmunoensayos .....	41
6.9.- Cromatografía en capa fina .....	41
6.10.- Cromatografía Gas-Líquido .....	42
6.10.1.- Esterificación de los ácidos grasos .....	42
6.10.2.- Esterificación con HCl (metanol) .....	43
6.10.3.- Esterificación con trihaluro de boro .....	44
6.10.4.- Esterificación con $\text{ICH}_3$ .....	45
6.10.5.- Esterificación con diazometano .....	45
6.10.6.- Esterificación con TMAH .....	47
6.10.7.- Esterificación con dimetilformamida .....	48
6.11.- Cromatografía líquida .....	49
6.12.- Cromatografía líquida de alta resolución .....	49
6.13.- Técnicas eléctricas .....	50
6.13.1.- Potenciometría .....	50
6.13.2.- Conductometría .....	52
6.13.3.- Polarografía .....	52
7.- Depuración de aguas residuales .....	54

## CAPÍTULO I.

EXPERIMENTAL: DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN .....	59
1.- Disoluciones y reactivos empleados .....	61

---

1.1.- Disoluciones . . . . .	61
1.2.- Reactivos sólidos . . . . .	63
1.3.- Disolventes orgánicos . . . . .	64
1.4.- Ácidos inorgánicos . . . . .	64
2.- Instrumentación y material de laboratorio . . . . .	65
2.1.- Instrumentación . . . . .	65
2.2.- Aparatos . . . . .	66
2.3.- Material de laboratorio . . . . .	67
3.- Ordenadores y paquetes informáticos . . . . .	68
3.1.- Ordenadores . . . . .	68
3.2.- Impresoras . . . . .	68
3.3.- Paquetes informáticos . . . . .	68

## CAPÍTULO II.

### QUIMIOMETRÍA: APLICACIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE GASES . . 71

1.-Estudio estadístico de la metodología del patrón interno	
en cromatografía de gases . . . . .	74
1.1.- Introducción . . . . .	74
1.2.- Generación de variables aleatorias . . . . .	78
1.3.- Comprobación normalidad de cocientes . . . . .	81
1.4.- Aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov . . . . .	85
1.4.1.- Áreas simuladas independientes . . . . .	85
1.4.2.- Áreas simuladas correlacionadas . . . . .	90
1.4.3.- Áreas experimentales . . . . .	92
1.5.- Conclusiones . . . . .	93

2.- Medida del blanco cromatográfico. Aplicación al cálculo del límite de detección recomendado por la IUPAC .....	96
2.1.- Introducción .....	96
2.2.- Cálculo de la anchura base, $W_b$ .....	99
2.3.- Cálculo de la anchura base a concentración "cero" .....	102
2.4.- Medida de la señal del blanco cromatográfico .....	103
2.5.- Test para el blanco cromatográfico .....	103
2.6.- Desarrollo experimental .....	104

### CAPÍTULO III.

#### DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE

#### CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....

1.- Esterificación de los ácidos grasos .....	121
1.1.- Introducción .....	121
1.2.- Esterificación con TMAH .....	122
1.3.- Esterificación con $F_3B$ .....	125
1.4.- Conclusiones .....	131
2.- Parámetros instrumentales .....	137
2.1.- Optimización variables inyección .....	137
2.1.1.- Flujo de la purga del septum .....	137
2.1.2.- Flujo total .....	139
2.1.3.- Presión en cabeza de columna .....	143
2.1.4.- Tiempo de purga .....	146
2.1.5.- Temperatura del bloque de inyección .....	153
2.2.- Optimización variables separación cromatográfica .....	159
2.2.1.- Velocidad lineal y flujo volumétrico .....	159



---

2.2.2.- Programación de la temperatura de columna . . . . .	163
2.2.3.- Temperatura inicial de la columna . . . . .	163
2.2.4.- Gradiente de temperatura . . . . .	166
2.2.5.- Temperatura final del gradiente . . . . .	168
2.2.6.- Conclusiones . . . . .	169
2.3.- Optimización de variables asociadas al detector de masas . .	171
2.3.1.- Temperatura de la interfase GC/MS . . . . .	171
2.3.2.- Parámetros modo SCAN . . . . .	174
2.3.2.1.- Rango masa/carga . . . . .	177
2.3.2.2.- Número de medidas de cada ión . . . . .	179
2.3.2.3.- Valor umbral . . . . .	185
2.3.2.4.- Voltaje electrón-multiplicador . . . . .	188
2.3.2.5.- Borrado disolvente . . . . .	192
2.3.3.- Parámetros modo SIM . . . . .	193
2.3.3.1.- Iones seleccionados para el análisis . . . . .	195
2.3.3.2.- Iniciación del análisis de cada ión . . . . .	196
2.3.3.3.- Tiempo de medida de cada ión . . . . .	197
3.- Método analítico . . . . .	199
3.1.- Análisis modo SCAN . . . . .	199
3.1.1.- Establecimiento rectas de calibrado . . . . .	199
3.1.2.- Parámetros de calidad . . . . .	215
3.2.- Análisis modo SIM . . . . .	225
3.2.1.- Rango 0 - 1 mg.L <sup>-1</sup> . . . . .	225
3.2.1.1.- Establecimiento rectas de calibrado . . . . .	225
3.2.1.2.- Parámetros de calidad . . . . .	239
3.2.2.- Rango 0 - 10 mg.L <sup>-1</sup> . . . . .	245

---

3.2.2.1.- Establecimiento rectas de calibrado . . . . .	245	
3.2.2.2.- Parámetros de calidad . . . . .	256	
CAPÍTULO IV.		
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN DIVERSAS MATRICES . . . . .		263
1.- Determinación de ácidos grasos agua potable . . . . .	267	
1.1.- Introducción . . . . .	267	
1.2.- Optimización variables extracción líquido-líquido . . . . .	270	
1.2.1.- Disolvente orgánico . . . . .	270	
1.2.2.- Razón de fases . . . . .	272	
1.2.3.- Efecto salino . . . . .	275	
1.2.4.- Tiempo de agitación . . . . .	277	
1.2.5.- Estudio del pH . . . . .	278	
1.3.- Validación del método de extracción. Aplicación al agua potable de la ciudad de Granada . . . . .	281	
1.3.1.- Calibrado con patrones . . . . .	282	
1.3.2.- Calibrado con adición de patrón . . . . .	282	
1.3.3.- Calibrado de Youden . . . . .	283	
1.3.4.- Exactitud del método . . . . .	284	
1.3.5.- Comentario resultados . . . . .	311	
1.3.6.- Análisis de la muestra . . . . .	312	
2.- Determinación de ácidos grasos en formulaciones comerciales . . . . .	313	
2.1.- Aplicación a jabones de mano . . . . .	314	
2.1.1.- Método de extracción . . . . .	314	
2.1.2.- Validación y aplicación a jabón NIVEA . . . . .	315	
2.1.2.1.- Calibrado con patrones . . . . .	315	

---

2.1.2.2.- Calibrado con adición de patrón . . . . .	316
2.1.2.3.- Calibrado de Youden . . . . .	317
2.1.2.4.- Exactitud del método . . . . .	317
2.1.2.5.- Comentario resultados . . . . .	339
2.1.2.6.- Análisis de la muestra . . . . .	340
2.1.3.- Aplicación y validación al jabón TOJADERMO . . .	341
2.1.3.1.- Calibrado de Youden . . . . .	341
2.1.3.2.- Análisis de la muestra . . . . .	348
2.2.- Aplicación a polvos de acción intensa . . . . .	349
2.2.1.- Método de extracción . . . . .	349
2.2.2.- Validación y aplicación al polvo de acción intensa MICOLOR . . . . .	350
2.2.2.1.- Calibrado con patrones . . . . .	350
2.2.2.2.- Calibrado con adición de patrón . . . . .	351
2.2.2.3.- Calibrado de Youden . . . . .	352
2.2.2.4.- Exactitud del método . . . . .	352
2.2.2.5.- Comentario resultados . . . . .	374
2.2.2.6.- Análisis de la muestra . . . . .	375
2.2.3.- Aplicación y validación al polvo de acción intensa LEL . . . . .	376
2.2.3.1.- Calibrado de Youden . . . . .	376
2.2.3.2.- Análisis de la muestra . . . . .	383
3.- Determinación de ácidos grasos en agua residual bruta . . . . .	386
3.1.- Introducción . . . . .	386
3.2.- Optimización variables método extracción . . . . .	387
3.2.1.- Tiempo agitación/sonicación . . . . .	387

---

3.2.2.- Dilución .....	391
3.2.3.- Método de extracción .....	391
3.3.- Validación y aplicación a agua residual bruta .....	392
3.3.1.- Calibrado con patrones .....	393
3.3.2.- Calibrado con adición de patrón .....	393
3.3.3.- Calibrado de Youden .....	394
3.3.4.- Exactitud del método .....	395
3.3.5.- Comentario resultados .....	418
3.4.- Análisis de la muestra .....	419
4.- Determinación de ácidos grasos en fangos de depuradora (EDAR)	421
4.1.- Introducción .....	421
4.2.- Optimización variables extracción .....	423
4.2.1.- Preparación de la muestra .....	423
4.2.2.- Tiempo agitación/sonicación .....	424
4.2.3.- Relación masa fango/volumen agua desionizada ...	426
4.2.4.- Método de extracción .....	427
4.3.- Aplicación y validación del método a fangos EDAR .....	428
4.3.1.- Método de referencia .....	428
4.3.2.- Desarrollo experimental ambos métodos .....	429
4.3.2.1.- Método propuesto .....	429
4.3.2.2.- Método de referencia .....	430
4.3.3.- Comparación resultados ambos métodos .....	440
CONCLUSIONES .....	447

## **OBJETO DE LA TESIS**



---

El objeto de la presente Memoria de Doctorado es la aplicación de la Cromatografía de Gases con detección por Espectrometría de Masas a la determinación de los ácidos grasos presentes en formulaciones comerciales de jabones, aguas potables, aguas residuales y fangos digeridos de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). Por otra parte se pretende profundizar en el conocimiento de los criterios metodológicos básicos adoptados para el establecimiento del límite de detección y la aplicación del método de patrón interno en esta técnica.

La metodología existente en la literatura científica para la determinación de ácidos grasos presenta siempre unas etapas a nuestro juicio tediosas y por tanto manifiestamente mejorables, como es el procedimiento de extracción Soxhlet durante 72 horas, lo que conduce a un excesivo tiempo de análisis.

Por otra parte, en la actualidad, para el cálculo del límite de detección en cromatografía de gases no existe ningún criterio que contemple la integración del área del blanco cromatográfico, ya que todos están basados en otros parámetros como es la relación señal/ruido, la mínima cantidad

detectable o la extrapolación a concentración cero etc. Así mismo se han realizado numerosos y variados estudios sobre la metodología de patrón interno, pero ninguno hace referencia a los requisitos estadísticos que deben cumplir las variables en lo que se refiere a los requisitos de "normalidad" para que le puedan ser aplicado un ajuste lineal por mínimos cuadrados.

Como consecuencia en la investigación a realizar nos proponemos como objetivos:

- Estudios de optimización de las variables tanto químicas como instrumentales para la determinación de ácidos grasos ( $C_8-C_{22}$ ) en aguas residuales y fangos EDAR mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas.

- Propuesta de un criterio para la integración del blanco cromatográfico, a fin de incluir éste en el calibrado y hacer un cálculo del límite de detección siguiendo las recomendaciones de la IUPAC.

- Estudio de los límites de aplicabilidad del método del patrón interno para la obtención de calibrados que permitan su correcto ajuste lineal por mínimos cuadrados.



## INTRODUCCIÓN



Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos cuya fórmula general puede ser representada por R-COOH, en la que R indica la presencia de un elevado número de átomos de carbono. Tal cadena puede ser saturada (ácidos grasos saturados) o no saturada (ácidos grasos insaturados).

Casi todos los ácidos grasos naturales tienen número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 22, siendo los más abundantes los de 16 o 18. Algunos de cadena mas corta, como el ácido butírico, se suele también incluir por su presencia en la mantequilla y por su importancia en el metabolismo de los ácidos grasos. Rara vez aparecen en estado libre en la naturaleza siendo generalmente componentes de las moléculas de los lípidos. La hidrólisis de estos origina la aparición de ácidos grasos en las células y en los tejidos.

## 1.- ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

Son aquellos cuya cadena hidrocarbonada sólo contiene enlaces  $\sigma$ , sin presentar ningún centro de insaturación. Sus propiedades físicas varían con la longitud de la cadena, como puede verse, por ejemplo, con la temperatura de fusión, cuyos valores se recogen en la tabla 1, en la que están reunidos algunos de los que se encuentran en la naturaleza.

Aunque se les debe de nombrar de acuerdo con las normas I.U.P.A.C., es muy frecuente hacerlo por su nombre común que suele estar derivado del organismo en que se ha encontrado.

**Tabla 1.** Algunos ácidos grasos saturados naturales.

Nº C	Fórmula	Nombre IUPAC	Nombre común	Origen	Pf (°C)
4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	n-butanoico	Butírico	mantequilla ( <i>butirum</i> )	-8
6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	n-hexanoico	Caproico	cabra ( <i>caper</i> )	-3
8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	n-octanoico	Caprílico	cabra ( <i>caper</i> )	17
10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	n-decanoico	Cáprico	cabra ( <i>caper</i> )	32
12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	n-dodecanoico	Láurico	laurel	44
14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	n-tetradecanoico	Mirístico	nuez ( <i>myristica</i> )	54
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	n-hexadecanoico	Palmítico	aceite de palma	63
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	n-octadecanoico	Estearico	sebo ( <i>stear</i> )	70
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	n-eicosanoico	Araquídico	cacahuete ( <i>arachis</i> )	76
24	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	n-tetracosanoico	Lignocérico		86

## 2.- ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Son aquellos que tienen uno o más enlaces dobles en su cadena hidrocarbonada y en alguna ocasión enlaces triples, diferenciándose unos de otros en la longitud de la cadena y en el número y posición de los enlaces dobles. En la naturaleza suelen predominar sobre los saturados.

En la mayoría de los ácidos grasos insaturados existe un doble enlace entre los carbonos 9 y 10, teniendo, en el caso de que exista más de uno, los demás entre el C9 y el metilo terminal. Al igual que con los saturados, los ácidos grasos insaturados se conocen más por sus nombres comunes que por los que se derivan de la sistemática I.U.P.A.C., como puede verse en la tabla 2.

**Tabla 2.** Ácidos grasos insaturados más frecuentes en la naturaleza

C	Fórmula	Nombre IUPAC	Nombre Común	Pf (°C)
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis-9-hexadecenoico	Palmitoleico	-0,5
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis-9-octadecenoico	Oleico	-13,4
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis-9,12-octadecadienoico	Linoleico	-5
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	Linolénico	-11
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-icosatetraenoico	Araquidónico	-49,5

Es frecuente referirse a los ácidos grasos utilizando abreviaturas en las que se indican el número de átomos de carbono que poseen, así como el de dobles enlaces y la posición de los mismos. Como en la mayoría de los ácidos grasos insaturados naturales los dobles enlaces presentan configuración *cis*, no suele ser necesario especificarlo. Para esta nomenclatura abreviada suelen emplearse dos procedimientos:

A) Se indica el número de átomos de carbono, separado por dos puntos (:) del número de enlaces dobles, expresando a continuación, mediante un exponente o bien entre paréntesis, la posición de los dobles enlaces mediante números separados por comas (,), empezando a contar los carbonos por el grupo carboxílico.

B) De forma similar al procedimiento anterior, pero indicando la posición del primer doble enlace, numerando los átomos de carbono a partir del grupo metilo terminal, mediante un número separado de los anteriores por la letra griega  $\omega$ . Algunos ejemplos de esta forma de representar los ácidos grasos pueden encontrarse en la tabla 3.

Dado que en los ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces, éstos no se hallan nunca conjugados, sino que se encuentran separados por un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), no es preciso indicar la posición de todos ellos, pues basta con hacerlo del primer doble enlace, con lo que

queda perfectamente descrita la estructura del ácido graso.

**Tabla 3.** Símbolos de algunos ácidos grasos.

C	Nombre común	Enlaces dobles	Símbolo	
16	A. Palmítico	0	16:0	
18	A. Estearico	0	18:0	18:1 $\omega$ 9
18	A. Oleico	1	18:1(9)	18:1 $\omega$ 6
18	A. linoleico	2	18:2(9,12)	18:2 $\omega$ 6
18	A. Linolenico	3	18:3(9,12,15)	18:3 $\omega$ 3
20	A. Araquidónico	4	20:4(5,8,11,14)	20:4 $\omega$ 6

Los dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos insaturados que existen en la naturaleza, poseen configuración geométrica *cis*, lo que produce rigidez a la cadena alifática. Con todo se conocen algunos ejemplos con configuración *trans*. Los ácidos grasos con varios dobles enlaces, por ejemplo el ácido araquidónico, tiene sus moléculas retorcidas y presentan rigidez estructural, al contrario de lo que les ocurre a los ácidos grasos saturados que son lineales y más flexibles.



### 3.- PROPIEDADES DE LOS ÁCIDOS GRASOS

#### 3.1.- Solubilidad en agua

Todos los ácidos grasos son poco solubles en agua tabla 4 , pero en disoluciones diluidas de NaOH o de KOH se dispersan originando micelas al formarse las respectivas sales sódicas o potásicas del correspondiente ácido graso mediante la reacción llamada de saponificación y dando lugar a la formación de jabones.

Tabla 4.- Solubilidades de los ácidos grasos.

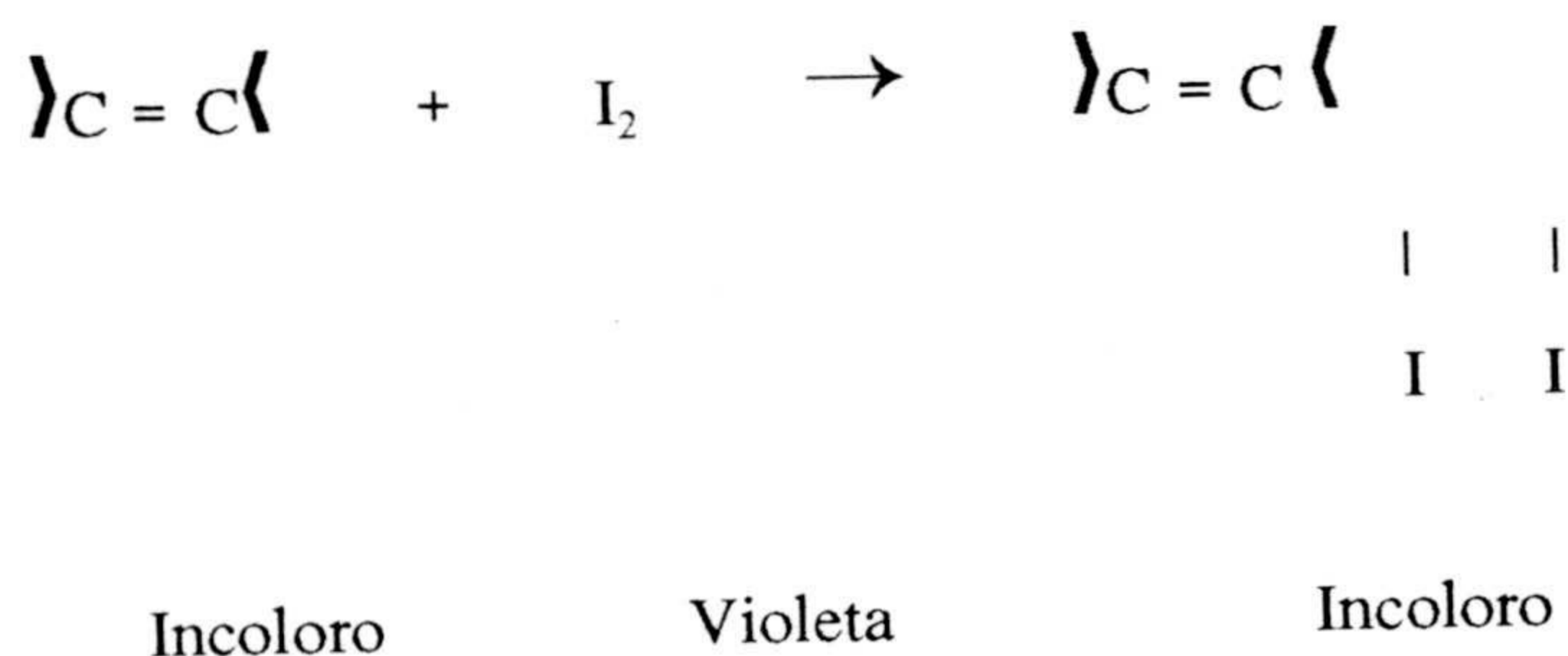
ÁCIDOS GRASOS	Solubilidad g.L <sup>-1</sup>	
	Ácido libre	Sal sódica
Ácido caprílico	0.68	
Ácido cáprico	0.15	
Ácido láurico	0.055	12
Ácido mirístico	0.02	
Ácido palmítico	.0072	
Ácido esteárico	0.0029	
Ácido oléico		
Ácido aráquico		
Ácido behénico		



Los jabones naturales suelen ser mezclas de las sales sódicas o potásicas de los ácidos palmítico, esteárico y oleico. Tienen la propiedad de emulsionar los compuestos grasos, que son insolubles en agua, introduciendo en la gota de grasa su cola hidrófoba (resto hidrocarbonado), mientras que orientan hacia el agua su cabeza hidrofílica (grupo carboxílico).

### 3.2.- Adición de iodo

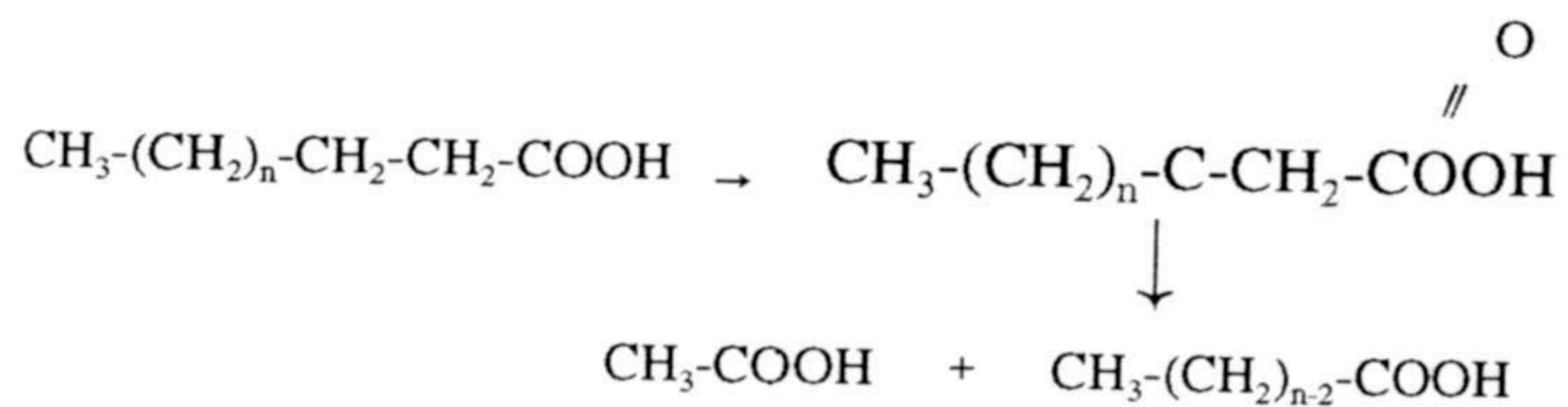
La parte hidrocarbonada de los ácidos grasos saturados es químicamente inerte, mientras que la de los ácidos grasos insaturados es más reactiva. Así, por ejemplo, pueden adicionar halógenos a los dobles enlaces con facilidad. Esta propiedad permite establecer un método analítico para determinar el número de enlaces dobles presentes en la muestra de ácidos grasos, por la adición de  $I_2$ , reacción que puede esquematizarse de la siguiente manera:



La decoloración de la disolución del iodo (violeta en  $\text{Cl}_4\text{C}$  o  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) tiene interés desde el punto de vista cualitativo, pero también con fines cuantitativos, pues si se conoce la concentración de la disolución de iodo, se puede conocer la concentración en ácido graso de la muestra, partiendo de un cantidad conocida de esta. El número de gramos de iodo que reaccionan con 100 gramos de grasa, se conoce como *índice de iodo*, e indica el grado de insaturación del compuesto.

### 3.3.- Oxidación de ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados al oxidarse sufren una degradación en la que eliminan fragmentos de dos átomos de carbono, comenzando por el extremo que contiene el grupo carboxílico. El proceso se inicia con la formación de un  $\beta$ -cetoácido y posteriormente se rompe la molécula formando ácido acético y un ácido graso con dos carbonos menos:



En los seres vivos la eliminación de los ácidos grasos saturados se realiza mediante pérdida de fragmentos de dos átomos de carbono en forma

---

de moléculas de acil-CoA que se incorporan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y los átomos de hidrógeno y sus electrones equivalentes lo hacen a la cadena respiratoria. En algunas enfermedades (diabetes mellitus) o en personas con largos periodos de ayuno, estos derivados están en relación con la formación de cuerpos cetónicos y la aparición de ellos en la sangre (cetonemia) o en la orina (cetonuria).

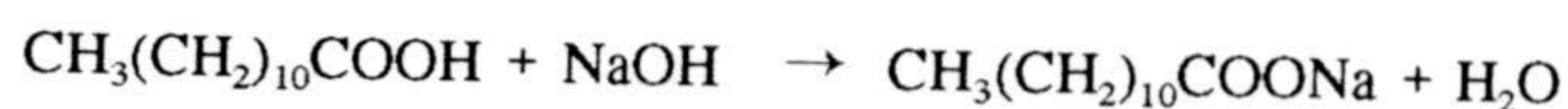
### **3.4.- Oxidación de ácidos grasos insaturados**

Los ácidos grasos con dos o más enlaces dobles se oxidan fácilmente al aire, atacando el oxígeno del mismo al enlace doble, originando compuestos fácilmente polimerizables y endureciéndose. Es un proceso que suele denominarse autooxidación. Es probable que algunas enfermedades de tipo cancerígeno tengan su origen en procesos de este tipo sobre los lípidos.

### **3.5.- Saponificación**

La reacción entre los ácidos grasos superiores y una base de un metal alcalino conduce a la formación de las correspondientes sales, que se conocen con el nombre de jabones. Las más utilizadas son las de sodio, pero también se utilizan las de potasio, que son más blandas y más solubles, sobre todo para la fabricación de cremas de afeitar y jabones líquidos.

Generalmente, las grasas naturales o endurecidas se saponifican con disolución de sosa cáustica, empleando un ligero exceso sobre la cantidad estequiométrica:



En la industria de fabricación de jabones, esta saponificación se lleva a cabo manteniendo una adecuada calefacción y agitación permanente. Terminada la reacción, que se lleva a cabo con rapidez si existe en todo momento un exceso de álcali, se agrega sal común (NaCl), con lo que precipita el jabón.

Esta reacción de saponificación tiene también interés analítico para iniciar un estudio de la composición de mezclas de ácidos grasos, con una especial aplicación en los estudios de adulteración de aceites comestibles. Así, se puede hablar del índice o número de saponificación (mg de KOH requeridos para la neutralización de los ácidos grasos y la saponificación de ésteres presentes en un gramo de muestra) y del índice de acidez (mg de KOH requeridos para la neutralización de los ácidos grasos libres presentes en un gramo de muestra).

### 3.6.- *Detergencia*

Una característica importante de las sales alcalinas de los ácidos grasos se conoce con el nombre de *detergencia* y consiste en la disminución de la tensión superficial del agua pura, cuyo valor es de unas 73 dinas/cm<sup>2</sup> a valores próximos a las 30 dinas/cm<sup>2</sup> en presencia de sales sódicas de oleato, palmitato, laurato, etc.

La descripción de una detergencia satisfactoria aparece por primera vez en la bibliografía en los lauratos y miristatos que suelen emplearse en jabones utilizables con agua de mar, pues son más solubles en disoluciones salinas que otros jabones superiores. Los jabones derivados de ácidos grasos con más de 22 átomos de carbono no sirven como detergentes pues son prácticamente insolubles en agua a la temperatura ambiente.

## 4.- COMPUESTOS SINTÉTICOS CON ACTIVIDAD SUPERFICIAL.

El jabón ha sido el detergente más utilizado durante muchos años, pero tiene unas limitaciones muy definidas: es inestable en disoluciones ácidas y muchas de sus sales son poco solubles en agua, lo que origina que, al usar jabones en aguas duras con contenidos notables en calcio, magnesio u otros iones metálicos, aparezcan jabones insolubles por reacciones de doble descomposición. Otra razón que no aconseja el uso de jabones fabricados a

partir de ácidos grasos de origen animal o vegetal es la dificultad de disponer, a un precio económico, de grasas de esos orígenes, pues la mayoría de ellas se suelen utilizar para consumo en alimentación humana.

El inconveniente de la falta de solubilidad por causa de los iones  $\text{Ca(II)}$  y  $\text{Mg(II)}$  presentes en las aguas naturales, se resolvió adicionando a la preparación detergente diferentes proporciones de fostatos que permiten la solubilización de los metales presentes en tales aguas, pero entonces surgió el problema de la presencia de estos fostatos en ríos y lagos.

A partir de 1918 se comenzaron a estudiar una serie de compuestos químicos que eliminasen ese inconveniente de la solubilidad de los jabones en aguas duras o con altos contenidos en iones metálicos. Tras las adecuadas investigaciones, surgieron las llamadas "formulaciones detergentes" que han ido incorporando diferentes compuestos según las necesidades de los usuarios. Hoy en día una formulación detergente contiene muchos componentes, como puede verse en la tabla 4, en la que se pone de manifiesto la complejidad que puede tener una formulación detergente, lo cual redundaría en la dificultad del análisis, pues además sus constituyentes están en función del uso que se desea dar a la citada formulación. A pesar de ello, algunos componentes son comunes, aunque los demás están protegidos por patentes de los fabricantes.

**Tabla 4.** Componentes de una formulación detergente.

TENSIOACTIVOS	* Aniónicos	+ Jabón + Alquil - aril sulfonatos + Sulfatos de alcoholes de cadena larga + monoglicéridos sulfatados + No iónicos sulfatados + sulfosuccinatos + alcansulfonatos
	* Catiónicos	+Sales de amonio cuaternario
	* No iónicos	+ Condensados de alcoholes de cadena larga + Condensados de ácidos grasos y óxido de etileno + Condensados de aminas primarias y óxido de etileno + Condensados de amidas y óxido de etileno + Condensados de alquilolamidas y ácidos grasos + Óxidos amino - grasos
	* Anfóteros	+ Actúan según el medio
COADYUVANTES REFORZADORES Y ADITIVOS	* Fosfatos (tripolifostato) * Complejantes orgánicos * Silicatos * Agentes antirredeposición (CMC-Na) * Blanqueantes químicos * Blanqueantes fluorescentes (CC/DAS) * Enzimas * Antimicrobianos	
	* Otros aditivos	+ Sales alcalinas + Modificadores de espuma + Hidrótopos + Sobreengrasantes + Abrasivos + Azúcares + Glicerina + Disolventes, etc

Los agentes detergentes, al igual que los jabones tienen en sus moléculas grupos hidrófilos y grupos hidrófobos, conjunto que origina su detergencia.

Los surfactantes suelen clasificarse de acuerdo con la carga que origina en disolución su grupo funcional principal, así nos podemos encontrar con los siguientes grupos:

**4.1.-Surfactantes aniónicos.-** Se trata de sales alcalinas de ácidos orgánicos que poseen uno o varios grupos funcionales que se disocian en disolución acuosa para formar iones cargados negativamente. Entre los más utilizados en la actualidad, están los de origen petrolífero: alquilsulfatos, alquilsulfonatos y alquilarilsulfonatos, todos ellos de cadena lineal o ramificada.

Por otro lado están los jabones, formados por ácidos orgánicos lineales de una amplia gama, ya que van desde el ácido caprílico (C8), hasta el ácido behénico (C22), con posibilidad de varias insaturaciones en algunos de ellos. El origen de éstos es bien distinto a los derivados del petróleo, ya que provienen principalmente de tejidos animales y vegetales.

Este es el grupo de detergentes más utilizado en la actualidad.



**4.2.- Surfactantes catiónicos.-** Son sales de amonio cuaternario que poseen uno o varios grupos funcionales que se disocian en disolución acuosa para formar iones cargados positivamente. Estos productos se emplean poco y están reservados a aplicaciones especiales.

**4.3.- Surfactantes no iónicos.-** Son moléculas que contienen grupos hidroxilo hidrófilos y cadenas carbonadas lipófilas, pero no se ionizan en disolución.

**4.4.- Surfactantes anfóteros.-** Poseen uno o varios grupos funcionales y pueden ionizarse según las condiciones del medio, confiriendo al compuesto el carácter de surfactante aniónico o catiónico.

La síntesis de los detergentes suele llevarse a cabo haciendo reaccionar en las condiciones adecuadas una sustancia que aporta el grupo hidrófobo con otra que aporta el hidrófilo. La solubilidad del producto resultante depende de los grupos activos presentes, pero aún más de la relación entre las masas moleculares de los grupos hidrófobo e hidrófilo

## **5.- MERCADO ACTUAL DE LOS DETERGENTES.**

En las últimas cinco décadas la evolución de la fabricación de productos para la limpieza ha evolucionado mucho, pues mientras en 1940 los surfactantes sintéticos constituían solo el 1% de los empleados, en 1950 constituían ya el 50%, y en nuestros días representan más del 90%.

Refiriendonos sólo a los productos para la limpieza de ropa, se encuentran en el mercado muy diversos tipos de formulaciones detergentes. Suelen dividirse en polvos de acción intensa y en polvos o líquidos de acción delicada. Los primeros están destinados al lavado de artículos blancos fuertemente manchados y a la mayoría de los artículos coloreados. Por su parte los polvos y los líquidos de acción delicada están destinados al lavado de géneros de lana y a artículos con colores sensibles y a la ropa más delicada.

En la tabla 5 se muestran los intervalos de concentración en que suelen presentarse los componentes típicos de los polvos de acción intensa para el lavado de ropa

**Tabla 5.** Composición de los polvos de lavado de acción intensa

COMPONENTE	Concentración (%) formulaciones	
	baja espuma	abundante espuma
Alquilbecenosulfonatosódico	3-12	14-20
Jabón sódico	2-10 (*)	-----
Surfactivo no iónico	2-5	-----
Reforzador de espuma	----	2
Fosfatos sódicos	25-60	30-50
Perborato sódico	0-30	0-20
Silicato sódico	4-8	5-10
Sulfato sódico	4-18	10-15
Carboximetilcelulosa sódica	1-2	0.5-1.5
Agentes fluorescentes, perfumes, enzimas y agua.	hasta 100%	hasta 100%

## 6.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.

Son muy diversas las técnicas analíticas utilizadas para el estudio de los ácidos grasos. Las que citamos seguidamente no pretenden tener carácter exhaustivo. En la bibliografía puede encontrarse interesantes artículos que hacen referencia a este aspecto, debiendo citarse de una manera especial la *Encyclopedia of Analytical Sciences*, publicada por Academic Press el año 1995, que en su volumen 4 y en la página 2522, recoge un interesante capítulo sobre las técnicas más comunes en el análisis de ácidos grasos. Aquí recogemos algunos de los comentarios recogidos en la referida obra, así como otros más dispersos por la bibliografía.

### 6.1.- *Extracción*

La polaridad de los ácidos grasos depende esencialmente del número de átomos de carbono que poseen, de las insaturaciones presentes y de las cadenas laterales que pudieran presentar. Por ello los disolventes utilizables para su extracción dependen del ácido graso que se esté considerando.

Los métodos de extracción más utilizados con fines analíticos están basados en la partición líquido - líquido y en la cromatografía en columna con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). En la primera se utilizan como disolventes extractantes acetato de etilo, dietil éter, diclorometano o

mezclas cloroformo con metanol, acidificando la muestra a valores de pH comprendidos entre 3 y 4,5.

En los métodos de SPE la disolución de la muestra se realiza en una columna de octadecilsilano en modo de fase reversa con agua acidificada a pH entre 3 y 4.5. El cartucho se lava con agua para remover las sustancias con alta polaridad y los ácidos grasos se eluyen del cartucho con el disolvente más apropiado. Tras el proceso de extracción se aplica la técnica de determinación cuantitativa más adecuada según el caso.

## 6.2.- *Espectroscopía UV*

Los ácidos grasos saturados presentan un pico de absorción entre 204 y 207 nm debido a la presencia del grupo carboxílico.

Los ácidos grasos insaturados con enlaces dobles intensifican su absorción al crecer el número de insaturaciones y la conjugación de los mismos. Si la conjugación es tipo dieno su máximo de absorción aparece entre 235 y 243 nm y sus absortividades molares están comprendidas entre 28.000 y 30.000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los sistemas de trienos conjugados absorben entre 270 y 280 nm con unas absortividades molares del orden de 40.000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los sistemas tetraénicos absorben a 301 nm con una absortividad molar de del orden de 65.000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 6.3.- Espectroscopía VIS

Como se acaba de indicar los ácidos grasos presentan bandas de absorción en la zona del ultravioleta. Sin embargo en la bibliografía aparecen estudios de su comportamiento en presencia de grupos cromogénicos. Por ejemplo, MOTOMIZU, OSHIMA y KURODA<sup>1, 2</sup> realizan determinaciones espectro fotométricas de surfactantes aniónicos, empleando diferentes agentes cromogénicos para formar asociaciones iónicas y aplicando la técnica de FIA.

SHIMOISHI y MIYATA<sup>3</sup> determinan la concentración de surfactantes aniónicos en muestras de aguas de grifo y de río por la absorción que presenta su asociación iónica con bromuro de 1-(10-bromodecil)-4-(4-aminonaftilazo)-piridinio, sin necesidad de usar agentes extractantes. La absorptividad molar de la asociación iónica es de  $5.3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 595 nm de longitud de onda.

### 6.4.- Espectroscopía IR

De entre las diferentes bandas que aparecen en el espectro infrarrojo

---

<sup>1</sup> MOTOMIZU, S., OSHIMA, M. y KURODA, T., *Analyst*, **113**, 747 (1988)

<sup>2</sup> MOTOMIZU, S., HAZAKI, Y., OSHIMA, M. y TÔEI, K., *Anal Sci.*, **3**, 265 (1987)

<sup>3</sup> SHIMOISHI, Y. y MIYATA, H., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **338**, 46 (1990)

de los ácidos grasos se pueden destacar las que aparecen en la tabla 6 como las más características de los mismos.

**Tabla 6.** Algunas bandas del espectro IR de los ácidos grasos.

Asignación	cm <sup>-1</sup>
C=O stretching	1720 - 1690
C-H stretching	2960 - 2850
OH stretching, C - H bending	1375 - 1465
C - O - H bending en el plano	1408
O -H fuera del plano	920
C = C no conjugado	1660 - 1640
C≡C no conjugado	2100
C = C conjugado	~ 1600

### **6.5.- Espectroscopía de RMN**

Las señales más características que los ácidos grasos presentan en RMN de protón se recogen en la tabla 7.

Tabla 7.- RMN H de ácidos grasos

Asignación	ppm
- CH <sub>3</sub> terminal	9.1
Cadenas de - CH <sub>2</sub> -	8.7
CH <sub>2</sub> contiguos a COOH	7.7
- CH = CH -	4.7
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=C-	7.2

### 6.6.- Fluorescencia

Aunque los ácidos grasos que dan lugar a la formación de surfactantes aniónicos no suelen presentar fluorescencia, se ha estudiado que la formación de pares iónicos con algunos colorantes tales como safranina - T <sup>4</sup> o rodamina B <sup>5</sup>, permiten la determinación fluorimétrica de tales surfactantes en aguas residuales urbanas.

Un estudio comparativo de los métodos fluorimétricos y espectro fotométricos para la determinación de tensioactivos aniónicos en aguas residuales se pueden encontrar en el artículo de POLO y colaboradores en

---

<sup>4</sup> RUBIO, S., RODRÍGUEZ, V., y POLO, L. M., *Anal. Chim. Acta*, **206**, 351 (1988)

<sup>5</sup> RUBIO, S., GÓMEZ, M., y POLO, L. M., *Microchem. J.*, **37**, 93 (1988)



el que aplican el método de ANOVA <sup>6</sup> para la comparación.

### 6.7 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es frecuentemente utilizada como detectora tras una técnica separativa y una derivatización para la formación de ésteres, generalmente, metílicos de los ácidos grasos. Por ejemplo en GC-MS de ácidos grasos aparecen diferentes fragmentos:  $R-C\equiv O^+$  (M-31),  $O^+\equiv C-O-CH_3$  ( $m/z$  59),  $R^+$  (M-59) y  $^+O-CH_3$  ( $m/z$  31) producidos a partir de la porción ester. Iones con  $m/z$  74, 87 o 101, generados por el reagrupamiento McLafferty en ácidos grasos saturados, aparecen en ácidos grasos insaturados. Otras técnicas de formación de iones moleculares también se utilizan en el estudio de ácidos grasos .

Un ejemplo de la utilización de la espectrometría de masas para la identificación de agentes surfactantes en aguas mediante bombardeo con átomos lentos (FAB), previa separación de los componentes mediante HPLC, puede encontrarse en los artículos de VENTURA y otros <sup>7</sup> y de RIVERA

---

<sup>6</sup> RUBIO, S., POLO, L. M., RODRÍGUEZ, V., y, GÓMEZ, M., *An. Quim.*, **84**, B, 361 (1988)

<sup>7</sup> VENTURA, f., CAIXACH, J., FIGUERAS, A., FRAISE, D. y RIVERA, J., *Wat. Res.* (1989)

y colaboradores <sup>8</sup>, que lo aplicaron al estudio de las aguas potables de la ciudad de Barcelona.

En esta memoria, se hace referencia a los ácidos grasos C8 a C22, que en el estudio realizado mediante GC-MS hemos encontrado los espectros que se recogen en las gráficas siguientes, ordenados de manera que aparecen en la misma página el ácido y su correspondiente derivado metílico.

---

<sup>8</sup> RIVERA, J., FRAISE, D., VENTURA, F., CAIXACH, J., y FIGUERAS, A., *Z. Analyt. Chem.*, **328**, 577 (1987)

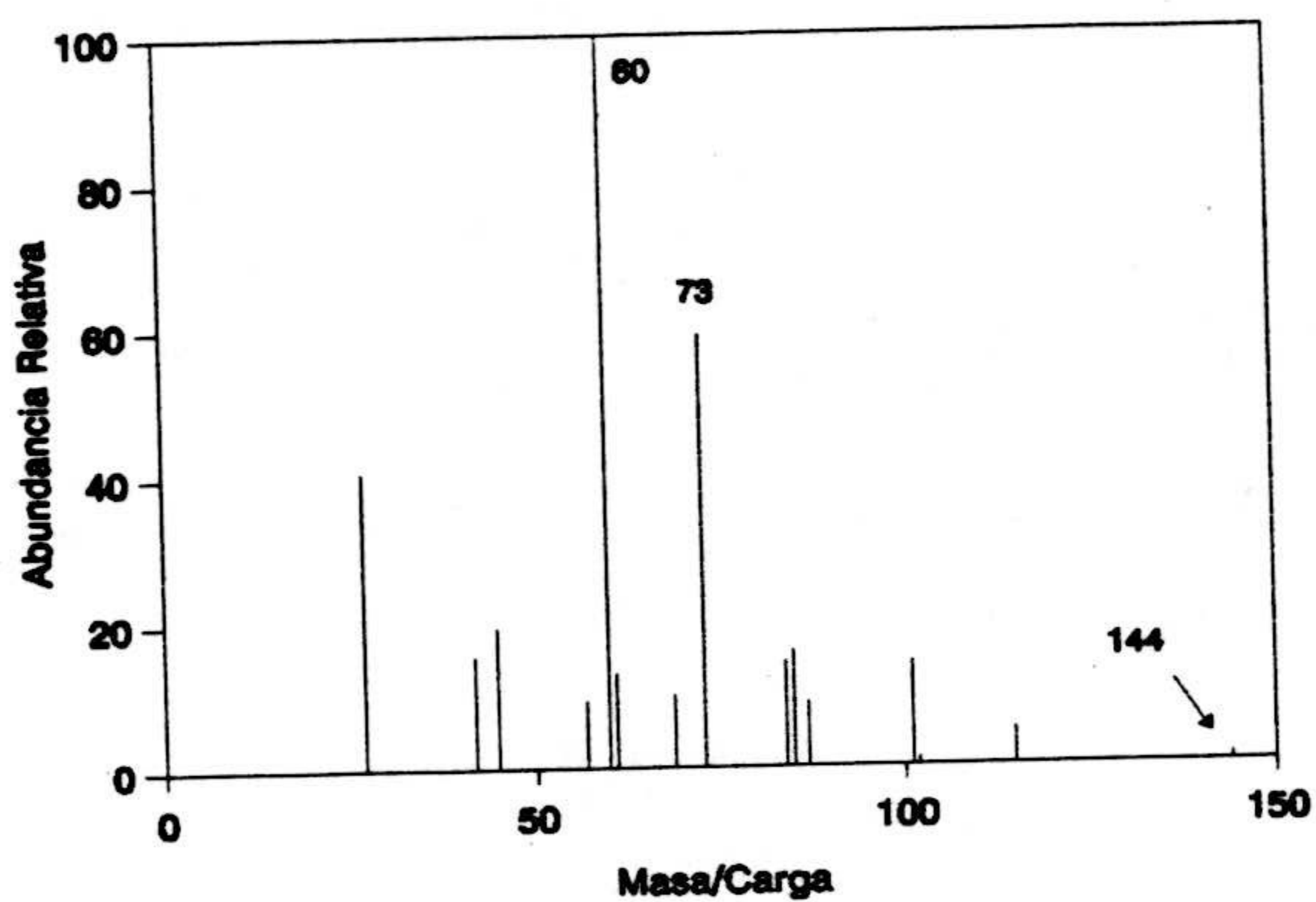


Figura 1.- Espectro de masas del ácido caprílico  $C_8$ .

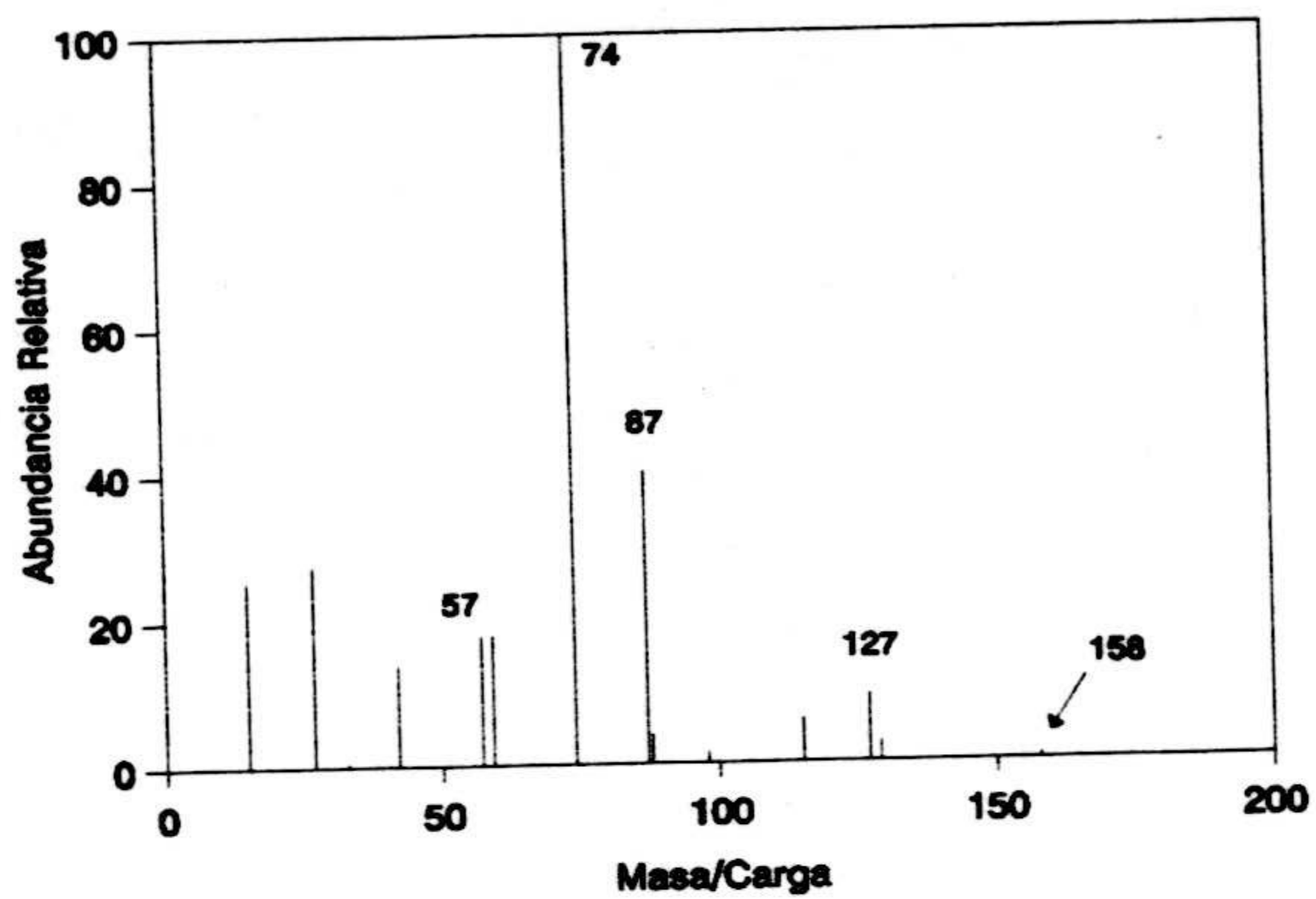


Figura 2.- Espectro de masas del caprilato de metilo  $C_8$ .

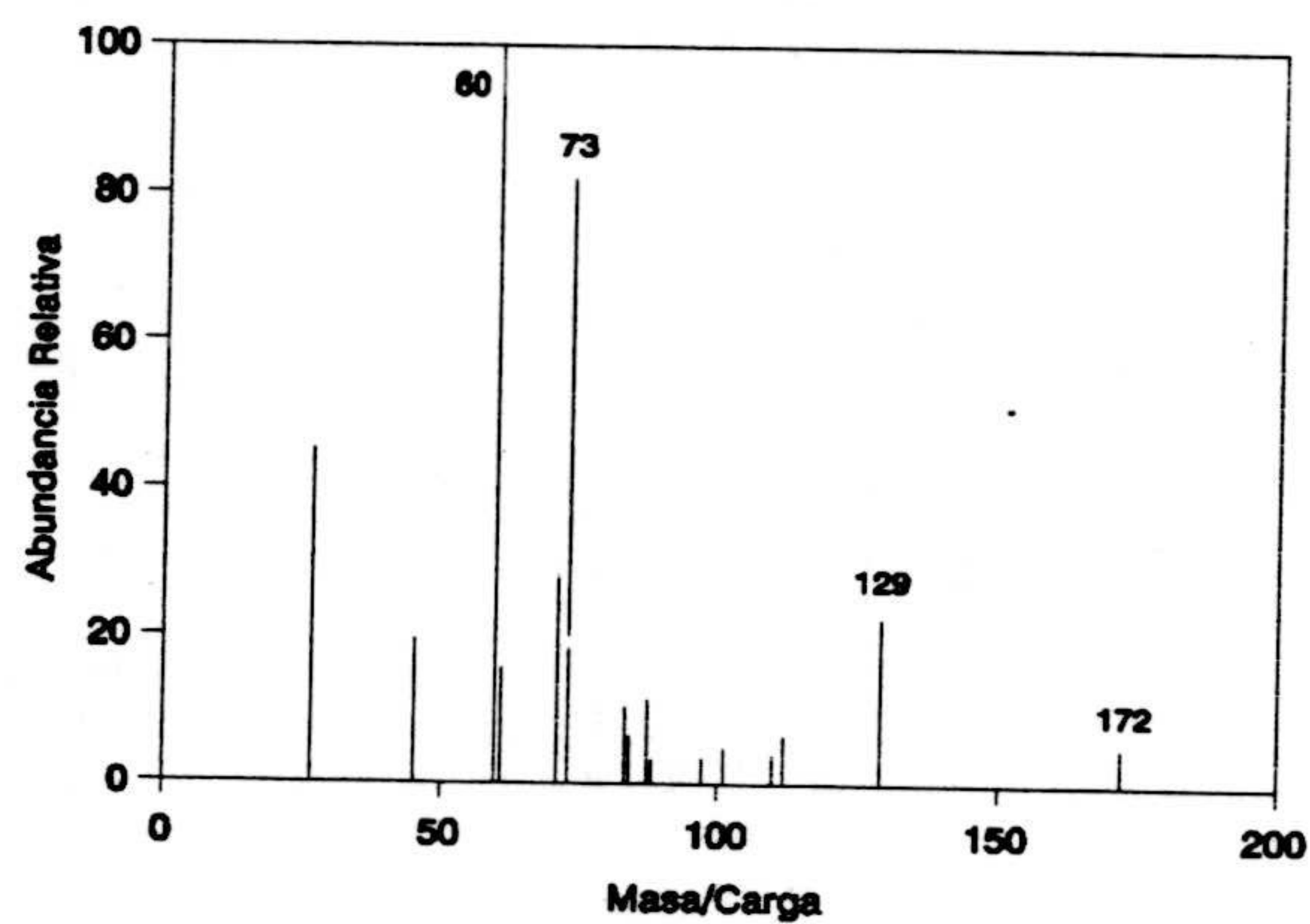


Figura 3.- Espectro de masas del ácido cáprico  $C_{10}$ .

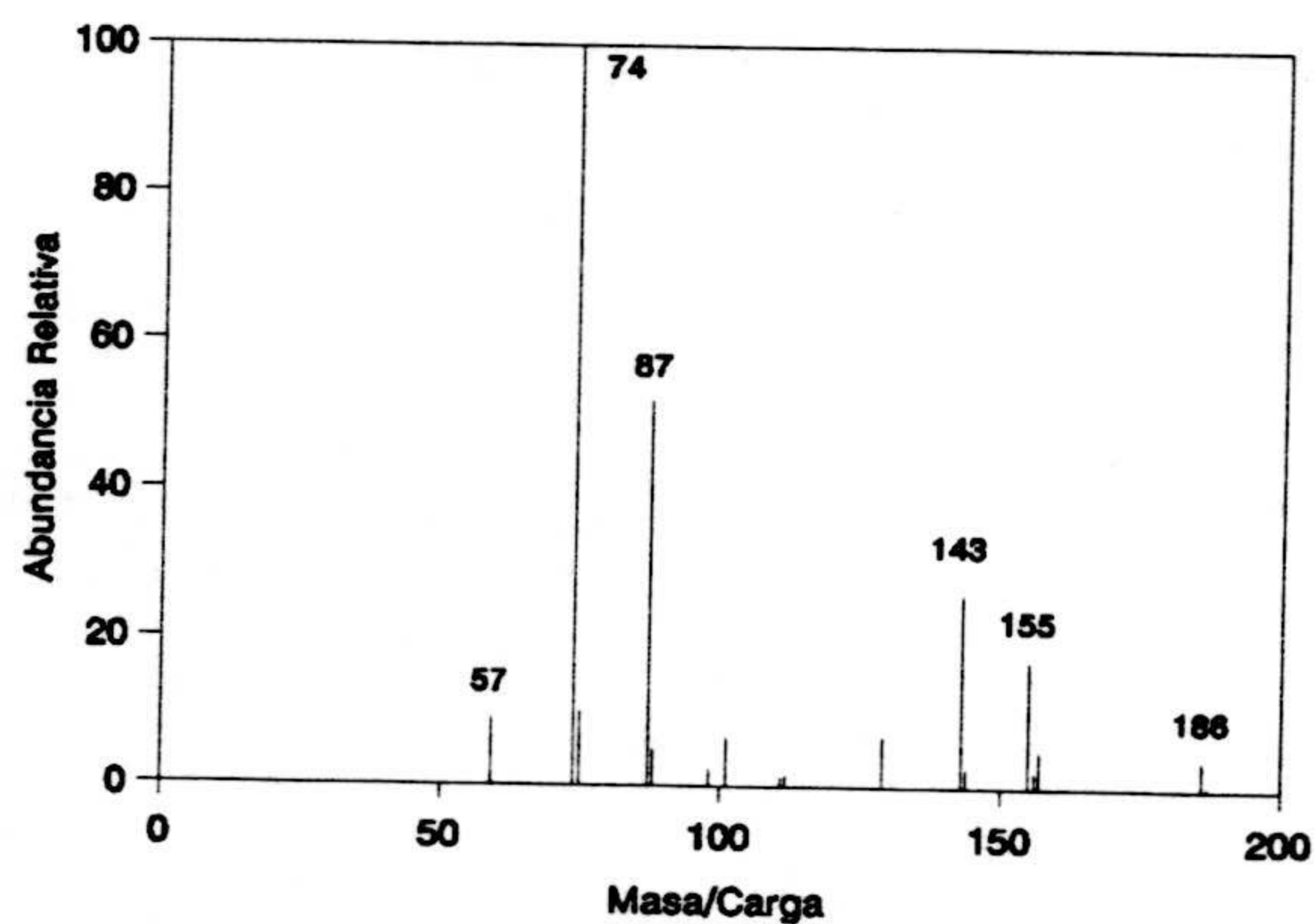


Figura 4.- Espectro de masas del caprato de metilo  $C_{10}$ .

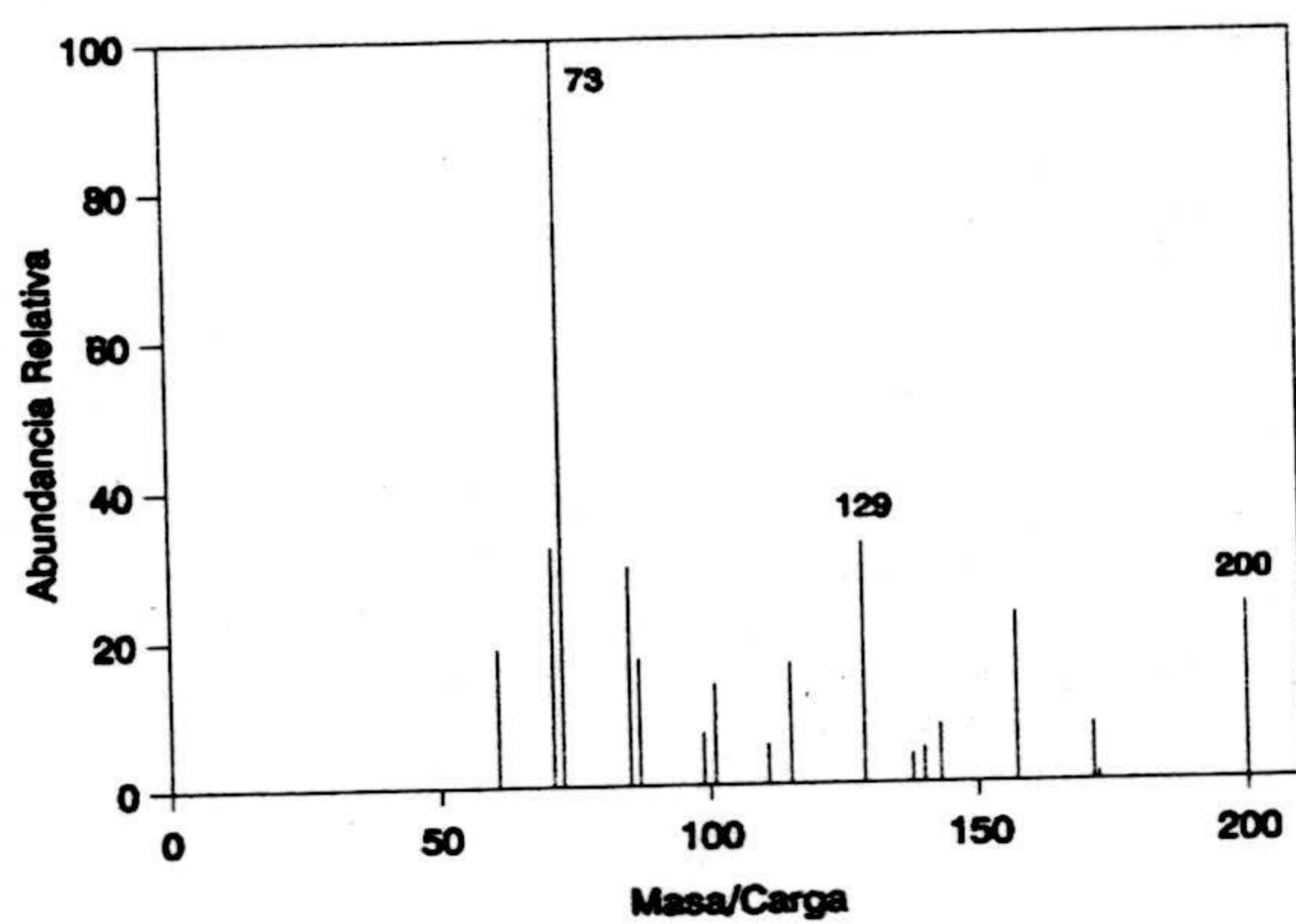


Figura 5.- Espectro de masas del ácido láurico  $C_{12}$ .

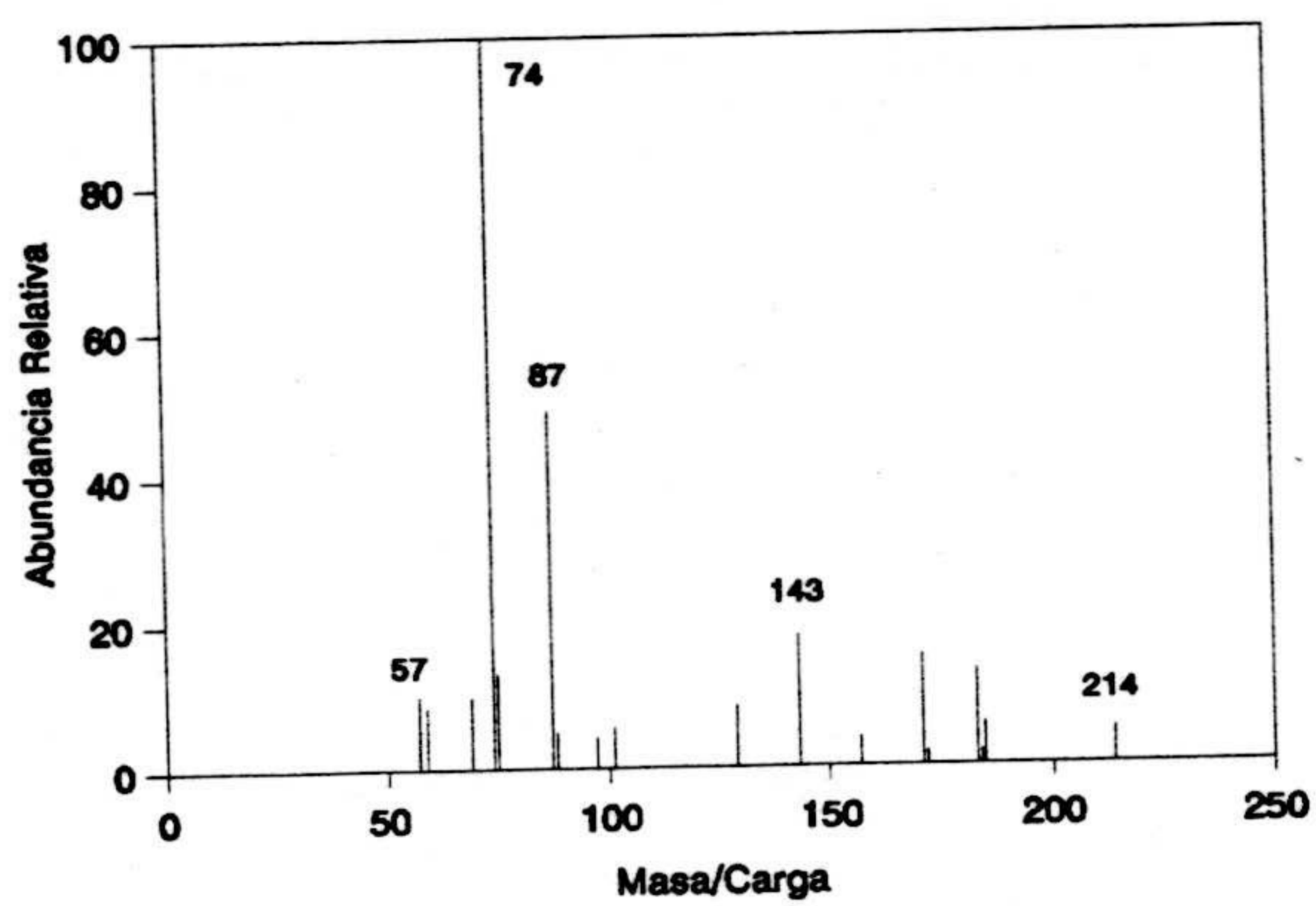


Figura 6.- Espectro de masas del laurato de metilo  $C_{12}$ .

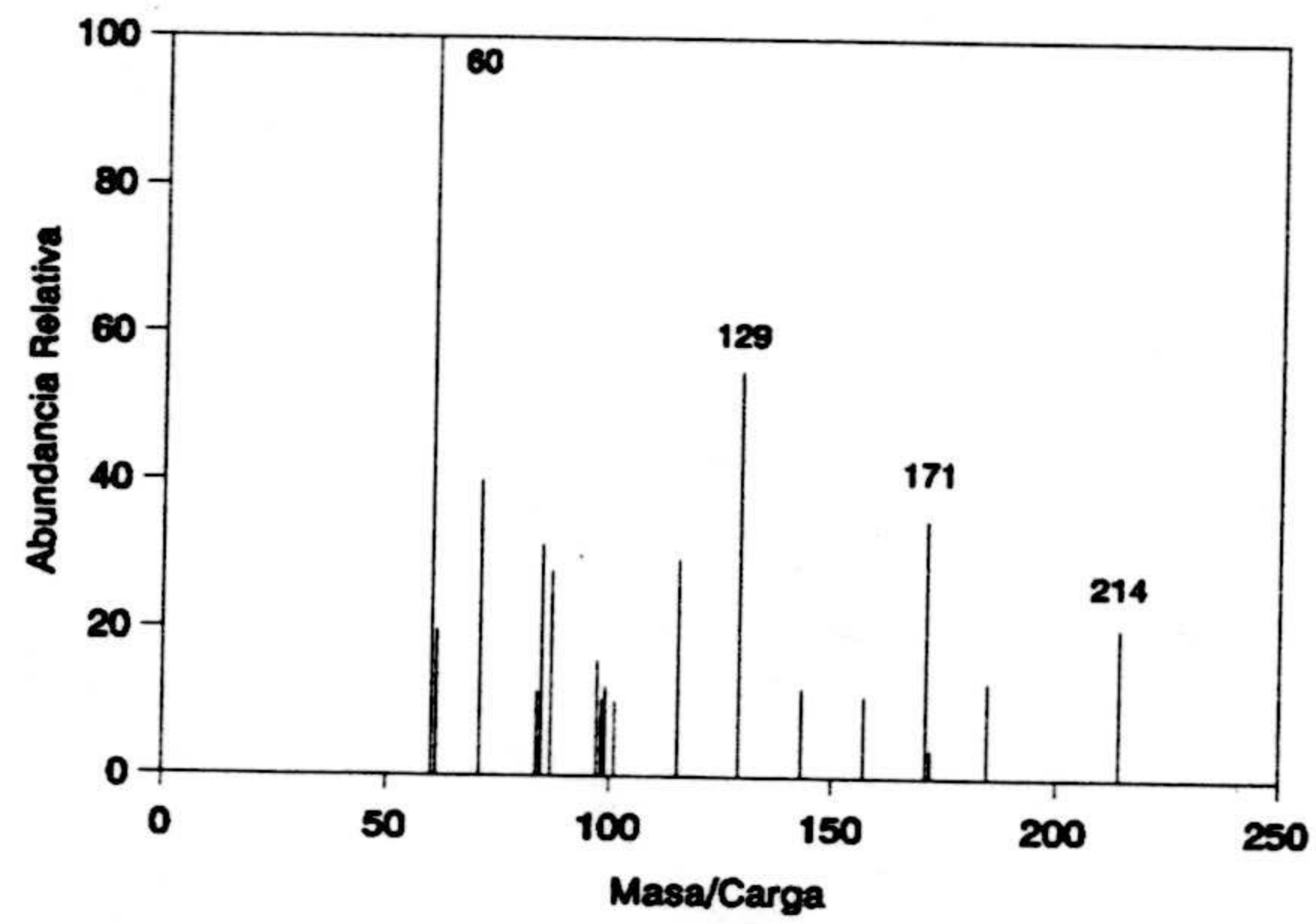


Figura 7.- Espectro de masas del ácido tridecanóico  $C_{13}$ .

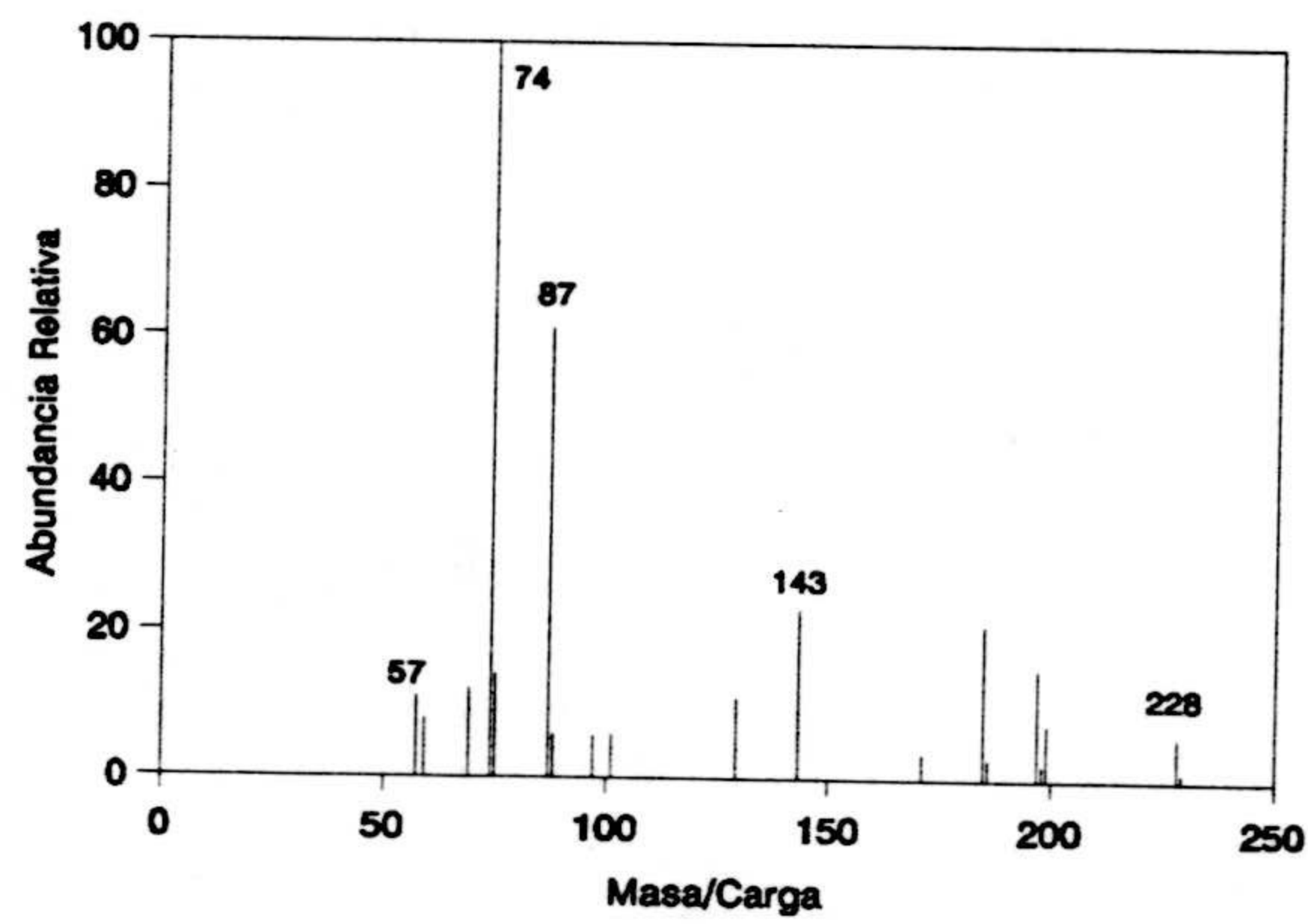


Figura 8.- Espectro de masas del tridecanoato de metilo  $C_{13}$ .

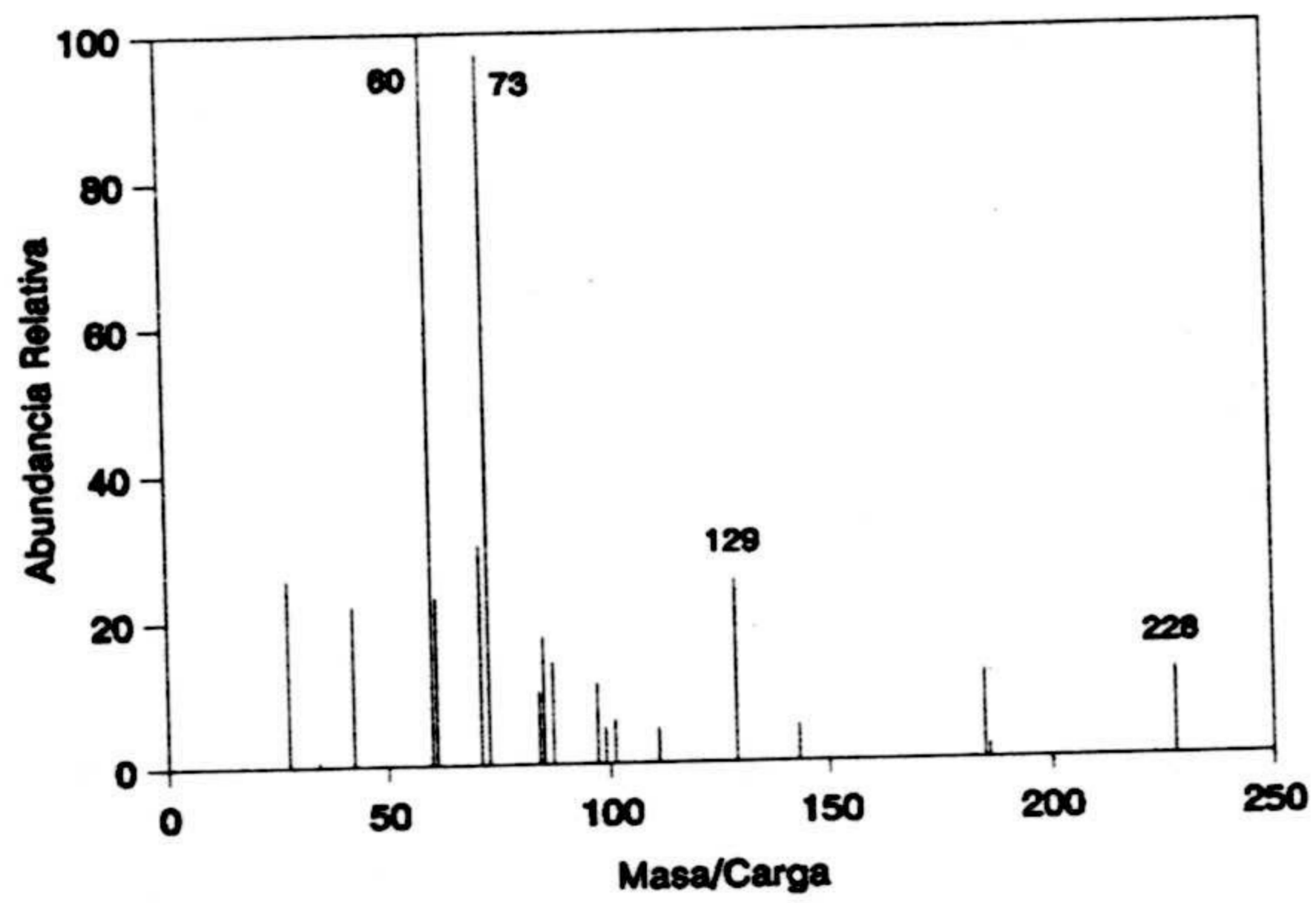


Figura 9.- Espectro de masas del ácido mirístico  $C_{14}$ .

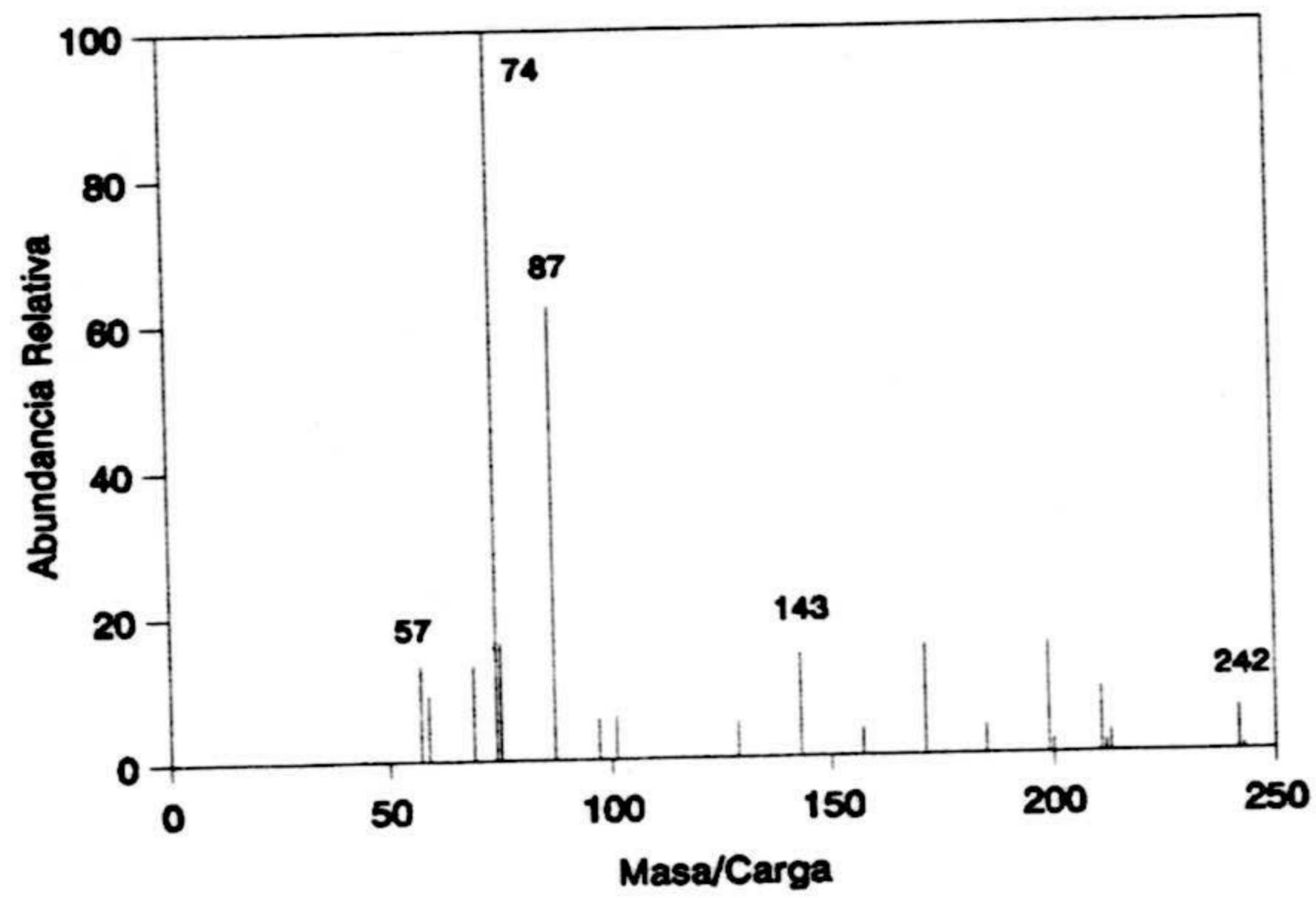


Figura 10.- Espectro de masas del miristato de metilo  $C_{14}$ .

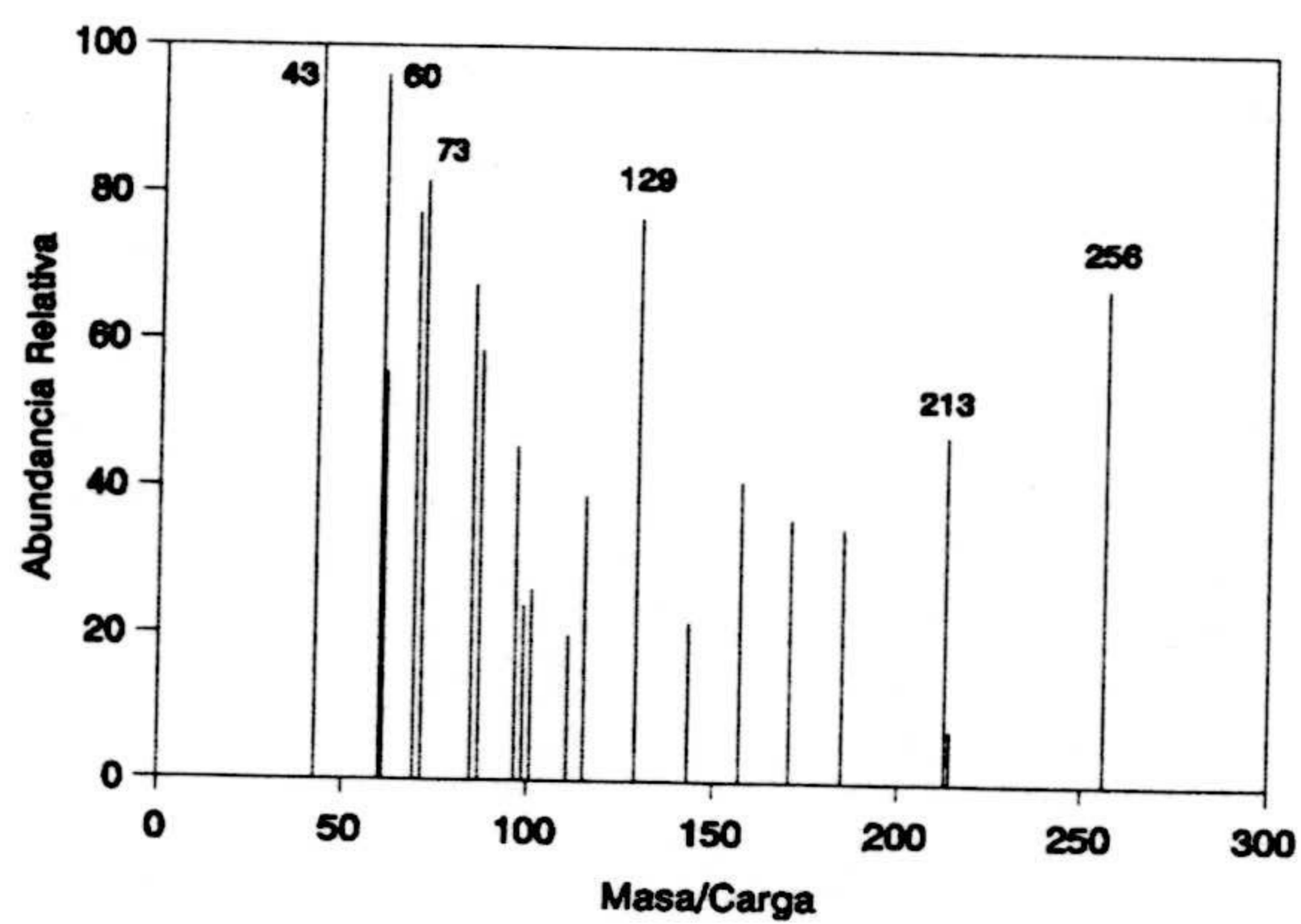


Figura 11.- Espectro de masas del ácido palmítico.

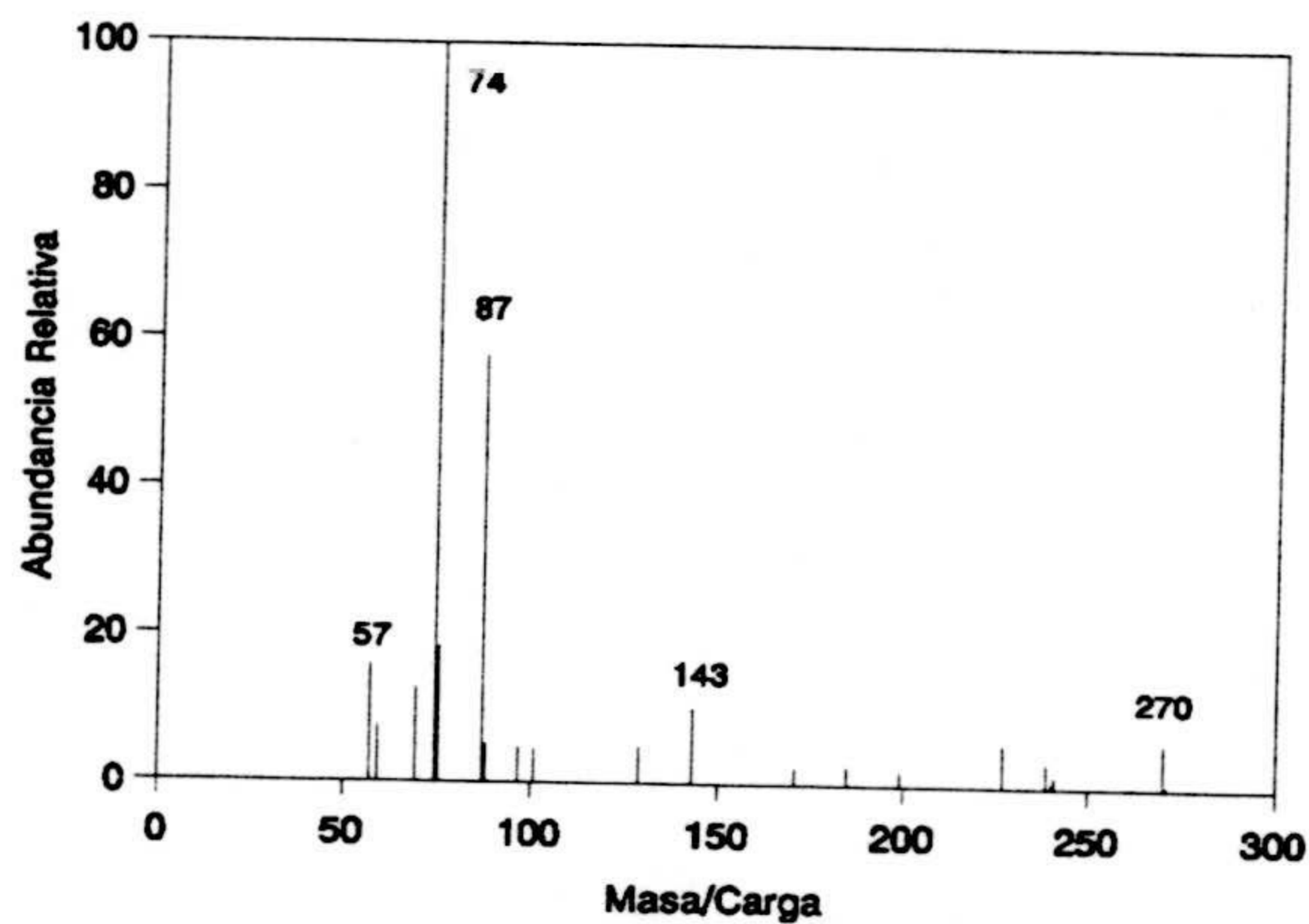


Figura 12.- Espectro de masas del palmitato de metilo.



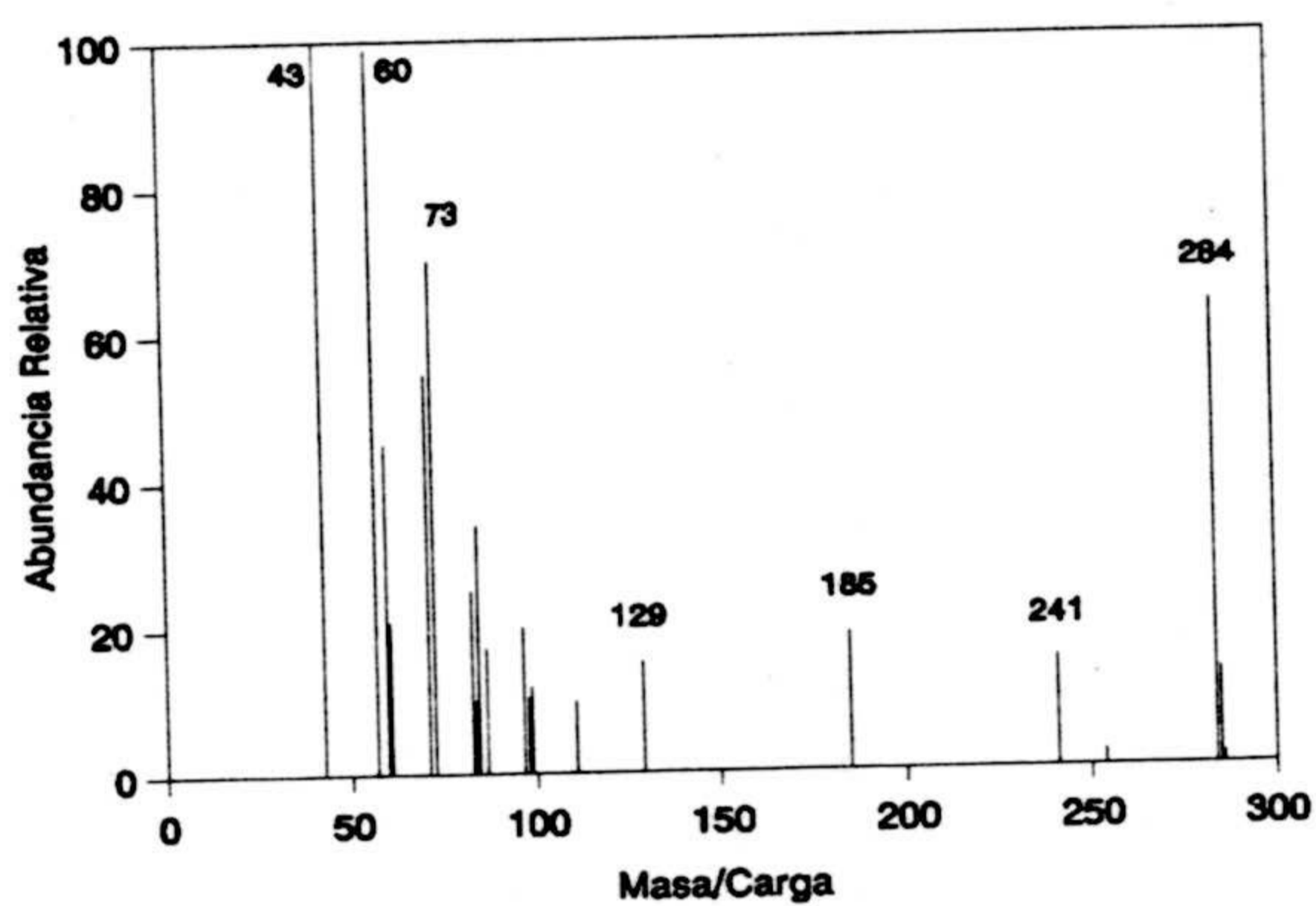


Figura 13.- Espectro de masas del ácido esteárico.

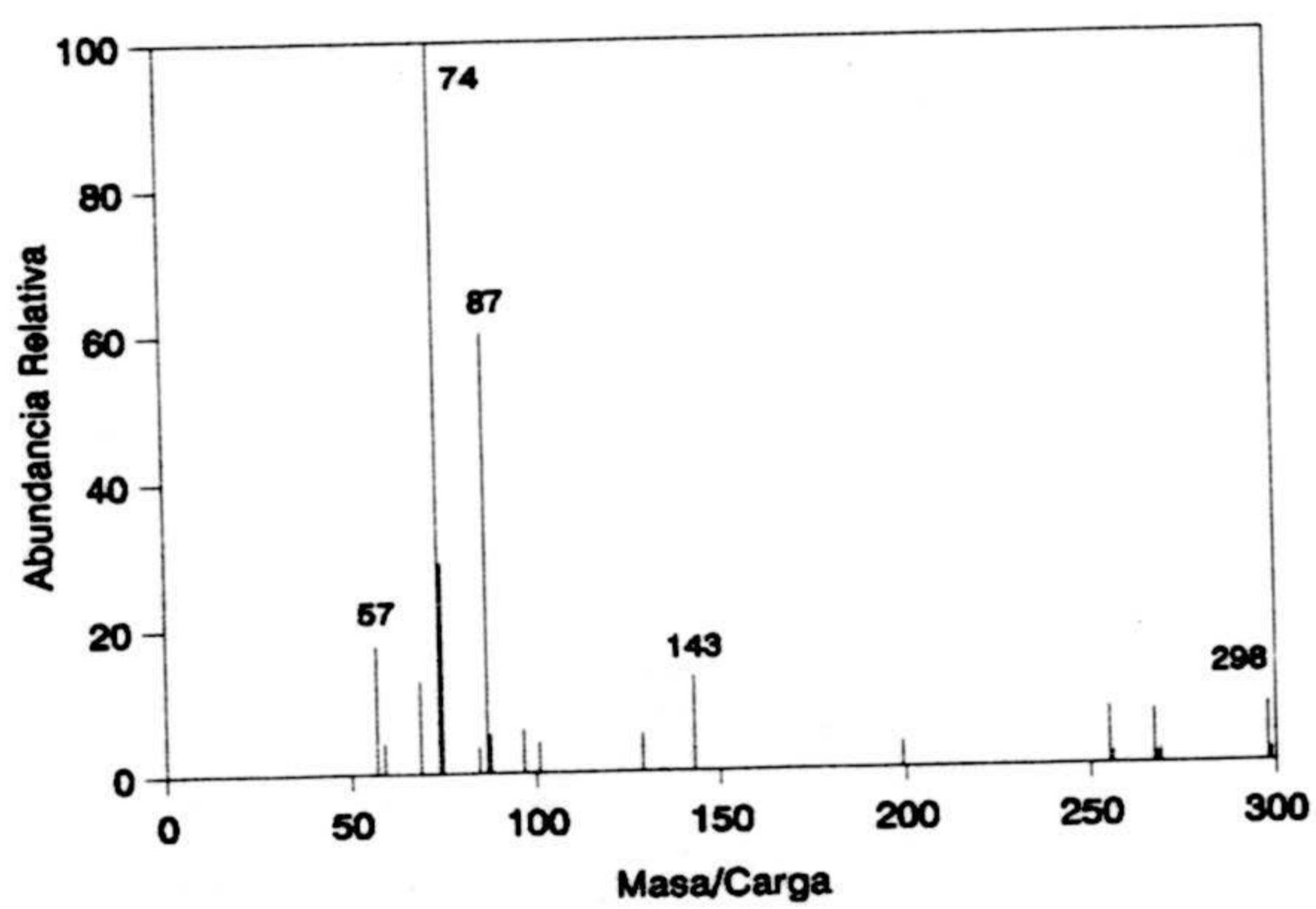


Figura 14.- Espectro de masas del estearato de metilo.

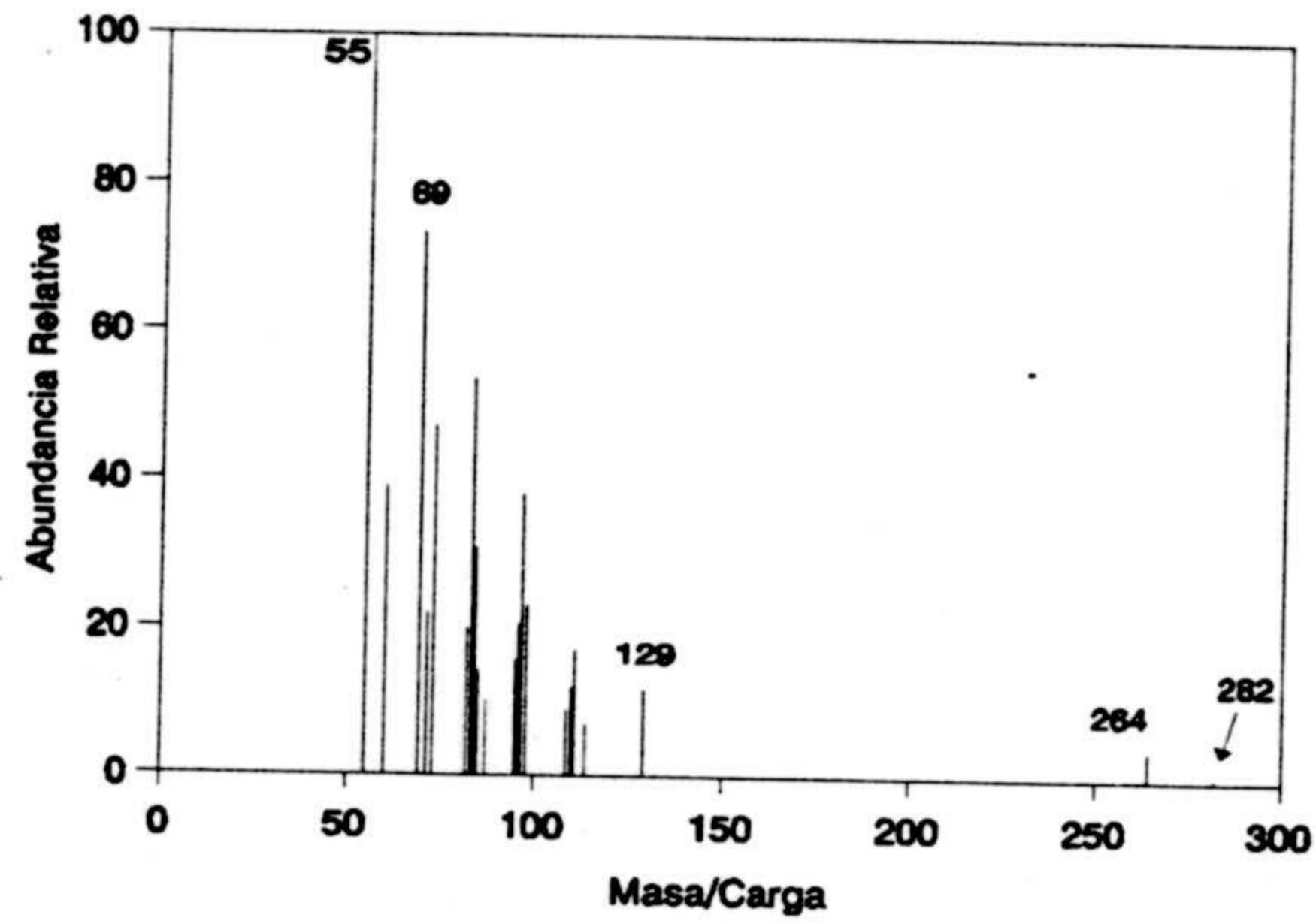


Figura 15.- Espectro de masas del ácido oléico.

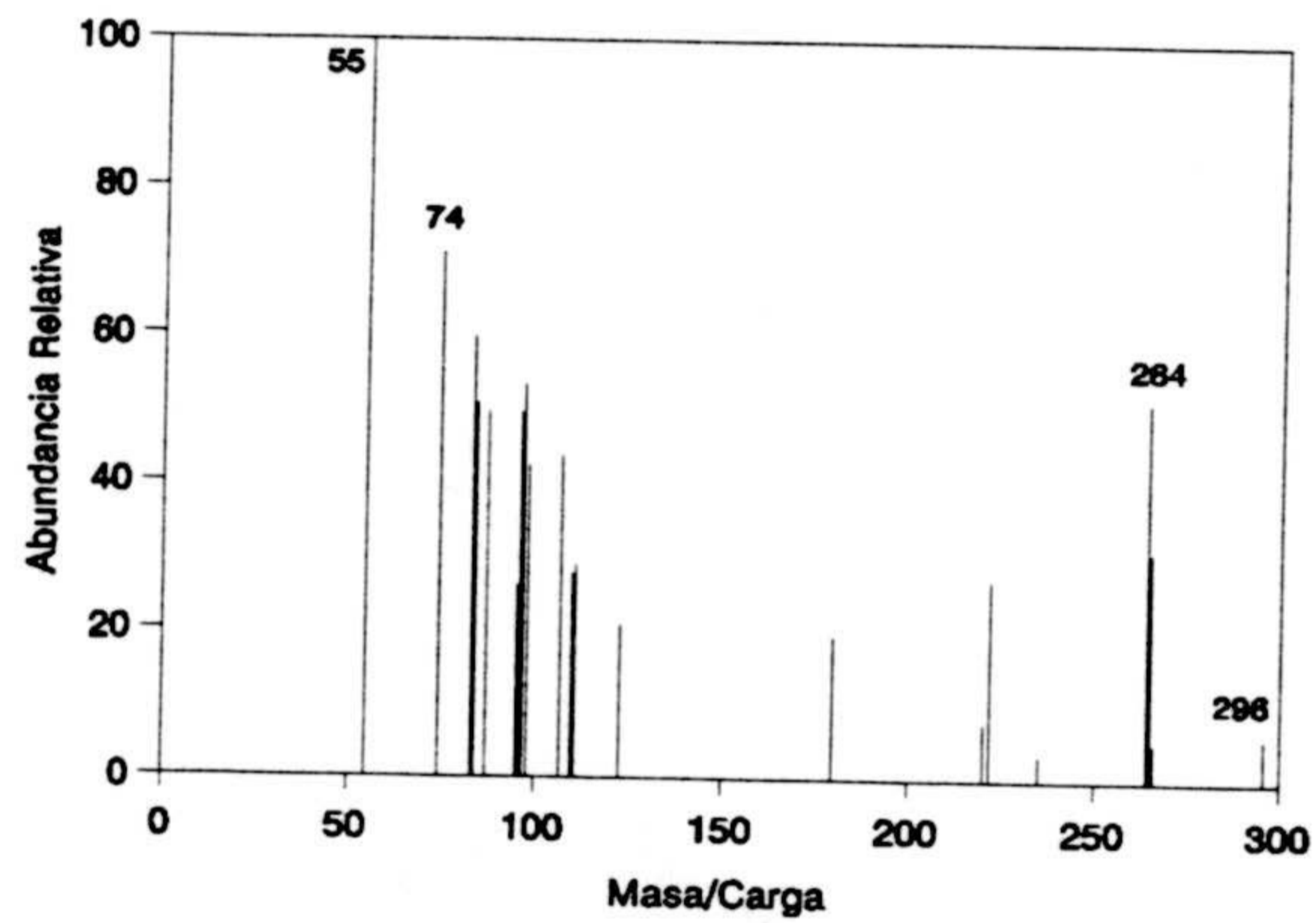


Figura 16.- Espectro de masas del oleato de metilo.

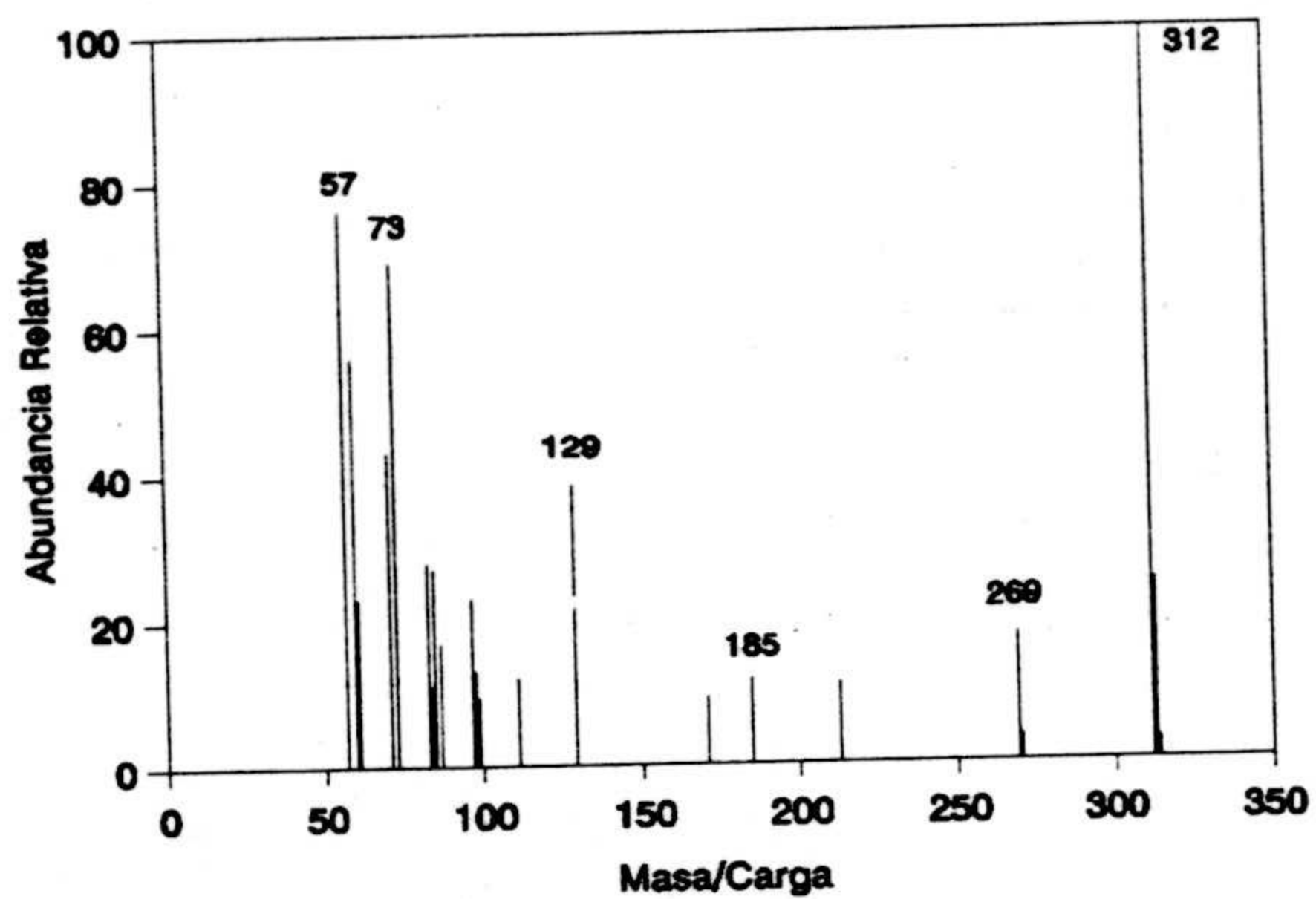


Figura 17.- Espectro de masas del ácido aráquico..

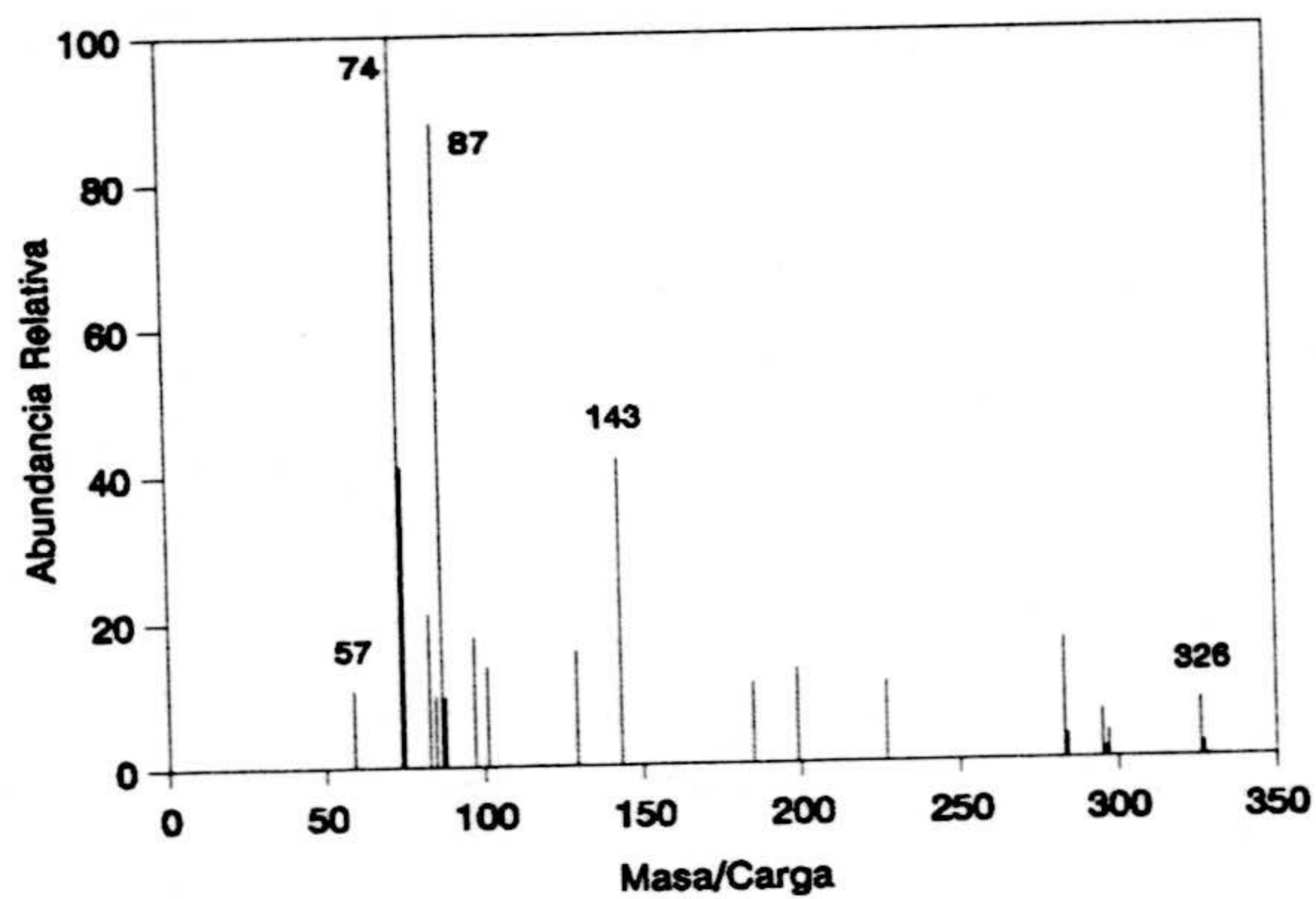


Figura 18.- Espectro de masas del aracato de metilo.

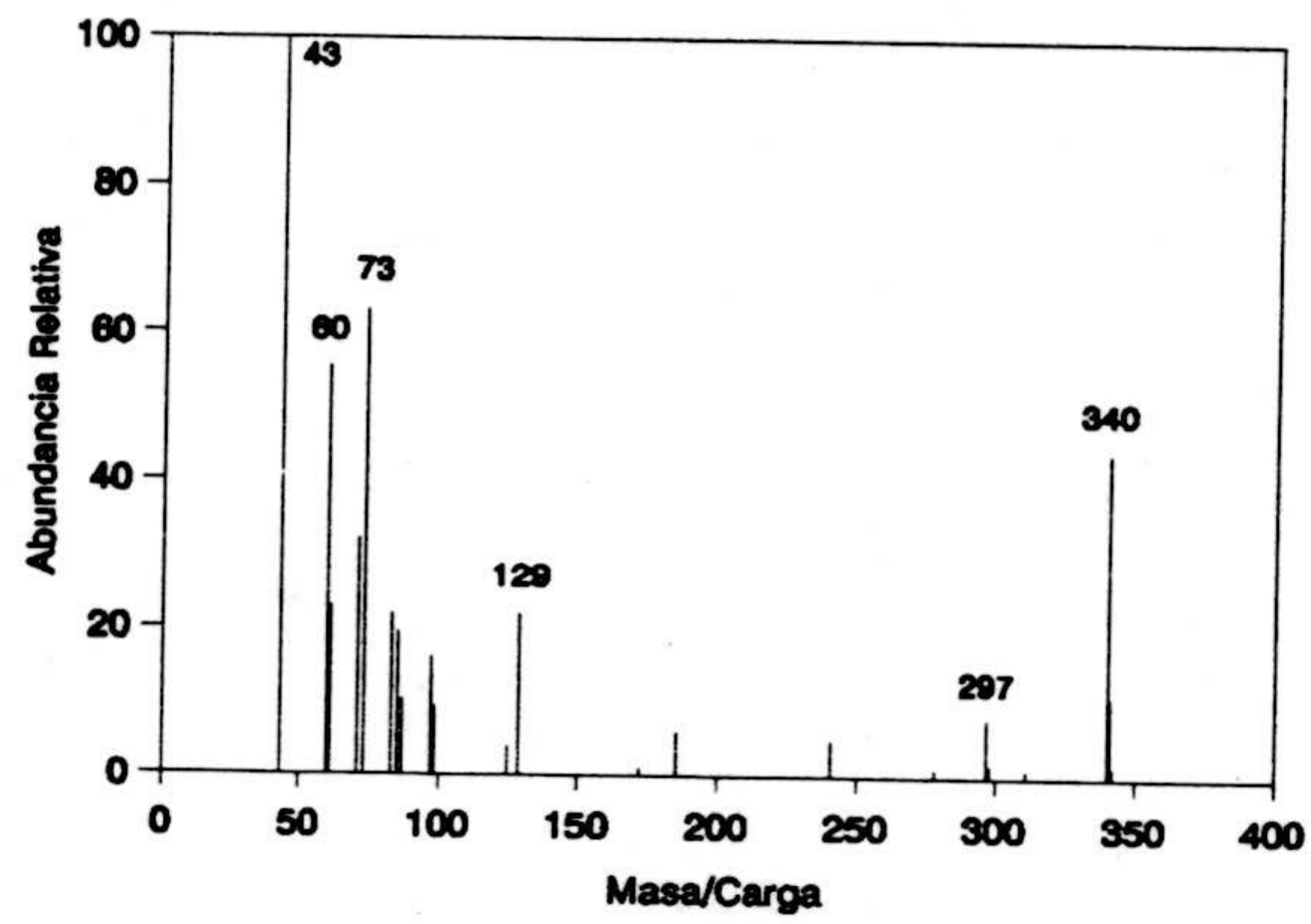


Figura 19.- Espectro de masas del ácido behénico.

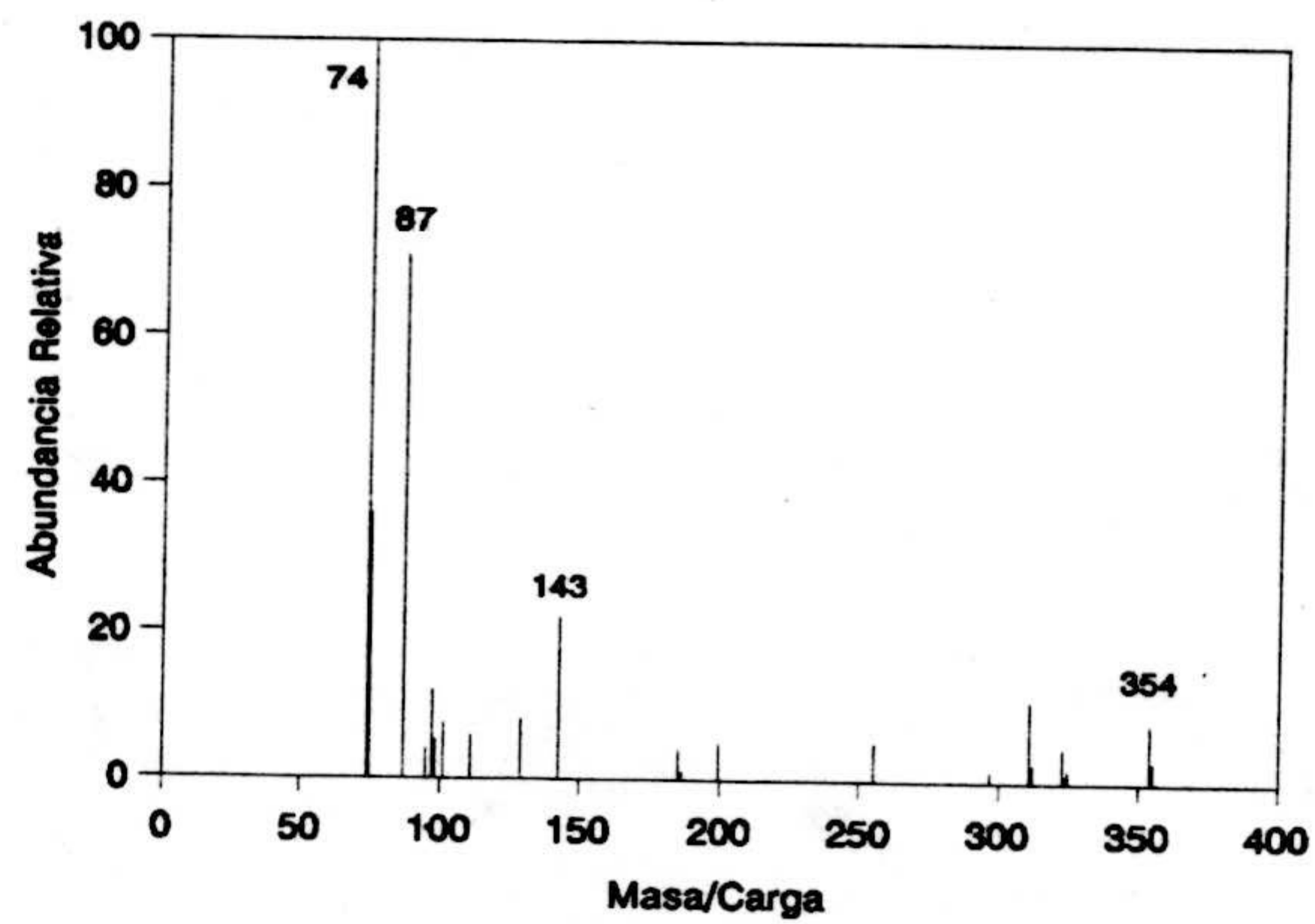


Figura 20.- Espectro de masas del behenato de metilo.

### **6.8.- Inmunoensayos**

Diversos tipos de sustancias con actividad fisiológica específica se han estudiado utilizando inmuno y radio inmunoensayos (RIA) con unos límites de detección para los ácidos grasos del orden de femtomolar en el análisis de muestras biológicas. Los diversos tipos de interferencias debidos a numerosas reacciones secundarias exige la prepurificación de la muestra mediante cromatografía líquida.

### **6.9.- Cromatografía en capa fina (TLC)**

La cromatografía en capa fina es una técnica de gran utilidad para la separación de los ácidos grasos de otros componentes contaminantes. Esto justifica que se la utilice con frecuencia como pretratamiento para GLC, LC, RIA o MS.

Utilizando placas de vidrio con silicagel, el valor del  $R_F$  de los ácidos grasos disminuye con el número de átomos de carbono y crece con el número de insaturaciones y el número de grupos hidrofílicos intramoleculares. El aumento de la polaridad del disolvente de desarrollo se traduce en crecimiento de los valores de los  $R_F$  de estos ácidos grasos. Como reveladores de las manchas generadas por los ácidos grasos se utilizan disoluciones etanólicas de rodamina 6G o de 2',7' - diclorofluoesceína o vapor de yodo.

### **6.10.- Cromatografía Gas - Líquido (CGL)**

La CGL aplicada al análisis de ácidos grasos requiere la utilización de temperaturas del orden de los 200 °C para conseguir su separación, lo que no es útil por la fragilidad de sus moléculas, que pueden llegar a fraccionarse a esa temperatura.

Por ello se utilizan diferentes reacciones químicas que conducen a derivados de los ácidos grasos mucho más volátiles que ellos mismos, para después someterlos al proceso cromatográfico.

#### **6.10.1.- Esterificación de los ácidos grasos**

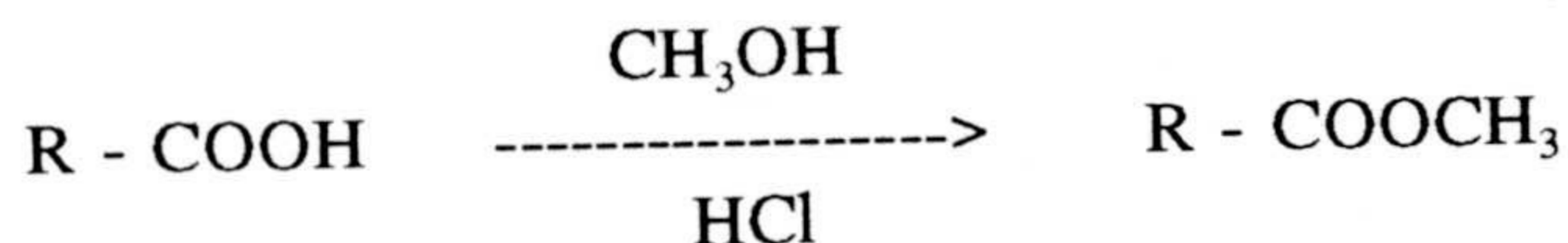
En la bibliografía se pueden encontrar muchos métodos que permiten la derivación de compuestos más volátiles que los ácidos grasos, aunque los más utilizados son aquellos que conducen a la formación de los correspondientes esteres metílicos. Una interesante revisión de diferentes métodos para la reacción de esterificación pueden encontrarse en el trabajo de SHEPPARD e IVERSON <sup>9</sup>. De entre ellos los más interesantes son los que a continuación se describen.

---

<sup>9</sup> SHEPPARD, A. J., e IVERSON, J. L., *J. Chromatogr.*, **25**, 339 81985)

### 6.10.2.- Esterificación con HCl (metanol).

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



PELIK y MAHADEVAN<sup>10</sup> proponen la preparación de la disolución metanólica del cloruro de hidrógeno haciendo burbujear una corriente del gas seco en el metanol también seco y en condiciones ahnidras.

HORNSTEIN<sup>11</sup> aplica el método a la determinación de ácidos grasos libres en grasas y utiliza la resina IRA-400 como preconcentración antes del tratamiento con MeOH/HCl.

HOSHI<sup>12</sup> propone el uso de acetato cúprico monohidrato para evitar alteraciones posibles en la reacción con ácidos grasos poliinsaturados.

---

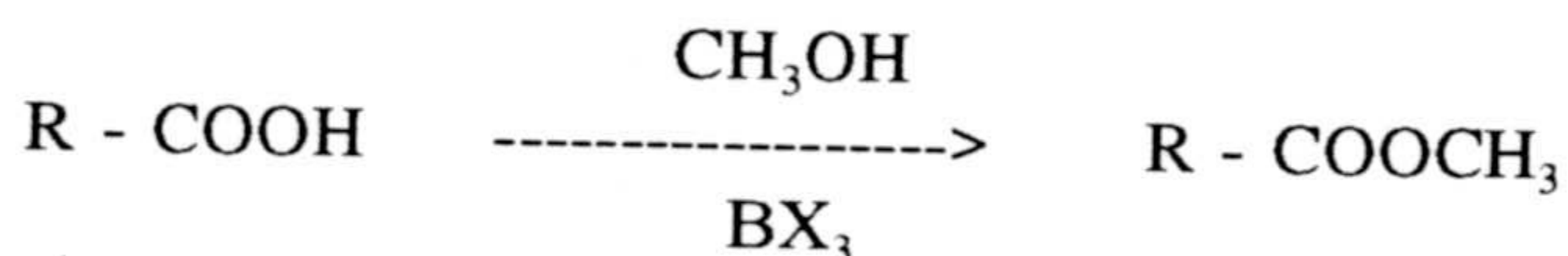
<sup>10</sup> PELIK, N. y MAHADEVAN, V.- En *Analysis of Lipids and Lipoproteins*, editado por G. Perkins, Am. Oil Chem. Soc, Chapman, IL, 24 (1975).

<sup>11</sup> HORNSTEIN, I y otros., *Anal. Chem.* **32**, 540 (1960).

<sup>12</sup> HOSHI, M y otros., *J. Lipid Res.*, **14**, 599 (1973).

### 6.10.3.- Esterificación con trihaluro de boro (metanol).

La reacción que tiene lugar puede esquematizarse de la manera siguiente:



KLOPFENSTEIN <sup>13</sup> recomienda el uso del tricloruro de boro para la esterificación, al igual que BRIAN <sup>14</sup> que lo utiliza para comparar el rendimiento de la reacción de esterificación con tricloruro de metilo o con diazometano y aplicándolo a la síntesis de los ésteres metílicos de ácidos grasos derivados del ciclopropano.

Por su parte METCALFE y SCHMITZ <sup>15</sup> y AL MAKDESSI <sup>16</sup>, utilizan el trifluoruro de boro y lo aplican a ácidos grasos y a lípidos.

---

<sup>13</sup> KLOPFENSTEIN, W. E., *J. Lipid Res.* **12**, 773 (1971)

<sup>14</sup> BRIAN, B. L. y otros.- *J. Chromatogr.*, **66**, 138 (1972)

<sup>15</sup> METCALFE, L. D. y SCHMITZ A. A.- *Anal Chem.* **33**, 363 (1961) y **38**, 514 (1966)

<sup>16</sup> AL MAKDESSI, S., y otros, *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 399 (1985)



#### 6.10.4.- Esterificación con $\text{CH}_3\text{I}$ .

Dos tipos de métodos, al menos, se deben citar en este grupo:

A) GRÜNERT y BASSLER <sup>17</sup>, después de extraer los ácidos grasos (de C10 a C18) de muestras de suero o plasma, tratan el extracto con  $\text{CH}_3\text{I}$  disuelto en acetato de etilo y con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  a  $90^\circ\text{C}$  durante una hora, analizando el resultado mediante CG.

B) GEHRKE y GOERLITZ <sup>18</sup> proponen un método que comienza con la formación de las sales potásicas de los ácidos grasos (C6 a C18 y dicarboxílicos e hidroxiacidos) tratando la muestra con potasa alcohólica, luego con  $\text{AgNO}_3$  en etanol del 95% y enfriar a  $-20^\circ$  y, por último, tratar el residuo de sales con  $\text{CH}_3\text{I}$  disuelto en *n*-pentano. El resultado lo analizan mediante CG.

#### 6.10.5.- Esterificación con diazometano.

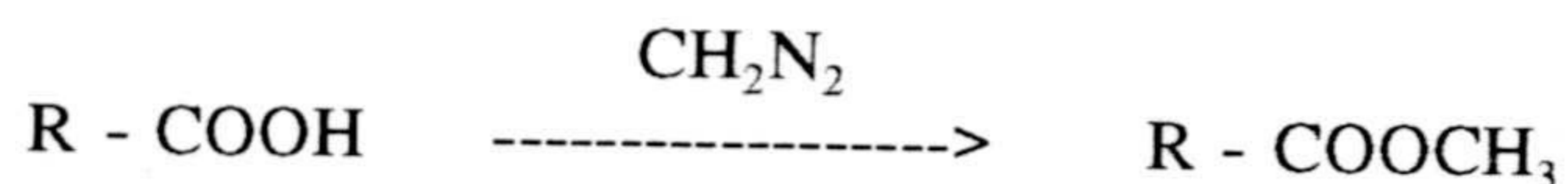
La formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos está basada en

---

<sup>17</sup> GRÜNERT, A. y BASSLER, K. H., *Z. Anal. Chem.*- **267**, 342 (1973)

<sup>18</sup> GEHRKE, C. W. y GOERLITZ, D. F.- *Anal. Chem.* **35**, 76 (1963)

el siguiente proceso:



La muestra conteniendo los ácidos grasos se disuelve en una mezcla éter etílico y metanol y se la hace reaccionar con un ligero exceso de diazometano. Cuando se desarrolla un color amarillo característico se detiene la esterificación y se elimina el exceso de reactivo con disolución de ácido acético en éter etílico y en atmósfera inerte de nitrógeno. El resultado se puede analizar mediante CG.

Este procedimiento se ha aplicado al análisis de ácidos grasos C10 - C12 <sup>19</sup>, incluso para la preparación a microescala <sup>20</sup>. Sin embargo la alta reactividad de este reactivo sugiere su utilización con ciertas reservas <sup>21</sup>.

---

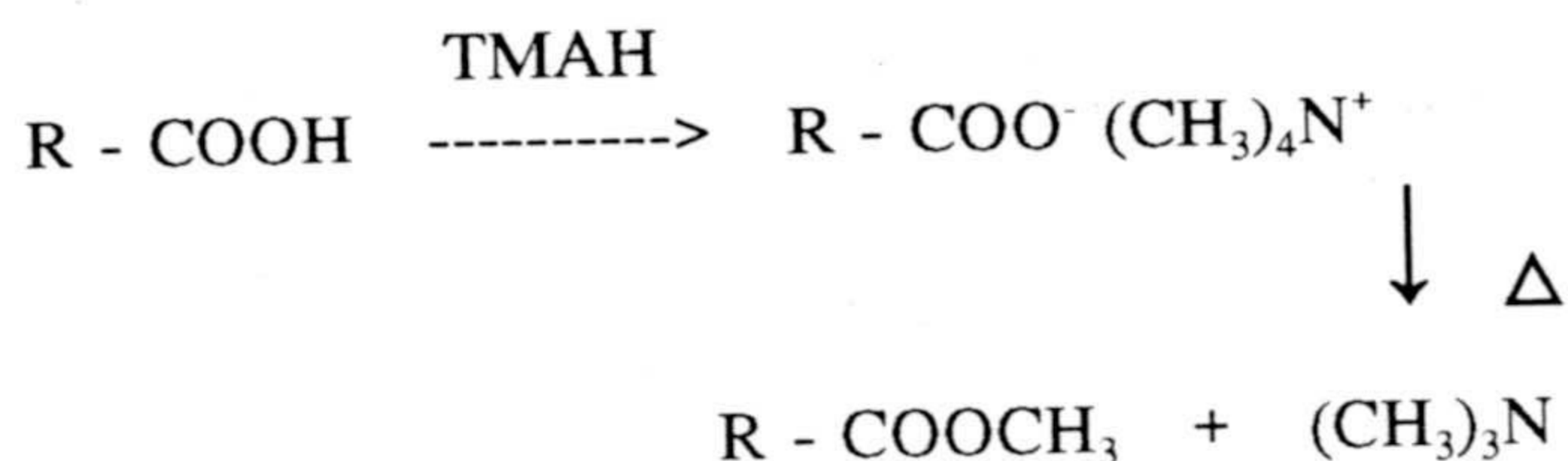
<sup>19</sup> MORRISON, W. R. Y otros.- *Chem. Ind.* 1535 (1961)

<sup>20</sup> SCHWARTZ, D. P. y BRIGHT, R. S.- *Anal. Biochem.* **61**, 271 (1974)

<sup>21</sup> CHISTIE, W. W., *Lipid Analysis*, Pergamon Press, Oxford, 1982

### 6.10.6.- Esterificación con hidróxido de amonio cuaternario

Utilizando el hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) el proceso que tiene lugar puede esquematizarse de la siguiente manera:



Como reactivo se ha utilizado el TMAH<sup>22, 23, 24</sup>, el hidróxido de (*m*-trifluorometilfenil) trimetilamonio<sup>25, 26</sup>, aplicándose tanto a la esterificación de ácidos grasos como de otros ácidos carboxílicos.

---

<sup>22</sup> ROBB, E. W. y WESTBROOK, J. J., *Anal. Chem.* **35**, 1644 (1963)

<sup>23</sup> DOWNING, D. T., *Anal. Chem.* **39**, 218 (1967)

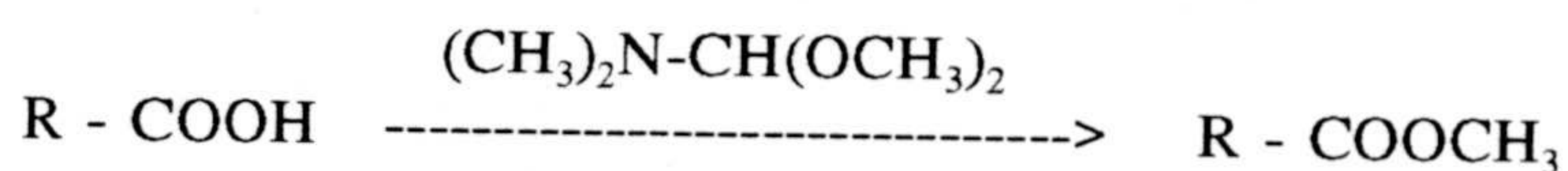
<sup>24</sup> MIDDLEDITCH, B. S. y DESIDERIO, D. M., *Anal. Lett.*, 5605 (1972)

<sup>25</sup> MacGEE, J. y ALLEN, K. G., *J. Chromatogr.*, **100**, 35 (1974)

<sup>26</sup> McCREARY, KOSSA, W. C., RAMACHANDRAN, S. y KURTZ, R. R., *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 329 (1978)

### 6.10.7.- Esterificación con dimetil formamida dialquil acetal.

La reacción química del proceso puede esquematizarse <sup>27</sup>:



El método es aplicable para metil, etil, propil, *n*-butil y *t*-butil acetales.

Una vez obtenidos los ésteres de los ácidos grasos, su separación es relativamente sencilla pudiendose para ello utilizar las diferentes técnicas cromatográficas disponibles. ACKMAN <sup>28</sup> hace un interesante estudio de la aplicación de la CLG para la separación de lípidos y su análisis cualitativo y cuantitativo empleando columnas empaquetadas o capilares a los ácidos grasos que pueden estar presentes en diferentes tejidos humanos.

---

<sup>27</sup> THENOT, j. P., Anal. Lett., 5, 217 (1972)

<sup>28</sup> ACKMAN, R. G.,

### 6.11.- Cromatografía líquida (LC)

La cromatografía líquida en cualquiera de sus modalidades de fase normal, reversa tiene interés para el análisis de ácidos grasos, pues en ocasiones puede llegar a diferenciar enantiómeros, isómeros posicionales y ácidos hidroxilados. Como detectores más frecuentes hay que citar espectroscopías UV, fluorescencia, electroquímica, RIA, MS o resonancia de spin electrónico. Una interesante revisión de algunos de los métodos de aplicación tanto de LC como de otras técnicas se puede encontrar en *Encyclopedia of Analytical Science* <sup>29</sup>.

### 6.12.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis de agentes surfactantes catiónicos o aniónicos presenta importantes dificultades que nacen en muchas ocasiones de la presencia de surfactantes no iónicos o de otros compuestos hidrofílicos en las muestras. KÖNING <sup>30</sup>, <sup>31</sup> opina que se pueden resolver los problemas mediante el uso de HPLC con columnas de sílice en fase reversa como fase estacionaria y

---

<sup>29</sup> *Encyclopedia of Analytical Science*. Academic Press (1995), Vol 4, pag, 2522.

<sup>30</sup> KÖNING, H., RYSCHKA, R. y STROBEL, W., *Fresenius Z. Anal Chem.*, **321**, 263 (1985).

<sup>31</sup> KÖNING, H. y STROBEL, W., *Fresenius Z. Anal Chem.*, **331**, 435 (1988)

mezclas metanol/agua como fase móvil en condiciones isocráticas. La detección de los correspondientes picos la realizan utilizando un refractrómetro diferencial, alcanzando un límite de detección de alrededor de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

KUDOK y TSUJI <sup>32</sup> utilizan también HPLC en fase reversa para estudiar surfactantes aniónicos obteniendo los correspondientes derivados mediante reacción con 4-diazometil-N,N-dimetilbencenosulfonamida y empleando un detector de ultravioleta. El método que describen es sencillo de aplicar y rápido en la obtención de los resultados.

### 6.13.- Técnicas eléctricas.

#### 6.13.1.-Potenciometría y valoraciones potenciométricas

La determinación potenciométrica del punto final de una valoración también se ha utilizado con el fin de conocer la concentración de tensioactivos en disoluciones.

---

<sup>32</sup> KUDOK, M. y TSUJI, K., *J. Chromatog.*, **294**, 456 (1984)

Ya en 1961 SEHER<sup>33</sup> la usó para estudiar el complejo insoluble que el tetrafenil borato sódico forma con los surfactantes no iónicos en presencia de cloruro bórico.

Con la misma finalidad UNO y MIYAJIMA<sup>34</sup> utilizan el Rojo Congo para la detección del punto final. Se trata de valoraciones potenciométricas en las que detergentes no iónicos forman complejos ternarios con aniones lipofílicos en presencia de metales. Los electrodos utilizados pueden ser de diversos tipos que pueden ir desde el de plata hasta los selectivos de iones preparados sobre membranas de PVC y que suelen utilizar como agente valorante tetrafenil borato sódico.

Un resumen de lo publicado entre 1965 y 1988 en este sentido puede encontrarse en el artículo de VYTRAS, DVARAKOVA y ZEMAN<sup>35</sup>, en el que presenta los resultados encontrados para diferentes surfactantes no iónicos en presencia de Ca(II), Sr(II), Ba(II) y ocasionalmente Pb(II).

También se han utilizado electrodos selectivos para la detreminación de tensioactivos en agua. CAMPANELLA y colaboradores<sup>36</sup> de la

---

<sup>33</sup> SEHER, A., *Fete, Seifen, Anstrichm.*, **63**, 617 (1961).

<sup>34</sup> UNO, T y MIYAJIMA, K., *Chem Pharm. Bull.*, **11**, 75 (1963)

<sup>35</sup> VYTRAS, K., DVARAKOVA, V. y ZEMAN, I., *Analyst*, **114**, 1435 (1989)

<sup>36</sup> CAMPANELLA, L., MAZZEI, F. Y TOMASSETTI, M.,

Universidad "La Sapienza" de Roma han propuesto la utilización de un sensor para el electrodo ión-selectivo compuesto por un derivado del ácido cólico (colato de bencil-dimetil-cetil-amonio) utilizando como referencia Ag/AgCl, consiguiendo un rango lineal para determinar concentraciones de aniónicos desde  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$  M, con unos coeficientes de correlación superiores a 0.99.

### **6.13.2.- Conductometría**

MEHROTRA, CHAUHAN y SHUKLA <sup>37</sup> de la Universidad de Agra en la India, realizan un estudio acerca de los jabones conteniendo samario en su estructura como derivados de los ácidos valerianico, cáprico, caprílico y caproico. Realizan medidas de conductividad empleando una celda con electrodos de platino platinado a la temperatura de 40 °C. Concluyen que la conductividad específica decrece al crecer la longitud de la cadena del jabón, lo que puede ser debido a la menor movilidad de los aniones cuando crece la longitud de la cadena.

### **6.13.3.- Polarografía**

Un método para la deteminación de surfactantes no iónicos en el

---

<sup>37</sup> MEHROTRA, K. N., CHAUHAN, M. y SHUKLA, R. K., *J. India Chem. Soc.*, **66**, 226 (1989)



rango de concentraciones comprendido entre 10 y 1000 ppm puede encontrarse en el artículo de DESBENE, DESMAZIERES, BASSELIER Y DESBENE-MONVERNAY <sup>38</sup>, utilizando detección polarográfica después de separar los componentes mediante cromatografía de partición en fase reversa de los derivados obtenidos con cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo.

La optimización de la detección electroquímica la establecen estudiando la influencia de diferentes disolventes orgánicos (seleccionan acetonitrilo/agua), la sal empleada como soporte  $[(C_4H_9)_4NClO_4]$  y el potencial de reducción (-1 V frente a Ag/AgCl en modo directo o de -0,8 frente a Ag/AgCl en modo pulsante diferencial).

Esta detección polarográfica es 50 veces más sensible que la detección ultravioleta.

---

<sup>38</sup> DESBENE, P. L., DESMAZIERES, B., BASSELIER, J. J. y DESBENE-MONVERNAY, A., *J. Chromatogr.*, **465**, 69 (1989)

## 7.- DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Cualesquiera procesos que se utilicen con el fin de eliminar agentes contaminantes de las aguas residuales urbanas o industriales se conoce con el nombre de depuración de las mismas. Lo que a continuación se expone no es más que un muy breve comentario de las etapas de depuración de un planta, con el fin de indicar en su momento los puntos de la misma en los que se han tomados las muestras a las que se han aplicado los diferentes métodos analíticos propuestos en esta memoria

Los procesos de depuración se suelen calificar de primarios, secundarios o completos según el grado de tratamiento efectuado. El tratamiento de las aguas después de su participación en los procesos de una industria es necesario para eliminar los restos de productos de esa industria que puedan afectar a la calidad del agua posterior o que puedan afectar a los procesos de depuración posteriores más amplios.

Un esquema general simplificado de una depuradora actual se puede ver en la gráfica 1, tomado de la obra de HERNÁNDEZ <sup>39</sup>.

---

<sup>39</sup> HERNÁNDEZ MUÑOZ, A., Depuración de aguas residuales. Colegio de Ingenieros de caminos, canales y puentes y Servicio de publicaciones de la Escuela de Ingenieros de Caminos de Madrid. 1990.

Figura 1 . Esquema de la planta depuradora.

Las aguas negras procedentes del colector emisario entran por (1) y mediante las rejillas correspondientes se retiran los sólidos gruesos que son trasladados por cintas a recipientes adecuados para su posterior incineración o transporte a un vertedero. Si es necesario una bomba eleva estas aguas hasta una altura conveniente para que el resto del proceso en la depuradora ocurra por gravedad.

En los desarenadores (2) se retienen los sedimentos del agua que se recogen, se lavan y se acarrean hasta la incineradora o el vertedero. Tras este tratamiento es conveniente instalar un medidor de caudal para poder realizar posteriormente un cálculo de las cargas contaminantes eliminadas, de los tiempos de retención, consumo de reactivos, etc. Todo esto aportará datos para conocer el costo económico del proceso de depuración.

Los tanques de mezcla (3) se utilizan por una parte para homogenizar el agua y además, por incorporación de aire, mantener frescas las aguas negras.

En los tanques para la sedimentación primaria (4) se deposita aproximadamente el 60 % de los sólidos en suspensión que son barridos mecánicamente hasta una tolva adecuada y luego trasladados hasta los espesadores de los lodos primarios (9), donde se concentran por gravedad hasta un valor del 7 %. En estos tanques suelen aparecer también materiales flotantes que son retirados y trasladados a la incineradora o al vertedero.

---

El tratamiento biológico se realiza en los reactores (5) en los que la aireación y la agitación favorecen el proceso metabólico y la formación de flóculos, que decantan en los decantadores secundarios (6) dotados, como los primarios, de barrederas para ir separando los lodos e irlos trasladándolos a los espesadores de lodos secundarios (10), donde mediante la adición de un polielectrolito para la floculación, son concentrados hasta un 4,8 % (11). La flotación (12) se realiza por recirculación del efluente del espesador, previa presurización con inyección de aire. El sobrenadante se recircula a la cabeza de la planta y los fangos a un depósito común de regulación (13) y espeamiento (14), antes de pasar a digestión.

La estabilización de los fangos se realiza en los digestores (15) mediante procesos anaerobios, generando gases que suelen almacenarse a presión de unos 7 Kg/cm<sup>2</sup> y utilizarse posteriormete para alimentar los generadores de energía de la planta.



## **CAPÍTULO I**

**EXPERIMENTAL:**

**DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN**





## **1.- DISOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS.**

### **1.1.- Disoluciones empleadas.-**

En este apartado se recojen todas las disoluciones empleadas a lo largo de todo el trabajo experimental descrito en la presente Memoria.

*1.1.1.- Disoluciones de ácidos grasos.* Han sido preparadas por pesada exacta ( $\pm 10 \mu\text{g}$ ) y disolución en metanol purísimo. Las disoluciones se han conservado a  $5^{\circ}\text{C}$  en botellas de vidrio de 100 mL.

En la tabla I.1 se especifica cada uno de los ácidos grasos, su grado de pureza, fabricante y concentración de las disoluciones correspondientes.

**Tabla II.1.-** Disoluciones patrón de ácidos grasos.

Ácido graso	Pureza %	Fabricante	Concentración mg.L <sup>-1</sup>	
Ácido Cáprilico	99	SIGMA	17.12	104.0
Ácido Cáprico	99	SIGMA	10.52	102.0
Ácido Láurico	99	SIGMA	10.08	108.0
Ácido Tridecanóico	99	SIGMA	10.00	100.0
Ácido Mirístico	99	SIGMA	9.92	100.4
Ácido Palmítico	99	SIGMA	10.44	96.0
Ácido Oléico	99	SIGMA	15.12	104.4
Ácido Esteárico	99	SIGMA	12.56	99.2
Ácido Aráquico	99	SIGMA	10.40	100.0
Ácido Behénico	99	SIGMA	10.12	103.2

Las disoluciones de trabajo se prepararon por disolución de éstas en metanol absoluto.

**1.1.2.- Disoluciones de diferentes agentes esterificantes.** Se han empleado dos agentes esterificantes:

- Hidróxido de Tetrametilamonio (TMAH). Suministrado por SIGMA con una pureza > 97%. Se prepararon disoluciones al 20% en metanol, por pesada y posterior disolución en metanol absoluto.

- Trifluoruro de Boro ( $F_3B$ ). Suministrado por SIGMA como disolución al 14 % en metanol.

**1.1.3.- Disolución de NaCl.** Se han disuelto 87.75 g de NaCl en 500 mL de agua desionizada.

## **1.2.- Reactivos sólidos empleados.-**

**1.2.1.- Ácido Etilendiamintetraacético, sal tripotásica, dihidrato 98%. ALDRICH.** Empleado en el método de referencia para la extracción de ácidos grasos de fangos.

**1.2.2.- Carbonato potásico PANREAC PRS.** Empleado en el método de referencia para la extracción de ácidos grasos de fangos.

**1.2.3.- Cloruro potásico Pro análisis MERCK.** Empleado en el método de referencia para la extracción de ácidos grasos de fangos.

**1.2.4.- Sulfato sódico anhidro Pro Analisis MERCK.** Agente deshidratante de los diferentes extractos orgánicos obtenidos.

### **1.3 Disolventes orgánicos empleados.**

**1.3.1.- Metanol purísimo PANREAC PRS.**

**1.3.2.- Diclorometano (estabilizado con amileno) PANREAC PRS.**

**1.3.3.- Triclorometano PANREAC PRS.**

**1.3.4.- Tetracloruro de carbono PANREAC HPLC.**

**1.3.5.- n-Hexano PANREAC PRS.**

**1.3.6.- iso-Octano PANREAC PRS.**

**1.3.7.- Éter etílico LAB-SCAN HPLC.**

**1.3.8.- Éter de petróleo (40-60°C) PANREAC PRS.**

**1.3.9.- Triclorotrifluoroetano PANREAC PRS.**

### **1.4.- Ácidos inorgánicos.-**

**1.4.1.- Ácido Clorhídrico concentrado PANREAC PRS.**

## **2.- INSTRUMENTACION Y MATERIAL DE LABORATORIO.**

### **2.1.- Instrumentación.**

#### **2.1.1.- Sistema acoplado Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas.**

2.1.1.1.- Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Serie II, provisto de:

- Portal de Inyección para columnas capilares sin división de muestra.
- Horno cromatográfico con un rango de temperatura 20- 400 °C.
- Interfase de transferencia directa de muestra al espectrómetro de masas.

2.1.1.2.- Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5971A, provisto de:

- Fuente de ionización por impacto electrónico a 70 eV.
- Separador de iones tipo cuadrupolo.
- Detector de iones
- Bomba de vacío

2.1.1.3.- Sistema de inyección automática, provisto de:

- Inyector Automático HP

- Bandeja Portamuestras HP
- Jeringa

## **2.2.- Aparatos.-**

**2.2.1.- pH-metro digital. HANNA INSTRUMENTS. HI 8414,** provisto de electrodo resina epoxi HI 12135.

**2.2.2.- Agitador de varilla. Eurostar Basic. IKA LABORTECHNIK. (50-2000 r.p.m.).**

**2.2.3.- Baño de Ultrasonidos. Selecta 1L.**

**2.2.4.- Bomba de agua para vacio. Büchi B-169 Vacuum-System.**

**2.2.5.- Agitador de tubos. Heidolph REAX 2000.**

**2.2.6.- Baños de agua. Selecta Precistrem S-140 y Selecta Precistrem S-137.**

**2.2.7.- Estufa de Secado. Heareus 50-300 °C.**

**2.2.8.- Balanzas analíticas. Mettler PJ360 DeltaRange y Mettler AE 163.**

**2.2.9.- Rotavapor.- Heidolph VV1. 40-220 r.p.m.**

**2.2.10.- Arcón congelador EDESA.**

**2.3.- Material de laboratorio.**

**2.3.1.- Matraces aforados Afora clase A, de diferentes capacidades.**

**2.3.2.- Pipetas graduadas y aforadas Afora clase A, de diferentes capacidades.**

**2.3.3.- Equipo filtración Millipore, provisto de:**

- Portafiltros analíticos de soporte de vidrio sinterizado.
- Filtros Millipore de 47mm

**2.3.4.- Equipo de vidrio Soxhlet de extracción Sólido-Líquido, Afora.**

**2.3.5.- Embudos de decantación de diferentes volúmenes, Afora.**

**2.3.6.- Encapsulador de viales cromatográficos HP.**

**2.3.7.- Descapsulador de viales cromatográficos Tecnokroma.**

**2.3.8.- Viales de inyección cromatográfica de 2 mL de capacidad HP.**

### **3.- ORDENADORES Y PAQUETES INFORMÁTICOS.-**

#### **3.1.- Ordenadores.-**

##### **3.1.1.- Ordenador HP Apollo Serie 400, provisto de :**

- Pantalla de video HP 98754A
- Unidad de datos DAT HP 6000 (660s) Digital Data Storage
- Interfaces para establecer comunicación con los diferentes componentes del equipo:

#### **3.2.- Impresoras.-**

##### **3.2.1.- Hewlett Packard LaserJet III.**

##### **3.2.2.- Hewlett Packard DeskJet 560C.**

#### **3.3.- Paquetes informáticos.-**



---

La recogida y tratamiento de datos cromatográficos se ha realizado mediante el programa HP-UX Chemsystem.

Las representaciones gráficas se han llevado a cabo con el programa Harvard Graphics v 3.0 (1991).

Como programas de cálculo se han empleado Statgraphics v 6.0 y Alamín.<sup>40</sup>

---

<sup>40</sup> GARCÍA CAMPAÑA A., *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada 1995.

## **CAPÍTULO II**

**QUIMIOMETRÍA:**

**APLICACIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE GASES**

En este capítulo que dedicamos al tratamiento estadístico de la señal cromatográfica, se pretende profundizar en el conocimiento de dos aspectos básicos de la metodología analítica en Cromatografía de Gases como son: el empleo del patrón interno y el cálculo del límite de detección.

---

## 1.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA METODOLOGÍA DEL PATRÓN INTERNO EN CROMATOGRAFÍA DE GASES.

### 1.1.- Introducción

El método del patrón interno, descrito en 1969 por McNair y Bonelli<sup>1</sup>, es en la actualidad universalmente utilizado para establecer señales analíticas en cromatografía de gases. Su uso en esta técnica analítica ha sido ampliamente descrito por diversos autores. Se han estudiado las condiciones cromatográficas que debe de cumplir el patrón interno<sup>1,2,3</sup> las ventajas que implica su uso<sup>2,3</sup>, así como algunas precauciones a tomar para minimizar los errores inherentes a su empleo<sup>4,5,6,7</sup>.

---

<sup>1</sup>H. M. McNair and E.J. Bonelli, *Basic Gas Chromatography*, Varian Aerograph, 5th ed., 1969.

<sup>2</sup>R. C. Graham, *Data Analysis for the Chemical Sciences*. VCH Publishers, New York, 1993.

<sup>3</sup>K. Robards, P. R. Haddad and P. E. Jackson, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press, London, 1994.

<sup>4</sup>A. Shatkay and S. Flavian. *Anal. Chem.* 49 (1977) 2222.

<sup>5</sup>A. Shatkay, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1423.

<sup>6</sup>P.W. Crockett. *Anal. Chem.*, 58 (1986) 699

Por otra parte continuamente se sugieren modificaciones a la aplicación de esta metodología a distintas técnicas analíticas de actualidad tales como voltametría de pulso diferencial<sup>8</sup>, electroforesis capilar<sup>9</sup>, espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica<sup>10</sup>, espectrometría de masas/transformada de Fourier<sup>11</sup>, ICP-MS<sup>12</sup>, SIMS<sup>13</sup>.

Cuando se utiliza el método de patrón interno para cuantificar analitos, el calibrado instrumental se obtiene a partir del cociente de las señales analíticas que son las áreas (o las alturas) de los picos característicos del analito y del patrón interno respectivamente, variando exclusivamente la concentración de analito:

$$\frac{A_a}{A_{P. I.}} \quad VS \quad \frac{C_a}{C_{P. I.}}$$

$A_a$  : área analito.

<sup>7</sup>M. Jemal and J. Bergum. *J. Clin. Pharmacol.*, 32 (1992) 676.

<sup>8</sup>A. R. Fernando and B. Kratochvil. *Can. J. Chem.*, 69 (1991) 755.

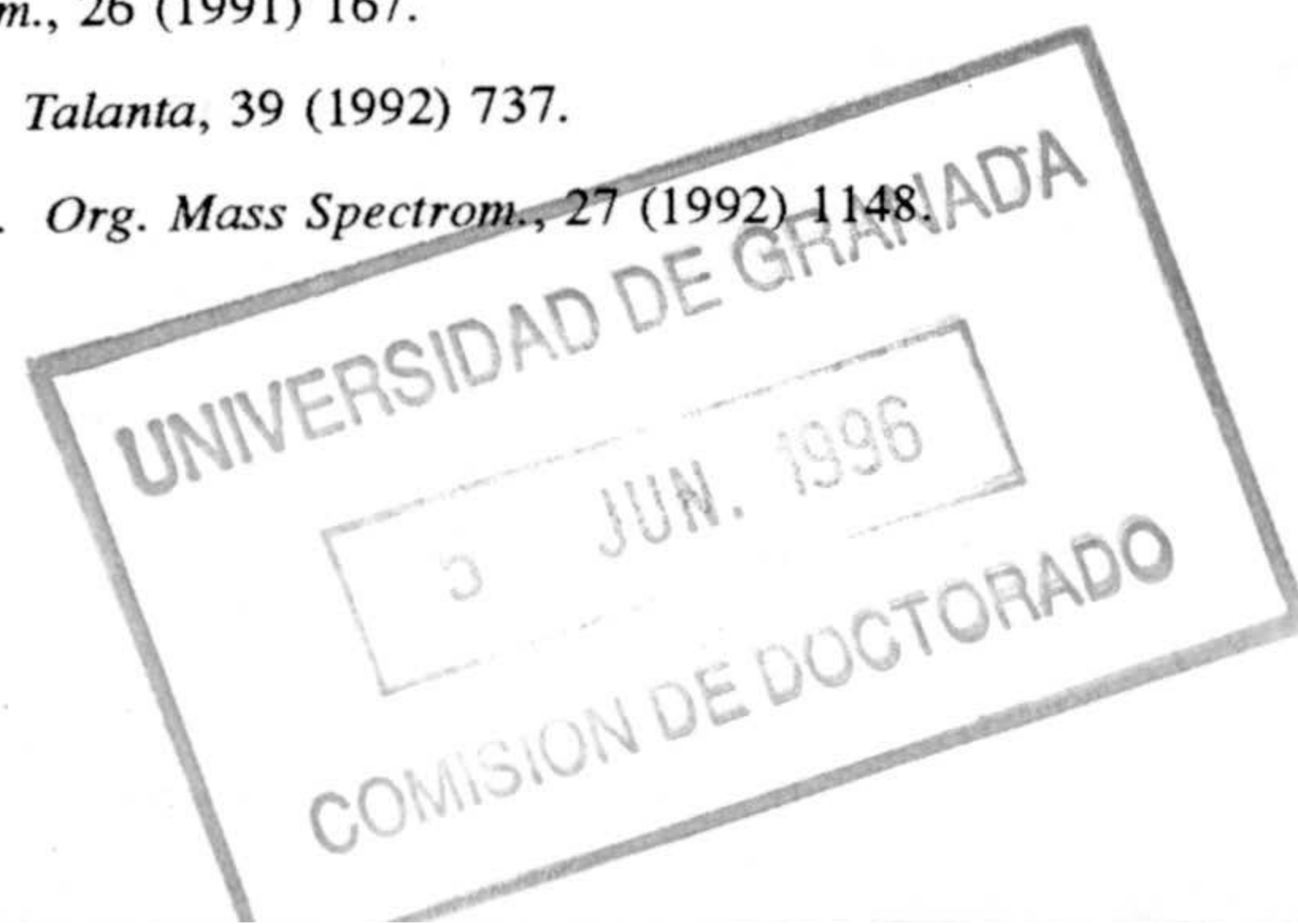
<sup>9</sup>E.V. Dose and G. Guiochon. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1154.

<sup>10</sup>P. R. Nelson. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2 (1991) 427.

<sup>11</sup>C. G. Jiang, L.S. Sheng and D. K. An. *Org. Mass Spectrom.*, 26 (1991) 167.

<sup>12</sup>F. Vanhaecke, H. Vanhoe, R. Dams and C. Vandecasteele. *Talanta*, 39 (1992) 737.

<sup>13</sup>K. Meyer, B. Hagenhoff, M. Deimel and A. Benninghoven. *Org. Mass Spectrom.*, 27 (1992) 1148.



- $A_{P.I.}$  : área patrón interno.  
 $C_a$  : concentración analito.  
 $C_{P.I.}$  : concentración patrón interno.

Al utilizar estos cocientes de señales se corrige cualquier variación instrumental que ocasionalmente puede afectarles y se puede emplear por tanto con mayor seguridad para ajustar experimentalmente la función de calibrado. A partir de ella, se pueden obtener predicciones sobre la composición de las muestras a analizar (inferencia estadística) con mayor precisión. Sin embargo, es necesario que el ajuste estadístico de los datos sea correcto a fin de detectar y en su caso evitar la presencia de errores sistemáticos en los resultados del análisis.

La regresión por mínimos cuadrados conduce a una buena estimación de los parámetros del modelo siempre que se cumplan unas hipótesis que afectan a las variables predictoras,  $x$  (concentración o masa de analito), y respuesta,  $y$  (señal analítica), y que esquematizamos como: a) Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la variable respuesta; b) El error en la medida de la señal debe estar normalmente distribuido; y c) La magnitud del error aleatorio de la medida de la señal instrumental debe ser constante e independiente de la concentración de la disolución patrón (homocedasticidad).

Las áreas (o alturas) de pico siguen una distribución normal, sin

embargo, dado que el cociente de dos variables normales no se ajusta a una distribución normal<sup>14</sup>, el cociente de áreas (o alturas) no cumpliría la segunda de las hipótesis de partida. Los métodos de inferencia sobre la regresión mínimo-cuadrática funcionan bien con desviaciones moderadas de la normalidad<sup>15</sup>, pero, como comprobaremos a lo largo de este capítulo, a veces se obtienen grandes desviaciones lo que obligaría a utilizar algoritmos de regresión robusta<sup>16,17</sup> con la correspondiente pérdida en la precisión de las estimaciones.

Bajo ciertas condiciones, el cociente de áreas (o alturas) de pico cromatográfico se aproxima suficientemente a una distribución normal y, por ello, es posible utilizar la regresión por mínimos cuadrados para establecer la función de calibrado. En el presente capítulo hemos estudiado las condiciones estadísticas necesarias para que el cociente de las áreas de los picos del analito y patrón interno se puedan ajustar a una distribución normal, y finalmente hemos deducido consecuencias prácticas para el experimentador en cromatografía a fin asegurar la normalidad de los cocientes de datos obtenidos.

---

<sup>14</sup>A. Stuart and J.K. Ord, *Kendall's Advanced Theory of Statistics. Vol. 2: Classical Inference and Relationship*". Wiley, Chichester, 1991. Ch 11, p. 400

<sup>15</sup>A. Martín Andrés and J.D. Luna del Castillo, *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. 4th ed., Norma, Madrid, 1994. Ch. 12, p. 461.

<sup>16</sup>G.R. Phillips and E.M. Eyring. *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1134

<sup>17</sup>P.J. Rousseeuw and A.M. Leroy. *Robust Regression & Outliers Detection*, Wiley, New York, 1987.

---

Para llevar a cabo este estudio se ha seguido el siguiente protocolo:

- a) Estudiar las condiciones en que el cociente de áreas independientes (generadas aleatoriamente) cumplen la condición de normalidad.
- b) Estudiar las condiciones en que el cociente de áreas correlacionadas (generadas aleatoriamente) cumplen la condición de normalidad.
- c) Estudiar las condiciones en que el cociente de áreas obtenidas experimentalmente cumplen la condición de normalidad.

La generación de variables aleatorias normales se ha realizado mediante STATGRAPHICS<sup>18</sup> y para chequear la normalidad se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov<sup>19</sup>. A continuación se describe el proceso seguido en cada caso.

### **1.2.- Generación variables aleatorias normales.**

La generación de variables aleatorias normales puede hacerse mediante el paquete informático STATGRAPHICS V6.0 . La utilización de listas de números aleatorios no es eficiente cuando trabajamos con el

---

<sup>18</sup>STATGRAPHICS 6.0, Statistical Graphics Corporation, 1983.

<sup>19</sup>J.C. Miller and J.N. Miller. *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd. ed., Ellis Horwood, Chichester, 1988. Ch. 6, p. 156-60.



ordenador. En éstos se trabaja con los denominados números pseudoaleatorios. A partir de métodos aritméticos particulares, se obtienen secuencias de números pseudoaleatorios que, si bien no son generados al azar, sí verifican una serie de propiedades: tener una distribución uniforme y ser estadísticamente independientes.

Aunque hay diversos métodos de generación de números pseudoaleatorios, los más usuales son los denominados métodos congruenciales, que consisten en lo siguiente: A partir de un valor  $X_0$ , denominado semilla (que puede ser introducido por el usuario o bien lo determina el propio ordenador a partir de la hora real u otros métodos), se obtiene:

$$X_1 = ( aX_0 + c ) \text{ mod } m$$

**mod m:** modulador m. Opera dividiendo  $(a X_0 + c)$  entre m, dando como resultado final  $X_1$  igual al resto de dicha división.

La elección de los valores a, c y m es fundamental para que la secuencia obtenida verifique las propiedades exigidas a los números pseudoaleatorios. Para ordenadores con tamaño de palabra de 32 bits (un 486, por ejemplo), un conjunto adecuado de valores es  $m = 2^{31}$ ,  $a = 65539$ ,  $c = 0$  y  $X_0$  cualquier entero impar menor que 9999.

Para determinados valores de  $a$ ,  $c$  y  $m$  enteros. Sucesivamente se generan:

$$X_2 = ( aX_1 + c ) \text{ mod } m$$

.....

.....

$$X_n = ( aX_{n-1} + c ) \text{ mod } m$$

Una vez obtenidos, pueden transformarse en valores con distribución aleatoria uniforme  $U(0,1)$  mediante:

$$U_n = \frac{X_n}{m}$$

Una vez que contamos con la secuencia de números aleatorios uniformes, definidos por la función  $U(0,1)$ , se genera a partir de ella la función de distribución normal  $N(0,1)$ . Para hacer esto se hace un muestreo de 1000 valores de  $U(0,1)$  los cuales se ajustan a una  $N(0,1)$ .

Y finalmente para obtener los mil valores de una distribución normal con media y varianza definidas por nosotros, simplemente hay que destipificar la normal, o sea:

Tipificar:

$$y = \frac{\mu - \bar{x}}{\sigma^2}$$

Destipificar:

$$\mu = \sigma^2 y + \bar{x}$$

### 1.3.- Comprobación normalidad de los cocientes.

#### Test de Kolmogorov-Smirnov.

El test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) (Miller) nos resuelve un problema estadístico frecuente, que es la bondad de ajuste con datos continuos (20). Este problema surge cuando se necesita probar la procedencia de una muestra de observaciones de una distribución en concreto. En nuestro caso nos interesa comprobar si nuestras observaciones proceden de una distribución normal. Hay otros test para comprobar la normalidad (**REF**), pero el de K-S es muy apropiado para probar la bondad de ajuste con datos continuos.

En esta memoria el test de K-S se utiliza para comparar la curva de frecuencias acumuladas (Miller) de nuestras observaciones con la curva de frecuencias acumuladas de la distribución normal figura I.1.

Para realizar el test de K-S emplearemos de nuevo el paquete

informático STATGRAPHICS v 6.0. El proceso para llevar a cabo el test es el siguiente:

1.3.1.- Transforma las señales originales (cocientes), en la variable normal estándar  $z$ , que es del tipo :

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

- $z$  : variable normal estándar.  
 $\mu$  : media poblacional.  
 $\sigma$  : desviación estándar poblacional.

para lo cual empleamos la expresión:

$$z = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$$

- $s$  : desviación estándar muestral.  
 $\bar{x}$  : media muestral.

1.3.2.- A continuación construimos la gráfica de frecuencias acumuladas experimental con los valores estandarizados y la gráfica de frecuencias acumuladas teórica, figura II.1.

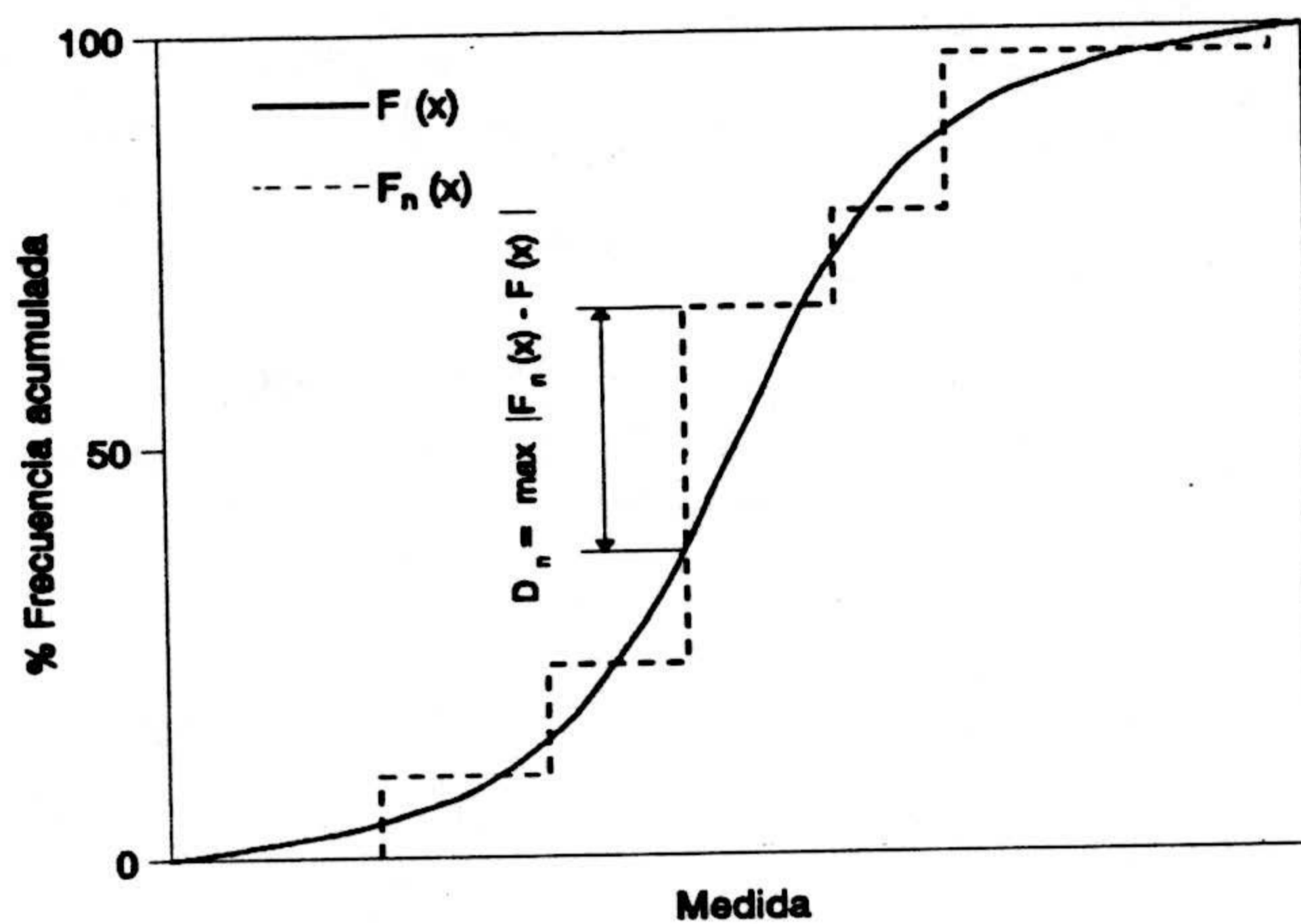


Figura II 1 Gráfica de frecuencias acumuladas experimental y teórica.

1.3.3.- Calculamos el valor del estadístico de contraste.

$$D_n = \max | F_n(x) - F(x) |$$

$D_n$  : Estadístico de contraste calculado.

$F_n(x)$  : Curva de frecuencias acumuladas de la función empírica.

$F(x)$  : Curva de frecuencias acumuladas de la función teórica.

1.3.4.- Realizamos el test, comparando  $D_n$  (diferencia máxima entre las curvas experimental y teórica), con  $D_{n, \alpha=0.05}$  (valor crítico tabulado):

$$H_0 \equiv D_n \leq D_{n, 0.05}$$

$$H_1 \equiv D_n > D_{n, 0.05}$$

$H_0$  : hipótesis nula.

$H_1$  : hipótesis alterna.

$\alpha$  : nivel de significación.

$n$  : número de observaciones.

Para verificar que nuestras observaciones se ajustan a una distribución normal, tenemos que obtener una conclusión no significativa, o sea concluir por  $H_0$  al aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov. Al trabajar con STATGRAPHICS, obtendremos directamente el valor P de significación para

el test ( $P_{K-S}$ ).

#### 1.4.- Aplicación del test de K-S.

La conclusión del test será significativa (valor  $P_{K-S} < 5\%$ ) cuando los datos de una muestra no se ajustan a una distribución normal (hipótesis alternativa), mientras que una conclusión no significativa (valor  $P_{K-S} > 20\%$ ) implica un buen ajuste (hipótesis nula). Valores intermedios del valor  $P_{K-S}$  no permiten conclusiones estadísticamente fiables y requerirían un aumento del tamaño muestral.

Se han planteado tres experiencias para estudiar y comprobar bajo qué condiciones el cociente entre las áreas de los picos cromatográficos de analito y patrón interno sigue una distribución normal.

##### 1.4.1.- *Comprobación de la normalidad del cociente de áreas simuladas (variables independientes).*

Para realizar esta experiencia se generaron aleatoriamente distintos conjuntos de 1000 datos, normalmente distribuidos, como numeradores (área analito) y denominadores (área patrón interno). Todos los numeradores tenían una media arbitraria igual a cien, pero cada uno con desviación

estándar distinta. El rango de desviaciones estándar explorado para los numeradores incluía los valores de 1, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 (desviación estándar relativa,  $DSR_N$ , entre 1% y 15%). Los denominadores generados comprendían medias arbitrarias entre 10 y 1000. Para cada valor de denominador se generaron 5 conjuntos de datos con diferentes desviaciones estándar ( $DSR_D$  del 1, 5, 2.5, 10 y 15%). Una vez obtenidos todos los valores se realizaron los respectivos cocientes (un total de 300), y se les aplicó el test de K-S, para cada cociente se obtuvo su correspondiente valor  $P_{K-S}$  para comprobar la significación o no del test. En la tabla II.1 se indican los estadísticos utilizados en la simulación, así como los valores significación,  $P_{K-S}$  encontrados en cada caso. Por razones obvias no se han tabulado los 60.000 valores generados aleatoriamente.

En análisis de la correlación entre las distintas parejas de variables, numerador y denominador, muestra un coeficiente de correlación ( $r$ ) siempre menor de 0.15.

Podemos comprobar como al ir aumentando la  $DSR_D$  del denominador, el cociente se aleja de la normalidad (disminuye  $P_{K-S}$ ), independientemente de la  $DSR_N$  y de los correspondientes valores medios del ambos numerador y denominador. Así, para todos los cocientes con  $DSR_D$  igual o inferior al 5%, se ajustan bien a una distribución normal, mientras que cuando  $DSR_D$  es superior al 10 %, no se pueden admitir que los cocientes de áreas sean normales.



Tabla.II.1. Niveles de significación para el test de K-S.

DENOMINADOR		NUMERADOR $\bar{A} = 100$					
		$S_R$ (DSR %)					
		1 (1)	2.5 (2.5)	5 (5)	7.5 (7.5)	10 (10)	15 (15)
$\bar{A}$	$S_R$ (DSR %)	VALORES P(%) TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV					
1000	150 (15)	0	0	0	0	0	0
	100 (10)	0	0	4	0	9	7
	50 (5)	31	23	85	91	54	72
	25 (2.5)	98	81	91	44	85	58
	10 (1)	71	40	91	96	69	95
750	112.5 (15)	0	0	0	0	0	0
	75 (10)	4	2	0	4	8	3
	37.5 (5)	9	32	58	31	35	41
	18.75 (2.5)	42	51	96	85	98	55
	7.5 (1)	80	95	95	60	85	87
500	75 (15)	0	0	0	0	0	0
	50 (10)	6	9	5	11	7	5
	25 (5)	40	39	65	81	83	42
	12.5 (2.5)	97	65	98	86	70	78
	5 (1)	89	41	99	71	55	67

Tabla.II.1. Continuación.

DENOMINADOR		NUMERADOR $\bar{A} = 100$					
200	30 (15)	0	0	0	0	0	0
	20 (10)	9	0	3	8	1	2
	10 (5)	79	56	77	65	48	35
	5 (2.5)	90	61	99	99	58	78
	2 (1)	98	98	99	89	67	95
150	22.5 (15)	0	0	0	0	0	0
	15 (10)	0	0	0	2	4	4
	7.5 (5)	31	66	56	63	85	45
	3.75 (2.5)	53	33	91	85	53	80
	1.5 (1)	85	64	57	89	29	56
100	15 (15)	0	0	0	0	0	0
	10 (10)	1	2	0	4	11	7
	5 (5)	22	41	71	43	31	28
	2.5 (2.5)	66	49	49	96	53	95
	1 (1)	95	99	66	31	68	32
75	11.25 (15)	0	0	0	0	0	0
	7.5 (10)	0	3	4	9	13	11
	3.75 (5)	48	64	34	80	90	65
	1.875 (2.5)	77	97	85	85	89	78
	0.75 (1)	92	97	99	87	96	93

Tabla.II.1. Continuación.

DENOMINADOR			NUMERADOR					$\bar{A} = 100$
50	7.5	(15)	0	0	0	0	0	0
	5	(10)	3	4	5	1	3	2
	2.5	(5)	57	14	55	21	74	35
	1.25	(2.5)	45	55	86	91	78	48
	0.5	(1)	93	85	86	98	97	99
25	3.75	(15)	0	0	0	0	0	0
	2.5	(10)	5	2	5	14	12	9
	1.25	(5)	35	70	47	67	94	38
	0.625	(2.5)	64	89	89	95	88	90
	0.25	(1)	95	91	96	98	100	95
10	1.5	(15)	0	0	0	0	0	0
	1	(10)	4	1	8	1	6	2
	0.5	(5)	22	19	23	81	47	35
	0.25	(2.5)	44	93	80	77	100	95
	0.1	(1)	85	100	85	87	99	99

*1.4.2.- Comprobación de la normalidad del cociente de áreas simuladas, (variables correlacionadas).*

Para el caso de la comprobación de la normalidad de los cocientes de parejas de valores correlacionados, cada pareja de variables, numerador y denominador, se generaron siempre a partir de las expresiones:  $(\mu_N + \sigma_N * \text{NOR})$  y  $(\mu_D + \sigma_D * (\text{NOR} + \text{NOI}))$ ; donde  $\mu_N$  y  $\mu_D$  indican las medias del numerador y denominador;  $\sigma_N$  y  $\sigma_D$  son sus correspondientes desviaciones estándar; NOR es una normal estándar,  $N(0,1)$ ; y NOI en una normal  $N(0,0.1)$  que se utiliza para introducir ruido en el denominador, ambas generadas aleatoriamente, de forma independiente para cada test. Todas la parejas de numeradores y denominadores así contruidos mostraban un coeficiente de correlación siempre superior a 0.99.

En esta experiencia se repitieron 60 cocientes, correspondientes a los denominadores de media 10, 100 y 1000, con los mismos valores de desviación estándar antes utilizados, tabla II.2. Se puede observar que la frontera en la significación se mantiene nuevamente en el intervalo de valores de  $\text{DSR}_D$  del 5-10% lo que implica que el hecho de que dos variables estén correlacionados no afecta a la normalidad de su cociente.

Tabla II.2. Niveles de significación para el test de K-S.

DENOMINADOR		NUMERADOR $\bar{A} = 100$				
		$S_R$ (DSR %)				
		1 (1)	2.5 (2.5)	5 (5)	7.5 (7.5)	10 (10)
$\bar{A}$	$S_R$ (DSR %)	VALORES P(%) TEST KOLMOGOROV-SMIRNOV				
1000	100 (10)	0	1	3	2	--
	50 (5)	14	31	--	28	11
	25 (2.5)	77	77	41	54	49
	10 (1)	94	82	77	85	85
100	10 (10)	0	0	3	7	--
	5 (5)	29	48	--	16	27
	2.5 (2.5)	89	98	71	61	49
	1 (1)	98	91	86	85	88
10	1 (10)	0	0	0	4	--
	0.5 (5)	18	28	--	19	18
	0.25 (2.5)	58	85	54	58	58
	0.1 (1)	91	68	85	90	87

### *1.4.3.- Comprobación de la normalidad del cociente de áreas experimentales.*

Para llevar a cabo la comprobación de la normalidad del cociente de áreas experimentales se cromatografiaron 60 muestras idénticas, según las condiciones instrumentales indicadas en el capítulo III). Estas muestras contenían los ésteres metílicos de 10 ácidos grasos, integrándose a continuación los picos cromatográficos a fin de obtener sus áreas y, a partir de ellas, los correspondientes cocientes. A cada cociente se le aplicó el test de K-S, obteniéndose en todos los casos conclusiones no significativas ( $P_{K-S} > 19\%$ ), lo que indicaba que los 9 cocientes experimentales se ajustaban a una distribución normal.

Paralelamente se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación entre los distintos numeradores (área de analito) y el denominador (área de patrón interno), resultando en todos los casos mayores de 0.8, excepto para el pico del oleato de metilo,  $C_{18:1}$ , tabla I.3. Cuando se analiza el comportamiento de la correlación encontrada es necesario tener en cuenta aspectos relacionados con el cromatograma y la forma de obtener el pico cromatográfico en el detector. Así las correlaciones más altas se obtuvieron para los dos picos que flanquean al patrón interno y la menor correlación fue para el pico correspondiente al oleato de metilo, este hecho es posiblemente debido a que sólo en esa zona del cromatograma los iones registrados en modo SIM (Single Ion Monitoring) son distintos al resto del cromatograma,

por lo que el ruido fondo es distinto y por tanto lo son también las fluctuaciones instrumentales.

### 1.5.- Conclusiones.

Las experiencias llevadas a cabo nos permiten concluir que aunque en una experiencia cromatográfica real, las áreas de pico del analito y del patrón interno están fuertemente correlacionadas, este hecho no implica que el cociente de ambas señales no se aproxime a una distribución normal, a menos que la desviación estándar relativa de la señal de patrón interno sea inferior al 5%. Esta conclusión es lógica, porque al dividir una normal  $N(\mu, \sigma)$  entre un número  $n$ , se obtiene otra variable normal  $N(\mu/n, \sigma/n)$ , y puesto que un número se puede considerar como una variable normal de desviación estándar igual a cero,  $N(\mu, 0)$ , es por tanto el valor de la desviación estándar del denominador el parámetro crítico para asegurar la normalidad de un cociente de variables normales y por consiguiente a medida que aumenta esta desviación estándar, el cociente se aleja de la normalidad.

Cuando se desea estimar la función de calibrado aplicando la regresión por mínimos cuadrados de los residuales, es necesario que las medidas de la señal de patrón interno tengan una suficiente precisión, a pesar de las fluctuaciones instrumentales. Para disminuir la variabilidad de la señal, reduciéndola a la puramente instrumental, es necesario que el patrón interno se adicione a la muestra inmediatamente antes de la inyección, sin

---

que sufra todas las operaciones previas que introducen una fuerte componente de error aleatorio. Ello implica que el patrón interno debe seleccionarse en la misma forma química en que va a ser cromatografiado.

En la tabla II.3, podemos comprobar que la señal del patrón interno, que se adiciona en forma de ácido graso y requiere sufrir, al igual que el resto de los analitos, el proceso de esterificación, muestra una baja precisión ( $RSD=7.8\%$ ) por lo que se obtienen algunos cocientes de áreas con distribuciones poco aproximadas a la normal. Posiblemente este resultado se hubiera mejorado si hubiésemos utilizado directamente como patrón interno tridecanoato de metilo, que se hubiera adicionado a la disolución de la muestra justo antes de la inyección. Si la  $DSR_{PI}$  es superior al 10%, conviene no utilizar el cociente de señales para establecer el calibrado, en este caso el calibrado se llevará a cabo directamente con las señales obtenidas de área (o altura) de pico.



**Tabla II.3.-** Parámetros estadísticos de los datos experimentales.

	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
$\bar{A}$	2.29	1.70	1.86	0.56	1.87	1.92	1.12	2.41	2.19	2.37
s	0.22	0.16	0.18	0.04	0.20	0.13	0.09	0.19	0.19	0.20
DSR	9.8	9.5	10.0	7.8	10.5	6.7	8.2	7.9	8.9	8.5
t <sub>R</sub>	3.3	4.5	5.4	5.8	6.3	7.0	7.7	7.8	8.6	9.6
r	0.87	0.80	0.95	---	0.95	0.86	0.74	0.86	0.91	0.91
P <sub>K-S</sub>	32.4	30.5	67.0	---	19.0	98.3	90.2	90.2	99.0	30.6

$\bar{A}$  ( $\times 10^{-8}$ ), área media; s ( $\times 10^{-8}$ ), desviación estándar del área media; **DSR** (%), desviación estándar relativa; t<sub>R</sub> (s), tiempo de retención; r, coeficiente de correlación entre las áreas de analito y patrón interno; P<sub>K-S</sub>, nivel de significación del test de K-S.

Para posteriores experiencias utilizaremos el cociente de áreas para establecer el calibrado, ya que la DSR<sub>P.I.</sub> que utilizo es en todos los casos inferior al 10%.

## **2.- MEDIDA DEL BLANCO CROMATOGRÁFICO. APLICACIÓN AL CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN RECOMENDADO POR LA IUPAC.**

### **2.1.- Introducción**

El calibrado correspondiente a un método cromatográfico se caracteriza por la ausencia de la señal analítica correspondiente al blanco, lo que implica que predicciones sobre la zona baja de la recta de calibrado puedan realizarse sobre valores extrapolados no controlados experimentalmente. Para evitar este hecho generalmente se introduce en la experiencia de calibrado puntos correspondientes a concentraciones de analito tan bajas como sea posible cuantificar, lo que rompe el diseño homogéneo de la experiencia del calibrado (concentraciones de patrón equidistantes). Este hecho dificulta la aplicación de contrastes estadísticos, p.e. linealidad<sup>20</sup>

---

<sup>20</sup>Analytical Methods Committee, *Analyst*, **119** (1994) 2363.

Por otro lado la ausencia de señal correspondiente al blanco imposibilita el cálculo del Límite de Detección (LD) de forma similar a la recomendada por la IUPAC para métodos espectroquímicos de análisis ( $LD(2) = 3 \cdot s_b/b$ )<sup>21</sup>, y por ello hay que recurrir a otros procedimientos: utilización de la relación señal/ruido<sup>22,23</sup> estudio de la mínima cantidad detectable<sup>24</sup>, uso del término independiente de la ecuación de calibrado<sup>25</sup>, cálculo por propagación de errores<sup>26</sup> o estimación aproximada por extrapolación de la recta de calibrado<sup>27</sup>.

Todos éstos métodos presentan ciertas dificultades de tipo práctico que determinan una gran arbitrariedad en su estimación. Así el cálculo basado en la relación señal/ruido, que posiblemente sea el más ampliamente utilizado, presenta el inconveniente de que no existen test estadísticos para la comparación de valores experimentalmente determinados de relación señal/ruido<sup>28</sup> y por tanto para poder comparar estadísticamente los límites de detección así calculados. La mínima cantidad detectable es un parámetro

---

<sup>21</sup>IUPAC, *Spectrochim. Acta B*, **33B** (1978) 242.

<sup>22</sup>H.H. Kaiser, *Anal. Chem.*, **42** (1970) 26A.

<sup>23</sup>M.A. Sharaf, D.L. Illman y B.R. Kowalski, *CHEMOMETRICS*, Wiley, New York, 1986.

<sup>24</sup>L.R. Snyder, *PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT*, Wiley, Chichester, 1988.

<sup>25</sup>J.N. Miller, *Analyst*, **116** (1991) 3.

<sup>26</sup>G.L. Long and J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 712A.

<sup>27</sup>L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares and M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **26** (1993) 1243.

<sup>28</sup>R.R. Williams, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 1638.

---

difícil de determinar, requiere de la misma relación señal/ruido, y tampoco hay estudios dirigidos a establecer su significación estadística. La propagación de errores provoca sobreestimaciones del valor del límite de detección y el uso del término independiente de la ecuación de calibrado implica la pérdida de todo el sentido probabilístico de la definición de la IUPAC <sup>29</sup>. La estimación basada en consideraciones extrapoladas del dominio experimental del calibrado es tiene los problemas derivados de este hecho.

A continuación proponemos un método para hacer posible la medida de la señal correspondiente al "blanco" cromatográfico, con el fin de incluir la señal del blanco entre los datos obtenidos para el establecimiento del calibrado. La señal del "blanco" se obtiene por integración directa del ruido de fondo utilizando como límites de integración el valor extrapolado de anchura de pico a concentración "cero". Para ello es necesario obtener la variación de anchura de pico con respecto a la concentración de analito. Las señales medidas del "blanco" deben de ser lineales con el resto de los datos. Con los datos obtenidos, se puede calcular un valor del límite de detección, siguiendo un modelo similar al recomendado por la IUPAC para métodos espectroscópicos de análisis.

Nos proponemos establecer un procedimiento para cuantificar la señal

---

<sup>29</sup> M.C. Ortiz and L.A. Sarabia in R. Cela (Editor), *AVANCES EN QUIMIOMETRÍA PRÁCTICA*, Univ. of Santiago de Compostela, Spain, 1994. Ch. 5, p. 189.

del blanco a partir del ruido de fondo de la línea base del cromatograma. Este se obtiene por integración de un intervalo equivalente a la anchura de la base del pico que se obtendría para una concentración cero de analito, centrado sobre el valor de tiempo de retención al que éste eluye. Para llevar a cabo la metodología propuesta es imprescindible el uso de "software" adecuado para adquisición y tratamiento de las señales cromatográficas.

## 2.2.- Cálculo de la anchura de base, $W_b$ .

La anchura de base de un pico cromatográfico,  $W_b$ , se puede determinar directamente en el cromatograma estimando sus tiempos inicial y final en función de los parámetros de integración previamente seleccionados. Obviamente, este método está afectado de un importante error aleatorio, ya que las observaciones se realizan en una zona en la que la incertidumbre causada por el ruido fondo interfiere en gran medida<sup>30,31</sup>.

Para evitar este inconveniente, proponemos medir un parámetro libre de la aleatoriedad del ruido fondo, como es la anchura a mitad de pico,  $W_{0.5h}$ , y a partir de este valor calcular  $W_b$ . Para ello, tomamos la aproximación de considerar que el pico cromatográfico tiene un perfil Gaussiano<sup>32</sup>.

---

<sup>30</sup> S.N. Cheslar and S.P. Cram, *Anal. Chem.* **43** (1971) 1922

<sup>31</sup> W.W. Yau, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 395.

<sup>32</sup> A. Klinkenberg and F. Sjenitzer, *Chem. Eng. Sci.*, **5** (1956) 258.

Actualmente está ampliamente aceptado que, debido a la asimetría de los picos cromatográficos reales, estos se caracterizan mejor utilizando el modelo basado en la Gaussiana exponencialmente modificada (EMG)<sup>33,34</sup> y el asumir el modelo Gaussiano puede introducir errores en el cálculo de parámetros usados en la caracterización de picos cromatográficos<sup>35</sup>. Sin embargo, siempre que la asimetría del pico no sea excesiva, los errores cometidos en la determinación de parámetros tales como area de pico o varianza no son excesivos<sup>36</sup> y pueden ser asumidos en virtud de una mayor sencillez en el cálculo.

Partiendo de la expresión de una Gaussiana, adaptada al caso de parámetros cromatográficos:

$$h = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(t - t_R)^2}{\sigma^2}}$$

donde  $h$  es la altura de pico al tiempo  $t$ ,  $t_R$  es el tiempo de retención y  $\sigma$  es la varianza del pico. Aplicando a la expresión anterior los parámetros de pico correspondientes, ver figura II.2,

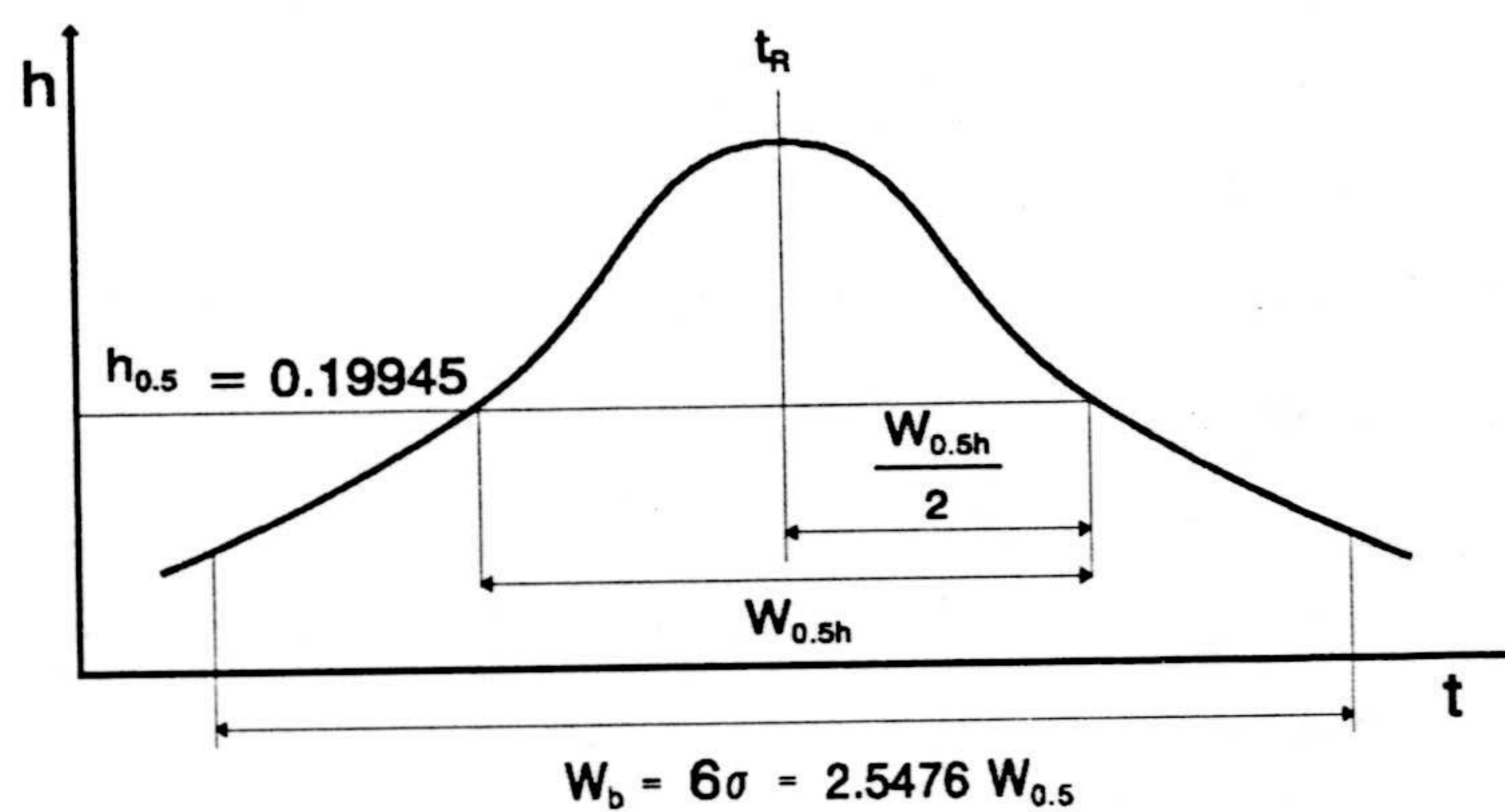
---

<sup>33</sup> H.M. Gladney, B.F. Dowden and J.D. Swalen, *Anal. Chem.*, **41** (1969) 883.

<sup>34</sup> R.E. Pauls and L.B. Rogers, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 625.

<sup>35</sup> J.P. Foley and J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 730.

<sup>36</sup> J.P. Foley, *Anal. Chem.*, **59**, (1987) 1984.



**Figura II.2.-** Parámetros característicos de un pico Gaussiano.  $W_b$ , anchura de la base del pico;  $W_{0.5h}$ , anchura de pico a mitad de altura;  $h_{0.5}$ , altura a mitad de pico;  $t_R$ , tiempo de retención;  $\sigma$ , varianza de pico.

se demuestra que la varianza viene dada por la expresión (17):

$$\sigma = \frac{W_{0.5h}}{2} \sqrt{\frac{1}{2 \ln \frac{1}{\sqrt{2\pi} h_{0.5}}}}$$

donde  $W_{0.5h}$  indica la anchura a mitad de pico y  $h_{0.5}$  es la mitad de la altura del pico Gaussiano, que vale 0.1995.

Finalmente si se calcula  $W_b$  para un 99.73% del área del pico, ésta vendrá dada por un valor igual a  $6\sigma$ <sup>37</sup>:

$$W_b = 6\sigma = 2.548 W_{0.5h}$$

### 2.3.- Cálculo de la anchura de base a concentración "cero", $W_{bo}$

Puesto que las dimensiones de un pico cromatográfico, altura y anchura, dependen de la concentración de analito, se puede determinar el valor de la anchura correspondiente a concentración "cero" extrapolando la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de  $W_{0.5h}$  de diferentes picos frente a las correspondientes concentraciones de analito.

---

<sup>37</sup> N. Dyson, *CHROMATOGRAPHIC INTEGRATION METHODS*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990.



Los correspondientes valores de  $W_{bo}$  se pueden calcular aplicando la expresión anterior.

#### **2.4.- Medida de la señal del "blanco" cromatográfico**

La señal del blanco para cada analito se puede determinar por integración sobre la línea del cromatograma del blanco en el intervalo  $t_R \pm 0.5W_{bo}$  donde  $t_R$  indica el tiempo de retención correspondiente a cada analito. La obtención de cada medida experimental, para realizar réplicas, requiere una nueva inyección y el establecimiento de un nuevo cromatograma.

#### **2.5.- Test para la señal medida del "blanco" cromatográfico**

Para comprobar que los valores medidos son coherentes con el resto de la señales obtenidas para establecer el calibrado, es necesario obtener una conclusión "no significativa" cuando se realiza el test de "fallo de ajuste" sobre los datos completos. La realización del test requiere que el calibrado se haya establecido con réplicas<sup>20</sup> aunque en caso de que esto no sea posible, se pueden utilizar la regresión robusta para detectar si la señal del blanco de

aparta de la recta de calibrado <sup>38,39</sup>.

## 2.6.- Desarrollo experimental.

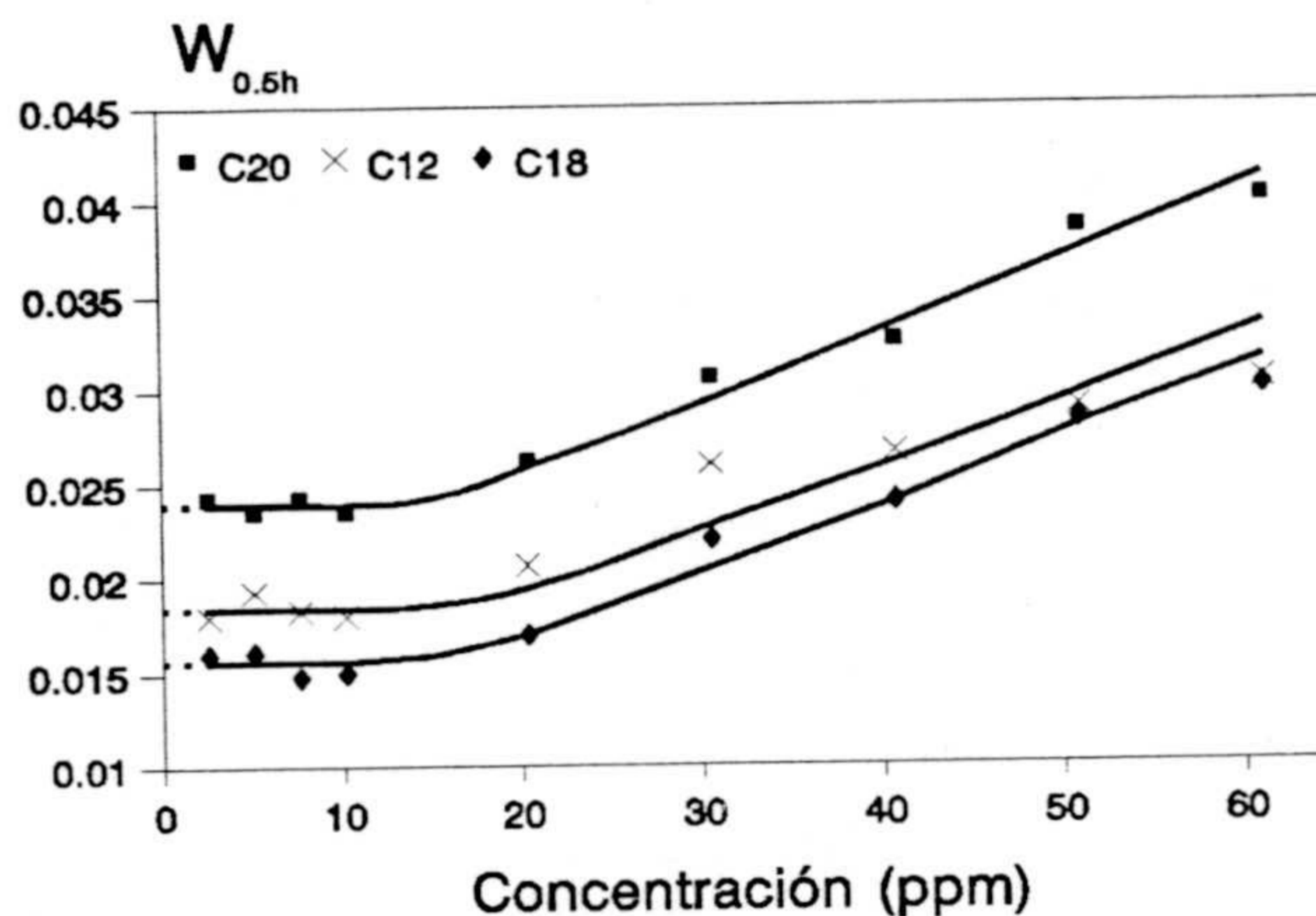
En las Figura II.3 se muestran las curvas que se obtuvieron cuando se representa la altura a mitad de pico,  $W_{0.5h}$ , en función de la concentración de los ésteres metílicos de los ácidos láurico, esteárico, aráquico, mientras que en la tabla II.4 se indican los valores de  $W_{0.5h}$  a concentración "cero" determinados para los tres analitos, los correspondientes  $W_{b0}$  calculados y los intervalos de integración para la obtención de la señal del blanco.

**Tabla II.4.-** Valores de  $W_{0.5h}$  y  $W_{b0}$  extrapolados a "concentración cero".

Éster Metílico	$W_{0.5h}$	$W_{b0}$	$t_R \pm 0.5W_{b0}$
Ácido Láurico	0.0194	0.0494	$5.401 \pm 0.025$
Ácido Esteárico	0.0155	0.0396	$7.671 \pm 0.020$
Ácido Behénico	0.0240	0.0610	$9.503 \pm 0.031$

<sup>38</sup> D.L. Massart, L. Kaufman, P.J. Rousseeuw and A. Leroy. *Anal. Chim. Acta*, **187** (1986) 171.

<sup>39</sup> M.C. Ortiz, J. Arcos, J.V. Juarros, J. López-Palacios and L.A. Sarabia, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 678.



**Figura II.3.-** Representación de la altura a mitad de pico,  $W_{0.5h}$ , en función de la concentración de los ésteres metílicos de los ácidos láurico, esteárico y aráquico.

Con el fin de evitar la multiplicidad en el número de inyecciones del blanco, cabe la posibilidad realizar todas las las medidas (para todos los analitos) sobre un único cromatograma. Para ello, se obtienen las distintas medidas para cada analito integrando con anchura de base correspondiente a diferentes tiempos de retención a lo largo del mismo blanco cromatográfico. Esta operación se repite para cada analito.

Esta determinación sólo será válida si la intensidad del ruido de fondo permanece constante a lo largo del cromatograma y éste no presenta deriva. Con el fin de comprobar la validez de la metodología descrita, realizamos un estudio experimental basado en un diseño en "cuadrados latinos"<sup>40,41</sup>, perteneciendo éste al grupo de diseños aleatorizados con más de una variable bloque. Básicamente se emplea este tipo de diseño cuando necesitamos evaluar independientemente del error aleatorio, dos fuentes de variabilidad del bloque. Nuestra variable bloque serían las diferentes inyecciones del blanco, mientras que las fuentes de variabilidad a controlar dentro de cada bloque serían las diferentes anchuras a concentración cero y los diferentes tiempos de retención de cada analito. Para hacer esto construimos la tabla II.5. donde se indica la estructura del diseño, así como los valores de áreas medidos (se han realizado 3 réplicas de cada medida experimental).

---

<sup>40</sup> G.E.P. Box, W.G. Hunter and J.S. Hunter, *Estadística para investigadores*. Reverté, Barcelona (1989).

<sup>41</sup> D.C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica, Mexico (1991).

**Tabla II.5.-** Áreas de los "blancos cromatográficos" calculadas para el diseño de cuadrados latinos.

		$W_{b0}(L)$		$W_{b0}(E)$		$W_{b0}(A)$
Blanco 1	$t_R(L)$	154290	$t_R(E)$	78590	$t_R(A)$	239300
		177950		64650		253540
		226680		78100		238100
Blanco2	$t_R(E)$	106260	$t_R(A)$	102270	$t_R(L)$	281760
		101110		131260		309720
		125780		109120		383920
Blanco 3	$t_R(A)$	187650	$t_R(L)$	121550	$t_R(E)$	125250
		150650		149270		122280
		164920		207130		214660

$W_{b0}$ , anchura de base de pico a "concentración cero";  $t_R$ , tiempo de retención; **L**, **E** y **A** son los ésteres metílicos de los ácidos láurico, esteárico y aráquico, respectivamente.

El análisis de la varianza (ver tabla II.6) de los datos indicados en la tabla II.5 da como resultado que existen diferencias claramente significativas entre las áreas medidas para un mismo analito a diferentes tiempos de retención ( $P < 0.5$ ).

**Tabla II.6.-** Análisis de la varianza de los datos de la tabla I.2.

Parámetro	S.C.	g.l.	C.M.	F-ratio	p
Blanco	0.00245	2	0.00123	0.949	0.404
Anchura	0.07370	2	0.03685	28.520	0.000
Tiempo	0.05550	2	0.02775	21.477	0.000
Residual	0.02584	20	0.00130		
Total	0.15750	26			

**S.C.**, suma de cuadrados; **g.l.**, grados de libertad; **C.M.**, cuadrado medio; **F-ratio**, relación de cada cuadrado medio con el cuadrado medio residual; **P**, nivel de significación.

Cuando por medio del análisis de la varianza se acepta la hipótesis alterna, únicamente podemos decir que al menos una de las medias difiere del resto, pero no sabemos cual. Mediante la aplicación del método de Tukey<sup>40,42</sup> (test de comparaciones múltiples) a parejas de medias, se sabrá cuales difieren del resto. Este test consiste básicamente en lo siguiente:

a) Planteamiento del test:

$$H_0 \equiv \mu_i = \mu_j \text{ (las medias } i \text{ y } j \text{ son iguales)}$$

$$H_1 \equiv \mu_i \neq \mu_j \text{ (las medias } i \text{ y } j \text{ son distintas)}$$

---

<sup>42</sup> A. Martín Andrés and J.D. Luna del Castillo, *Bioestadística para las Ciencias de la Salud* (3ª Ed.). Norma, Madrid (1990).

b) Estadístico de contraste calculado:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_i - \bar{x}_j|}{\sqrt{\frac{2s_D^2}{n}}}$$

c) Estadístico de contraste tabulado:

$$t_{tab} \alpha = 0.05 (f, K)$$

$x_i, x_j$  : pareja de medias comparadas.

$s_D^2$  : varianza dentro de grupos.

$n$  : tamaño muestral.

$f$  : grados de libertad para  $s_D^2$ .

$K$  : número de medias comparadas.

d) Conclusiones del test:

$$H_0 \equiv t_{cal} < t_{tab}$$

$$H_1 \equiv t_{cal} \geq t_{tab}$$

---

este test se realizó y como conclusión se obtuvo que había diferencias entre las comparaciones de todas las parejas de áreas(21,22).

En nuestro caso concreto, al haber diferencias significativas entre tiempos, no basta con utilizar un único cromatograma para cuantificar todos los blancos y es necesario hacer tantas inyecciones como réplicas. No obstante, este resultado no es extrapolable a todos los sistemas y por ello debería comprobarse en cada caso.

Los distintos calibrados se establecieron partiendo de disoluciones patrón uniformemente equiespaciadas de los correspondientes ácidos grasos, previa esterificación con trifluoruro de boro. La señal analítica se tomó a partir del cociente entre las áreas del analito y del patrón interno (disolución de ácido tridecanóico en una concentración de 10 ppm). Se utilizaron 2 réplicas y 3 inyecciones para cada concentración de analito. A los datos obtenidos se le añadieron las correspondientes señales del "blanco cromatográfico" de 6 diferentes cromatogramas obtenidos en la misma forma a partir de disoluciones de concentración "cero" de analito .



Tabla II.7.- Señales analíticas obtenidas para las tres curvas de calibrado.

Ácido láurico		Ácido esteárico		Ácido aráquico	
ppm	señal	ppm	señal	ppm	señal
0.000	0.0013	0.0000	0.0004	0.0000	0.0011
0.000	0.0011	0.0000	0.0006	0.0000	0.0014
0.000	0.0011	0.0000	0.0008	0.0000	0.0002
0.000	0.0008	0.0000	0.0003	0.0000	0.0013
0.000	0.0009	0.0000	0.0004	0.0000	0.0002
0.000	0.0010	0.0000	0.0005	0.0000	0.0013
0.252	0.2230	0.3140	0.3210	0.2600	0.1520
0.252	0.2280	0.3140	0.3280	0.2600	0.1540
0.252	0.2310	0.3140	0.3210	0.2600	0.1530
0.252	0.2100	0.3140	0.2960	0.2600	0.1350
0.252	0.2120	0.3140	0.3150	0.2600	0.1560
0.252	0.2080	0.3140	0.3230	0.2600	0.1390
0.504	0.4290	0.6280	0.5790	0.5200	0.2970
0.504	0.4310	0.6280	0.5540	0.5200	0.2930
0.504	0.4320	0.6280	0.6090	0.5200	0.3130
0.504	0.4470	0.6280	0.6060	0.5200	0.3420
0.504	0.4520	0.6280	0.5940	0.5200	0.2930
0.504	0.4440	0.6280	0.6510	0.5200	0.3350

Tabla II.7.-Continuación.

Ácido láurico		Ácido esteárico		Ácido aráquico	
ppm	señal	ppm	señal	ppm	señal
0.756	0.6660	0.9420	0.9010	0.7800	0.4850
0.756	0.6700	0.9420	0.8940	0.7800	0.4730
0.756	0.6710	0.9420	0.9220	0.7800	0.5130
0.756	0.6510	0.9420	0.8860	0.7800	0.4800
0.756	0.6580	0.9420	0.8810	0.7800	0.4620
0.756	0.6620	0.9420	0.8330	0.7800	0.4630
1.008	0.8730	1.2560	1.2170	1.0400	0.6660
1.008	0.8820	1.2560	1.1810	1.0400	0.6340
1.008	0.8850	1.2560	1.2310	1.0400	0.6690
1.008	0.8930	1.2560	1.1950	1.0400	0.6490
1.008	0.8970	1.2560	1.1720	1.0400	0.6510
1.008	0.8910	1.2560	1.1840	1.0400	0.6400

Los parámetros estadísticos correspondientes de cada calibrado se indican en la tabla II.8. Los valores de la desviación estándar a concentración "cero" han sido calculados a partir de los datos del calibrado utilizando la ecuación correspondiente derivada de la regresión lineal.

**Tabla II.8.-** Parámetros estadísticos de los calibrados mostrados en la tabla II.7.

Parámetro Estadístico	Ácido láurico	Ácido esteárico	Ácido aráquico
$s (\times 10^2)$	0.789	2.312	1.559
$a (\times 10^3)$	-1.447	7.666	-8.050
$s_a (\times 10^3)$	2.495	7.340	4.932
$b$	0.879	0.943	0.628
$s_b (\times 10^3)$	4.042	9.544	7.744
$P_{LOF}$	63.8%	27.7%	14.3%
$S_{C0} (\times 10^2)$	0.463	1.289	1.274

$s$ , desviación estándar de los residuales;  $a$ , término independiente;  $s_a$ , desviación estándar del término independiente;  $b$ , pendiente;  $s_b$ , desviación estándar de la pendiente;  $P_{LOF}$ , nivel de significación del test de fallo de ajuste;  $s_{C0}$ , desviación estándar a "concentración cero".

---

El cálculo de límite de detección recomendado por la IUPAC para métodos espectroscópicos se basa en suponer que una señal analítica de intensidad 3 veces superior a la variabilidad propia de la señal a concentración "cero" es propia de la presencia de analito. Esta variabilidad se calcula dividiendo la desviación de la señal del blanco entre la pendiente (para transformar señal en concentración). Sin embargo, la variabilidad calculada utilizando el modelo propuesto en este trabajo mide la variabilidad de ruido de fondo que será distinta a la correspondiente a la señal analítica. Por esta razón, es necesario calcular la desviación estandar a concentración "cero" a partir de las ecuaciones propias de la regresión que presupone homocedasticidad en las varianzas y, por tanto, permite obtener un valor que predice mejor la variabilidad del blanco.

En la tabla II.9 se indican diferentes valores del límite de detección calculados aplicando el modelo propuesto en este trabajo, y se comparan con los obtenidos por el método aproximado y a partir de la relación señal ruido.

**Tabla II.9.-** Límites de detección calculados con diferentes modelos

Modelo	Ácido láurico	Ácido esteárico	Ácido aráquico
Aproximado <sup>a</sup>	0.029	0.080	0.073
S/N <sup>b</sup>	0.136	0.129	0.119
Propuesto por nosotros	0.014	0.039	0.038

<sup>a</sup> calculado mediante la ecuación (3) de la referencia (8)

<sup>b</sup> calculado a partir de tres veces la señal del ruido de fondo.

Podemos comprobar que los límites de detección calculados a partir de S/N son bastante superiores a los calculados por los otros modelos. Este resultado es obvio, ya que este límite está calculado a partir de alturas de pico y dado que la base permanece constante a bajas concentraciones de analito (ver fig II.3), el pico aparecerá como una ancha banda difícil de identificar, ya que la diferencia de altura con respecto al ruido será muy pequeña. Por esta razón se necesitan relativamente altas concentraciones de analito para diferenciar visualmente un pico del ruido de fondo.

Sin embargo, el detector si es capaz de discernir areas de pico con respecto al ruido con valores de concentración de analito mucho más bajas. Los límites de detección estadísticos calculados por los otros dos modelos

responden a este razonamiento y por ello toman valores menores. Las diferencias observadas entre estos dos valores se deben únicamente a la forma de calcular las correspondientes desviaciones estándar a concentración "cero", pero mientras que en el método aproximado nosotros calculamos un valor extrapolado fuera del dominio experimental de la experiencia de calibrado, el límite de detección calculado por el modelo propuesto en este trabajo se encuentra incluido en dicho dominio.

## **CAPÍTULO III**

# **DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**





En este capítulo se aborda el estudio de las distintas etapas a optimizar en la puesta a punto del método analítico para la determinación de los ácidos grasos seleccionados, mediante cromatografía de gases con detector de masas. El estudio realizado se integra en los siguientes apartados:

- 1.- Esterificación de los ácidos grasos.
- 2.- Optimización de parámetros instrumentales.
- 3.- Establecimiento del método analítico.



## **1.- ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.**

### **1.1.- Introducción.**

Como se ha indicado en la introducción, para el análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases, es conveniente llevar a cabo una derivatización previa. De todas las posibles reacciones de derivación expuestas en la introducción hemos seleccionado para su aplicación práctica las que dan como producto final el correspondiente éster metílico, y de todos los posibles agentes esterificantes existentes para obtenerlos hemos elegido por su sencillez experimental el hidróxido de trimetilamonio (TMAH) y el trifluoruro de boro ( $F_3B$ ). A continuación se describe detalladamente el estudio comparativo realizado para comprobar cual de los dos reactivos seleccionados ofrece resultados de mayor calidad analítica.

## 1.2.- Esterificación con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH).

### 1.2.1.- *Procedimiento operatorio.*

En un tubo de ensayo de 10 mL se introducen 100 mg de muestra, a continuación se agregan 3 mL de éter etílico y 200 $\mu$ L de disolución metanólica de TMAH al 20%. La mezcla se agita un minuto para homogeneizar, tras lo cual se añade una gota de azul de timol (0.1 % en metanol). La disolución tomará una coloración azulada. Se neutraliza con disolución metanólica de ácido clorhídrico 0.2M, en el punto de equivalencia, la disolución tomará a color amarillo. A continuación se agrega 0.5 mL de metanol, se transfiere a un vial de inyección y se registra el cromatograma en las condiciones cromatográficas descritas en la página **168**. Para establecer su repetitividad se repitió la experiencia diez veces. Las respuestas instrumentales y sus correspondientes DSR están indicadas en la tabla III.1.

**Tabla III.1.-** Cocientes obtenidos en el estudio de la repetitividad de la esterificación con TMAH.

E	ÉSTERES METÍLICOS								
	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
1	4.41	0.59	0.99	1.37	0.76	1.01	3.46	0.88	1.16
2	3.82	1.06	0.69	0.92	0.99	1.44	3.10	0.87	1.24
3	3.11	1.03	0.95	0.81	0.72	0.98	2.15	0.96	1.73
4	2.99	0.72	1.35	1.14	1.24	0.80	2.56	1.00	1.64
5	4.99	0.94	0.87	1.35	0.94	1.49	3.04	0.90	1.69
6	3.98	0.91	1.11	1.18	1.44	1.00	1.95	0.89	1.15
7	4.59	0.79	1.10	0.88	0.95	1.04	4.13	1.32	1.31
8	3.28	0.92	0.76	1.56	1.14	1.17	2.95	0.89	1.81
9	4.06	1.07	0.74	0.95	1.10	0.75	3.80	0.63	2.15
10	4.19	0.90	0.66	1.45	0.95	1.42	3.35	1.05	1.50
<b>DSR</b>									
%	16.6	17.0	24.0	22.7	21.0	23.5	22.6	18.2	21.1

E, número de la esterificación; **DSR %**, desviación estándar relativa de la respuesta.

En la figura III.1 se muestra el cromatograma típico obtenido, en él puede apreciarse la aparición de una serie de picos fantasma, justamente al lado del correspondiente pico del éster metílico. Estos picos fantasma son

debidos a diferentes productos secundarios derivados del exceso de TMAH y a la presencia de ácidos grasos sin esterificar, lo que indica la falta de cuantitividad en el proceso de esterificación.

Por otra parte el estudio estadístico realizado pone de manifiesto elevados valores de DSR en todos los casos.

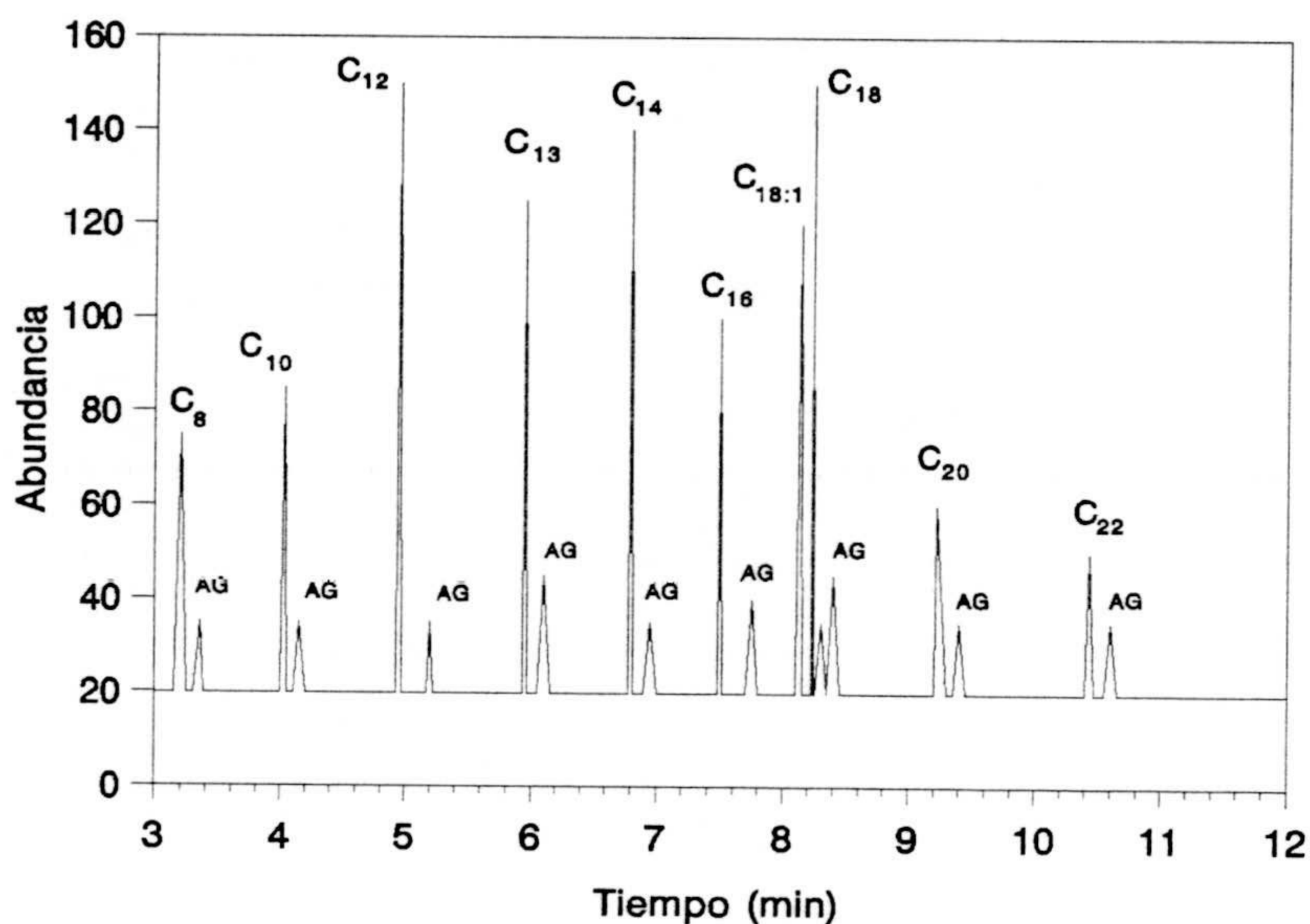


Figura III.1.- Cromatograma característico al esterificar con TMAH.

AG, corresponde a cada ácido graso sin esterificar.

### 1.3.- Esterificación con trifluoruro de boro ( $F_3B$ ).

#### 1.3.1.- Procedimiento operatorio.

En un tubo de ensayo de 25 mL se introducen 6 mL de disolución metanólica de ácidos grasos y se agregan 2 mL de disolución de trifluoruro de boro en metanol al 14%. A continuación se calienta la mezcla a 70°C en un baño maría durante 3 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se le agregan 10 mL de agua para enfriar y parar la reacción. Para cambiar a un medio orgánico adecuado para su posterior inyección, agregamos 4 mL de cloruro de metileno para extraer los ésteres metílicos formados. Se agita el tubo de ensayo durante un minuto en un agitator. Esperamos un tiempo prudencial hasta que se separen las fases, procediendo a continuación a retirar el cloruro de metileno, mediante una pipeta Pasteur. Se repite la extracción una vez más y la mezcla de los dos extractos se seca con sulfato sódico anhidro. El extracto seco se lleva a 10 mL, quedando una disolución de ésteres metílicos lista para su inyección en el cromatógrafo de gases.

En la figura III.2 se muestra el cromatograma típico, en el que puede apreciarse la ausencia de picos correspondientes a los ácidos grasos libres.

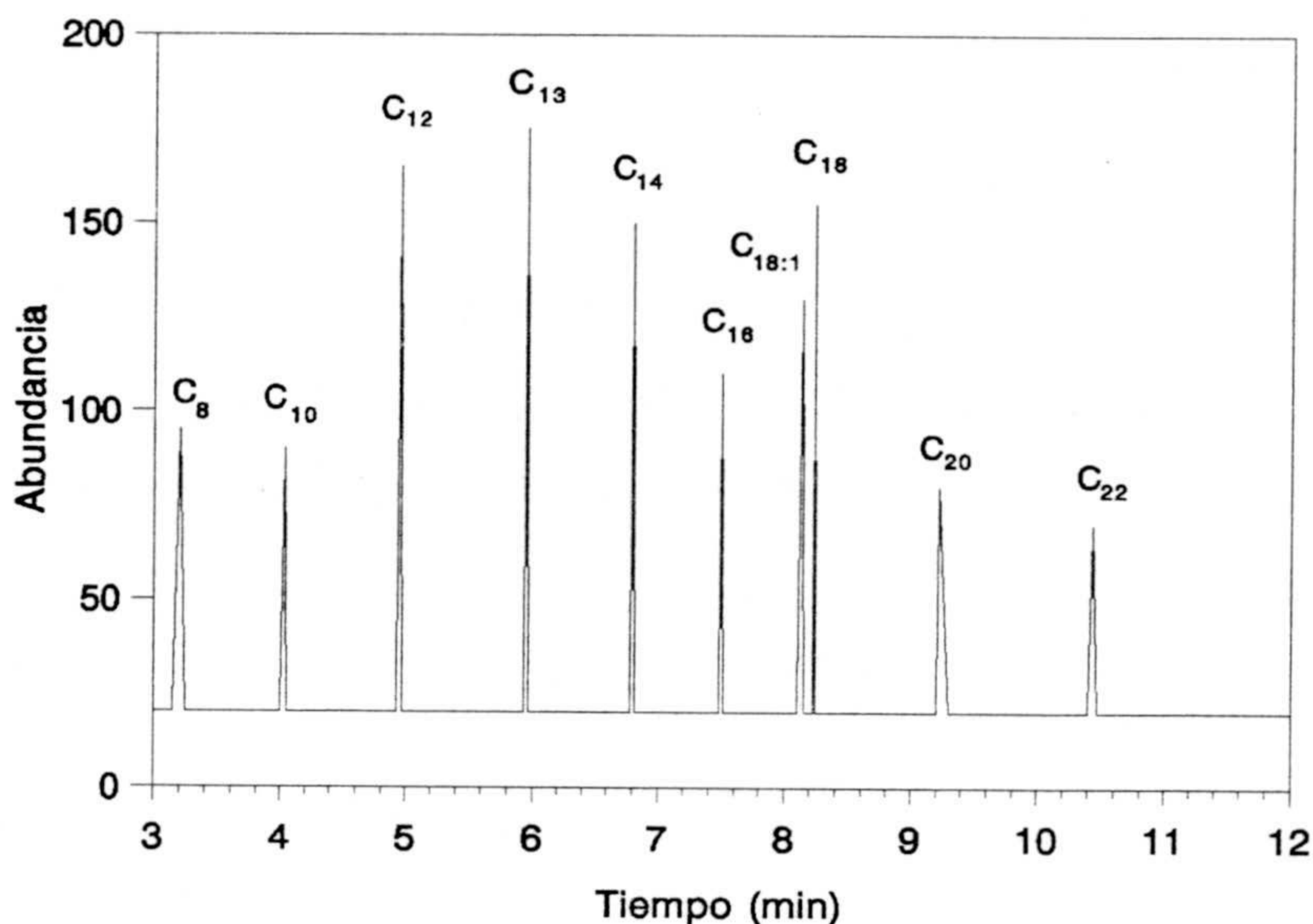


Figura III.2.- Cromatograma característico al esterificar con  $\text{BF}_3$ .

A la vista de las aparentes buenas características cromatográficas de este proceso de esterificación y con el fin de comprobar su repetitividad, se ha planteado la siguiente experiencia. Se prepara una disolución metanólica con una concentración individual en cada ácido graso y en patrón interno de 1ppm. Se tomaron diez alícuotas de esta disolución y cada una se esterificó por separado siguiendo el método descrito anteriormente. A continuación se hicieron tres inyecciones, el volumen inyectado en cada ocasión fue de  $2\mu\text{L}$ . Posteriormente se integraron los picos cromatográficos, y se obtuvieron los



correspondientes cocientes entre el área de cada éster metílico y el área del patrón interno. Con estos cocientes se procedió a realizar los cálculos necesarios.

Con objeto de analizar si existen diferencias entre las áreas obtenidas en las diferentes esterificaciones, y para separar esta variabilidad, de la variabilidad propia del proceso cromatográfico, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa informático STATGRAPHICS v 6.0. Para realizar este análisis se clasificaron las inyecciones en diez grupos (un grupo por esterificación), conteniendo cada grupo tres réplicas (inyecciones). De esta forma el análisis de la varianza puede discriminar la variabilidad debida a la esterificación (variabilidad entre grupos), de la variabilidad instrumental (variabilidad dentro de grupos). A continuación con estas dos variabilidades (varianzas), se realizó el test de la F de Snedecor (pagina nº ). Si de su aplicación se deduce que  $P > 5\%$  se concluye por la hipótesis nula, es decir, que todas las áreas medias obtenidas en las diferentes esterificaciones son iguales. Si  $P < 5\%$  concluiremos por la hipótesis alterna, es decir, al menos el área media de una esterificación es significativamente diferente del resto. En la tabla III.2 se muestran los resultados obtenidos y en la tabla III.3 se recoge el análisis de la varianza de cada éster metílico.

**Tabla III.2.-** Cocientes obtenidos en el estudio de la repetitividad de la esterificación con F<sub>3</sub>B.

E	I	ÉSTERES METÍLICOS								
		C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
1	1	4.15	0.84	0.96	1.08	1.10	1.14	3.12	0.95	1.47
	2	4.19	0.84	0.95	1.11	1.14	1.12	3.09	0.97	1.50
	3	4.13	0.84	0.96	1.10	1.14	1.13	3.04	0.99	1.52
2	1	4.20	0.82	0.94	1.08	1.13	1.11	3.19	1.00	1.50
	2	4.18	0.83	0.93	1.07	1.14	1.11	3.11	1.00	1.48
	3	4.12	0.85	0.96	1.09	1.15	1.11	3.04	1.04	1.53
3	1	4.14	0.83	0.95	1.07	1.09	1.10	3.10	1.01	1.45
	2	4.11	0.85	0.97	1.07	1.09	1.12	3.11	0.99	1.46
	3	4.12	0.84	0.96	1.05	1.10	1.13	3.13	1.01	1.48
4	1	4.20	0.85	0.96	1.11	1.13	1.11	3.13	1.01	1.55
	2	4.15	0.83	0.95	1.09	1.13	1.12	3.08	1.00	1.54
	3	4.06	0.82	0.96	1.09	1.12	1.12	3.08	1.00	1.52
5	1	4.14	0.85	0.96	1.10	1.13	1.12	3.18	0.98	1.50
	2	4.20	0.84	0.94	1.09	1.10	1.12	3.13	1.01	1.50
	3	4.19	0.84	0.95	1.09	1.11	1.12	3.17	1.00	1.48

Tabla III.2.- Continuación.

E	I	ÉSTERES METÍLICOS								
		C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
6	1	4.18	0.81	0.94	1.08	1.10	1.11	3.16	1.00	1.47
	2	4.11	0.86	0.94	1.09	1.10	1.11	3.15	0.98	1.47
	3	4.17	0.83	0.94	1.11	1.16	1.14	3.17	1.07	1.56
7	1	4.12	0.84	0.93	1.08	1.10	1.11	3.20	0.99	1.48
	2	4.19	0.83	0.94	1.08	1.11	1.11	3.20	0.93	1.45
	3	4.14	0.82	0.95	1.10	1.14	1.13	3.08	1.01	1.49
8	1	4.23	0.83	0.94	1.09	1.10	1.10	3.13	0.99	1.44
	2	4.05	0.82	0.95	1.07	1.11	1.12	3.10	1.04	1.47
	3	4.08	0.82	0.95	1.10	1.15	1.14	3.09	1.00	1.55
9	1	4.13	0.84	0.96	1.10	1.11	1.14	3.21	1.03	1.52
	2	4.12	0.84	0.95	1.09	1.12	1.13	3.09	1.02	1.50
	3	4.14	0.83	0.97	1.10	1.13	1.11	3.23	1.03	1.50
10	1	4.17	0.82	0.95	1.07	1.14	1.13	3.20	1.02	1.53
	2	4.19	0.82	0.95	1.10	1.14	1.11	3.12	1.03	1.50
	3	4.12	0.78	0.93	1.11	1.12	1.12	3.07	1.01	1.53

E, número de la esterificación; I, número de la inyección.

**Tabla III.3.-** Análisis de la varianza sobre el proceso de esterificación.

ÉSTER METÍLICO	S. C. (10 <sup>3</sup> )		G.L.		Varianza (10 <sup>4</sup> )		F- ratio	P (%)
	E. G.	D. G.	E	D	E. G.	D. G.		
Ácido Caprílico	9.253	45.66	9	20	10.28	22.83	0.450	89
Ácido Cáprico	2.945	3.706	9	20	3.271	1.853	1.766	14
Ácido Laurico	1.709	1.964	9	20	1.899	0.982	1.934	11
Ácido Mirístico	2.650	3.092	9	20	2.945	1.546	1.905	11
Ácido Palmítico	4.601	6.608	9	20	5.112	3.304	1.547	20
Ácido Estearico	0.811	2.885	9	20	0.901	1.443	0.624	76
Ácido Oléico	27.54	48.97	9	20	30.60	24.49	1.250	32
Ácido Aráquico	9.303	12.98	9	20	10.34	6.490	1.593	19
Ácido Behénico	11.45	18.42	9	20	12.72	9.210	1.381	26

S.C., suma de cuadrados; G. L., grados de libertad; E y E. G., entre grupos (entre esterificaciones); D y D. G., dentro de grupos; F-ratio, relación de varianzas para la realización del test de Snedecor; P, nivel de significación del test.

La observación de valores  $P > 5\%$  para cada éster metílico nos permite concluir por la hipótesis nula en todos los casos. Por tanto las áreas medias de las diferentes esterificaciones son iguales. Este hecho nos permite afirmar que el proceso de esterificación es repetitivo, ya que el rendimiento de esta reacción es siempre el mismo.

#### **1.4.- Conclusiones.**

La comparación de los cromatogramas y el estudio de repetitividad realizado ponen de manifiesto que el procedimiento de esterificación basado en la utilización del trifluoruro de boro en medio metanólico, conduce a una esterificación limpia (no aparece ningún pico fantasma), rápida y repetitiva como hemos comprobado anteriormente. Por estas razones lo adoptamos para a derivatización de los ácidos grasos objeto de esta memoria.



En este apartado vamos a estudiar en primer lugar los principales parámetros instrumentales que afectan al método cromatográfico, y a continuación los parámetros instrumentales que afectan al espectrómetro de masas.

Los parámetros instrumentales los dividiremos en tres partes:

2.1.- Parámetros instrumentales del sistema de inyección:

2.1.1.- Flujo de purga del septum.

2.1.2.- Flujo total de gas portador (helio).

2.1.3.- Presión en cabeza de columna.

2.1.4.- Tiempo de purga.

2.1.5.- Temperatura del inyector.

2.2.- Parámetros instrumentales de la separación cromatográfica:

2.2.1.- Velocidad lineal y flujo volumétrico del gas portador.

2.2.2.- Programación de la rampa de temperaturas del horno.

2.2.3.- Temperatura inicial de la columna.

2.2.4.- Gradiente de temperatura.

2.2.5.- Temperatura final.

2.2.6.- Conclusiones.

2.3.- Parámetros instrumentales que afectan al espectrómetro de masas las vamos:

2.3.1- Temperatura de la interfase GC-MS.

2.3.2.-Parámetros instrumentales característicos de la medida en modo SCAN.

2.3.2.1.- Rango masa/carga del espectro de masas.

2.3.2.2.- Número de medidas de cada ion.

2.3.2.3.- Valor umbral de detección.

2.3.2.4.- Voltaje del electrón-multiplicador.

2.3.2.5.- Tiempo de borrado del disolvente.

2.3.3.- Parámetros instrumentales característicos de la medida en modo SIM.

2.3.3.1.- Iones seleccionados para el análisis de cada analito.

2.3.3.2.- Iniciación del análisis de cada analito.

2.3.3.3.- El tiempo de medida de cada ion.



## **2.- PARÁMETROS INSTRUMENTALES.**

### **2.1.- Optimización de las variables de la inyección.**

#### *2.1.1.- Flujo de la purga del septum.*

El septum está fabricado con materiales muy estables, pero no llegan al ser de todo inertes al proceso que ocurre en el bloque de inyección, por este motivo necesitamos protegerlo del ataque de la muestra volatilizada. Para este fin se emplea una fracción de gas portador que circula continuamente en paralelo al septum ( flujo de la purga del septum ), así se impide que la muestra volatilizada llegue a contactar con éste y producir algún producto derivado, que después nos pueda ocasionar un pico fantasma.

Este flujo es independiente del flujo total, siendo solo dependiente de la presión en cabeza de columna. Su optimización se ha llevado a cabo analizando una disolución que contenía 1ppm de cada ácido graso. Han sido dos los criterios que hemos tenido en cuenta para elegir el valor más

adecuado, por una parte observamos la intensidad de la señal analítica ( área altura ) y por otra la presencia o ausencia de picos fantasma causados por el sangrado del septum. El rango de caudales de gas utilizados para optimizar la purga del septum estuvo comprendido entre 1 y 3 mL/min, realizándose tres inyecciones para cada valor de caudal estudiado, manteniéndose constantes los restantes parámetros cromatográficos en los siguientes valores:

- Volumen de muestra inyectado . . . . . 2 $\mu$ L
- Flujo total . . . . . 100 mL/min
- Presión en cabeza de columna . . . . . 15 psi
- Tiempo de purga . . . . . 2 min
- Temperatura del inyector . . . . . 200 °C
- Temperatura inicial de la columna . . . . . 76 °C

Las señales analíticas en todos los casos fueron semejantes, pero al utilizar un caudal comprendido entre 1 y 2.5 mL/min, se observa una línea base elevada e irregular. Estas irregularidades son picos fantasma derivados de los materiales constitutivos del séptum, ya que al hacerle un espectro de masas observamos que se trata de hidrocarburos. Al utilizar un flujo de 3 mL/min, se observa que desaparecen los picos fantasma y la línea base se estabiliza, por este motivo el valor de 3mL/min ha sido considerado el óptimo para las siguientes experiencias.

### 2.1.2.- *Flujo total*

Es el flujo de gas portador que entra en el cromatógrafo desde el exterior. Para estudiar su influencia en la señal analítica, se realizaron diez inyecciones de una disolución que contenía  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso. Esta operación se repitió para cada valor de flujo total, manteniéndose constantes las restantes condiciones cromatográficas, que son:

- Volumen de muestra inyectado . . . . .  $2 \mu\text{L}$
- Flujo de purga del séptum . . . . .  $3 \text{ mL/min}$
- Presión en cabeza de columna . . . . .  $15 \text{ psi}$
- Tiempo de purga . . . . .  $2 \text{ min}$
- Temperatura del inyector . . . . .  $200 \text{ }^\circ\text{C}$
- Temperatura inicial de la columna . . . . .  $76 \text{ }^\circ\text{C}$

En la tabla III.4 se recogen los valores medios del área para los diferentes ácidos grasos, así como su desviación estándar relativa.

Tabla III.4.- Influencia del flujo total.

ÉSTERES METÍLICOS	Flujo Total (mL/min)					
	50		75		100	
	A.10 <sup>-3</sup>	% DER	A.10 <sup>-3</sup>	% DER	A.10 <sup>-3</sup>	% DER
Ácido Caprílico	578	13.2	675	8.2	679	3.5
Ácido Cáprico	725	14.6	780	7.5	786	4.2
Ácido Laurico	625	12.6	700	6.9	710	3.7
Ácido Mirístico	638	11.9	725	8.6	732	3.5
Ácido Palmítico	590	10.8	690	7.3	697	4.3
Ácido Estearico	528	12.9	650	8.8	659	4.2
Ácido Oleico	635	15.0	718	9.3	719	5.1
Ácido Aráquico	490	13.9	563	6.8	581	4.8
Ácido Behénico	450	14.5	550	7.1	553	5.1

En las figuras III.3, III.4 y III.5, se han representado el área de los picos cromatográficos en función del flujo total para cada ácido graso.

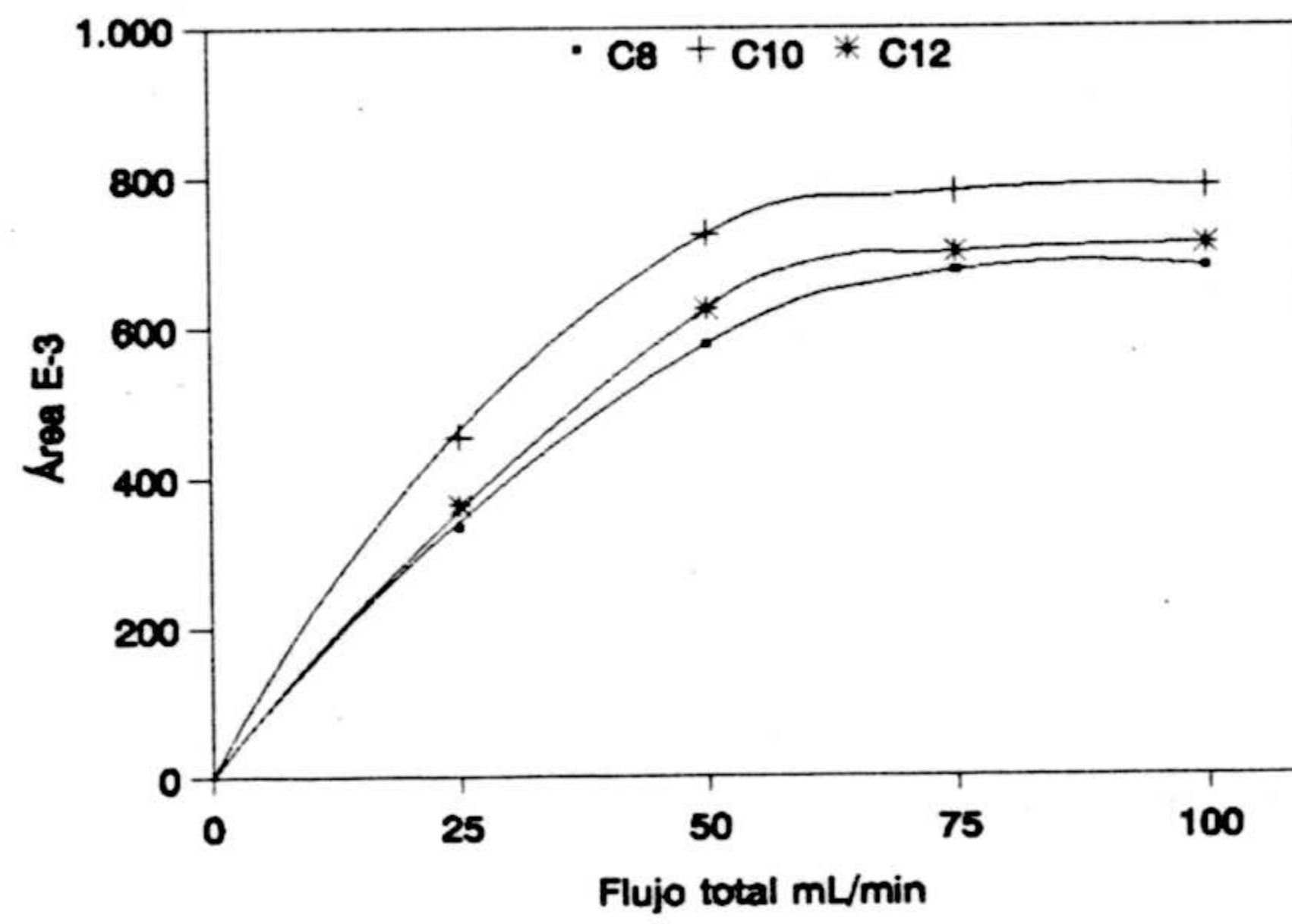


Figura III.3.- Influencia del flujo total en el área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>.

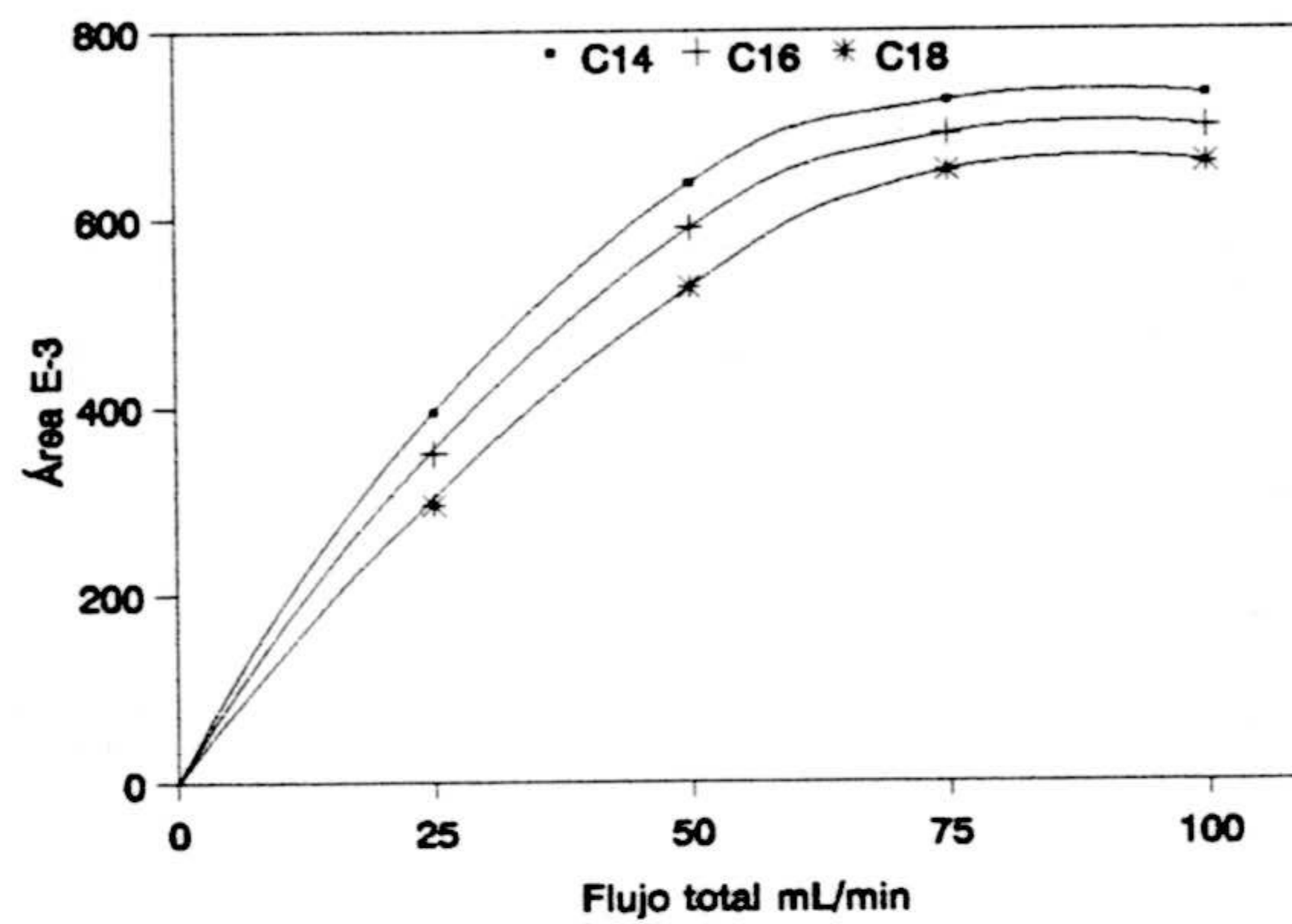
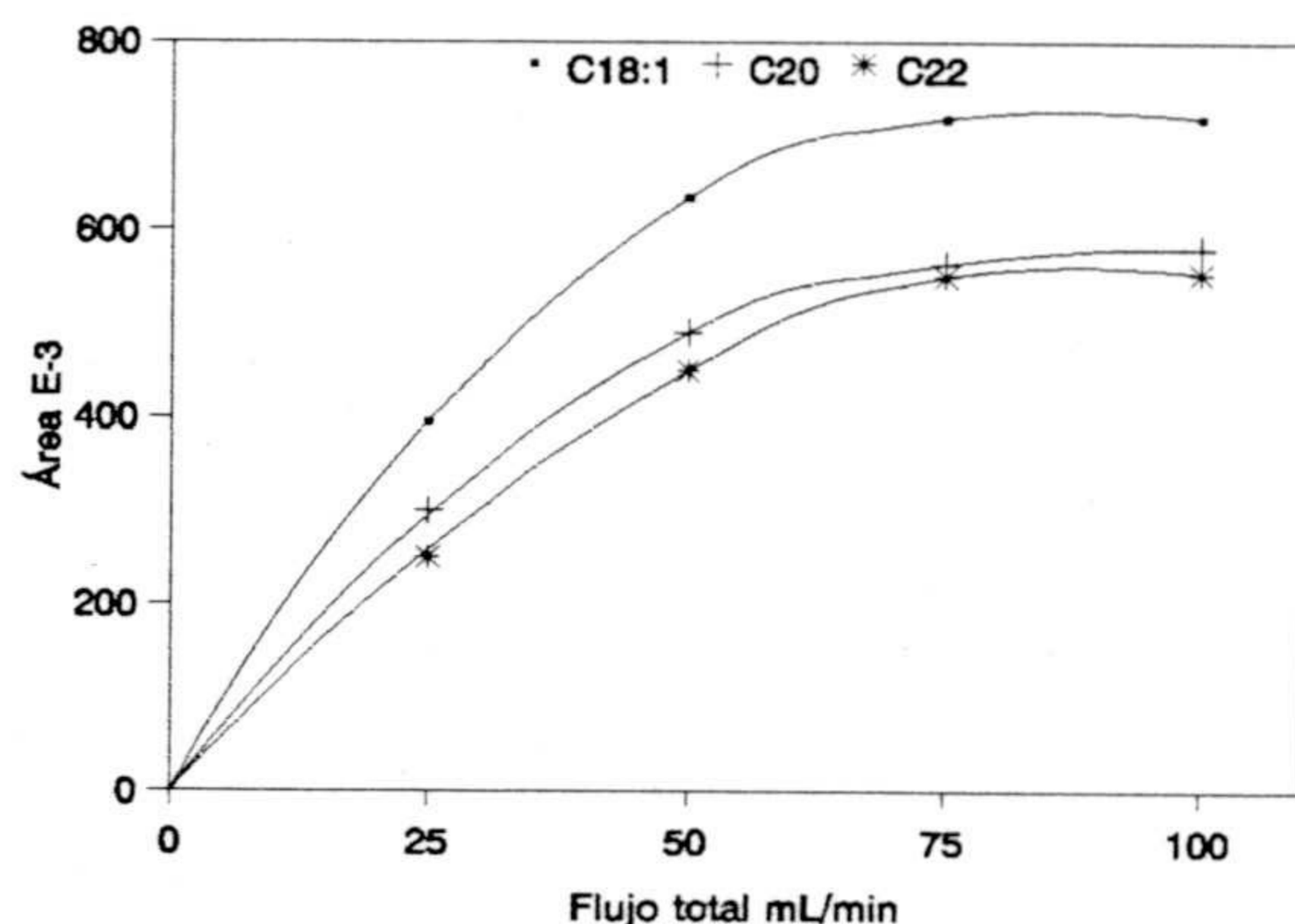


Figura III.4.- Influencia del flujo total en el área de los ésteres metílicos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>.



**Figura III.5.-** Influencia del flujo total en el área de los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ .

En todos los casos se observa que la intensidad de la señal aumenta con el flujo total hasta alcanzar un valor límite a 75 mL/min, permaneciendo el área constante a partir de este valor hasta los 100 mL/min. Esto nos indica que necesitamos un flujo total de al menos 75 mL/min y un tiempo de dos minutos (activación de la purga) para fijar la práctica totalidad de la muestra en la cabeza de la columna. Al aumentar el flujo total, se comprime más la muestra vaporizada en la zona inferior del inserto, produciéndose por tanto una menor pérdida de muestra por la purga del séptum, situada en la parte superior del inserto. (ref anal chem). Se observa además que la reproducibilidad de las áreas obtenidas mejora también al aumentar el flujo total, ya que en estas condiciones de compresión de muestra

vaporizada, la cantidad de muestra que se fija en la cabeza de columna (trampa fría) es menos aleatoria.

Por estas dos razones, mayor señal y mayor reproducibilidad, concluimos por tomar el valor de 100 mL/min como flujo óptimo para las siguientes experiencias.

### *2.1.3.- Presión en la cabeza de columna.*

Es la presión que ejercemos en el inyector, ya que consideramos a éste como la cabeza de la columna. Aunque la presión en cabeza de columna se mida en el inyector, dependerá de variables típicas de la columna. Dependerá de las dimensiones de la columna (diámetro interno, longitud), incide de manera notable en la velocidad lineal del gas a través de la columna, que a su vez depende de la resistencia a la penetración del gas y de a diferencia de presión en los extremos de la columna. La presión en cabeza de columna afecta al caudal de purga de septum.

Para estudiar esta variable se realizaron diez análisis a una disolución de ácidos grasos de 1 mg.L<sup>-1</sup> de cada uno, variando la presión en cabeza de columna en el rango 10-15 psi. La elección de este rango estuvo delimitada porque 10 psi es la presión mínima aconsejable, para las dimensiones de nuestra columna. (Ref manual masas). Para hacer este estudio se mantuvieron

constantes los restantes parámetros:

- Volumen de muestra inyectado . . . . . 2  $\mu$ L
- Flujo de purga del séptum . . . . . 3 mL/min
- Flujo total . . . . . 100 mL/min
- Tiempo de purga . . . . . 2 min
- Temperatura del inyector . . . . . 200 °C
- Temperatura inicial de la columna . . . . . 76 °C

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.5.



**Tabla III.5.-** Influencia de la presión en cabeza de columna.

ÉSTERES METÍLICOS	Presión cabeza de columna (psi)					
	10		13		15	
	A.10 <sup>-3</sup>	% DER	A.10 <sup>-3</sup>	% DER	A.10 <sup>-3</sup>	% DER
Ácido Caprílico	583	12.6	692	8.9	725	3.7
Ácido Cáprico	731	15.6	785	8.1	810	4.0
Ácido Laurico	635	13.6	723	7.3	760	3.6
Ácido Mirístico	649	10.9	740	8.5	780	3.2
Ácido Palmítico	585	12.5	695	8.8	725	4.1
Ácido Estearico	535	13.5	661	9.1	693	4.4
Ácido Oleico	655	13.5	720	9.5	759	4.5
Ácido Aráquico	500	12.8	530	8.9	586	4.3
Ácido Behénico	459	15.3	565	7.9	583	4.9

Se observa que el área de todos los picos cromatográficos aumenta con la presión en cabeza de columna. Esto es debido a que la muestra vaporizada es más comprimida hacia el fondo del inserto (cabeza de columna), a medida que aumentamos la presión en cabeza de columna, por tanto al aumentar la presión disminuye la proporción de muestra que escapa por la purga y aumenta la proporción que se fija en la cabeza de columna. Así mismo la reproducibilidad también aumenta al aumentar la presión. Por todo esto elegimos la presión de 15 psi como el valor óptimo.

#### *2.1.4.- Tiempo de purga.*

El tiempo de purga es el tiempo que transcurre desde que inyectamos la muestra hasta que se purga el disolvente. Es el tiempo que dejamos para que la muestra vaporizada se preconcentre en la cabeza de columna. Cuando pasa este tiempo, purgamos el vapor de disolvente y muestra que contiene el inserto, desviando gran parte del flujo de gas portador al desecho junto con lo que quedara de muestra vaporizada, mientras una pequeña parte de gas portador pasa a la columna arrastrando la mayor parte de la muestra que estaba preconcentrada en cabeza de columna.

Observamos que este tiempo está íntimamente ligado con la cantidad de muestra que entra en la columna. El intervalo que debe transcurrir desde la inyección hasta la purga o limpieza del inserto dependerá de la volatilidad de los componentes de la muestra, del disolvente empleado y del volumen interno del inserto. El tiempo de espera para activar la purga debe ser tanto mayor cuanto más volátiles sean los componentes de la muestra, ya que al aumentar la volatilidad aumenta el tiempo necesario para que éstos condensen en cabeza de columna (trampa fría), de forma que si purgamos demasiado pronto los compuestos más ligeros serán expulsados por el desecho.

Para determinar el tiempo de purga óptimo se inyectó una disolución de ácidos grasos que contenía  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada uno. Cada disolución había sido esterificada previamente. Se hicieron diez réplicas para cada valor de

tiempo de purga, estudiándose el intervalo comprendido entre 0.5-3 minutos. Las demás condiciones cromatográficas se mantuvieron constantes con los siguientes valores:

- Volumen de muestra inyectado . . . . . 2 $\mu$ L
- Flujo de purga del septum . . . . . 3 mL/min
- Flujo total . . . . . 100 mL/min
- Presión en cabeza de columna . . . . . 15 psi
- Temperatura del inyector . . . . . 200 °C
- Temperatura inicial de la columna . . . . . 76 °C

Los resultados obtenidos se recogen en las tablas III.6 y III.7.

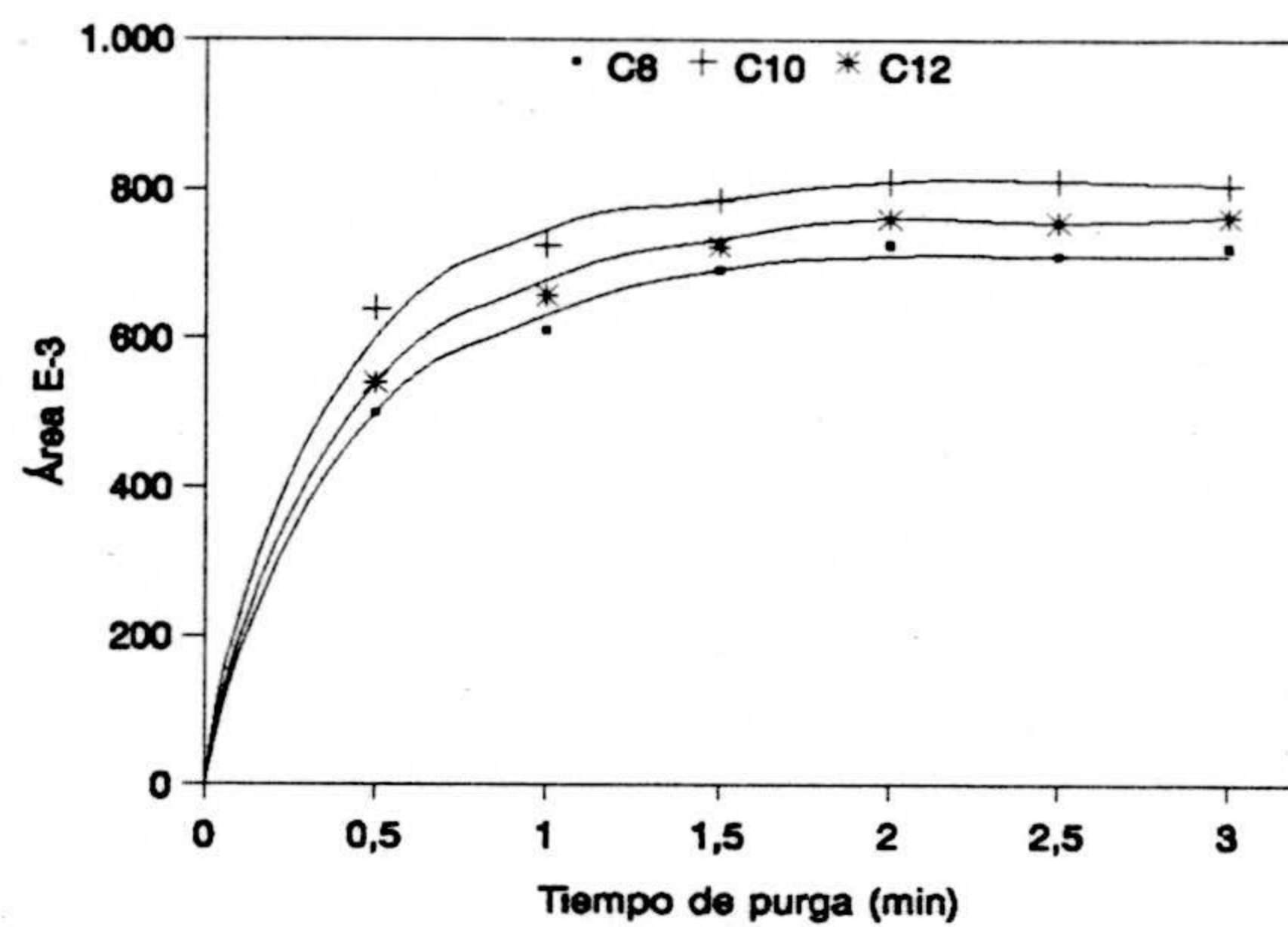
**Tabla III.6.-** Áreas medias ( $A \times 10^{-3}$ ) en función del tiempo de purga.

ÉSTERES METÍLICOS	Tiempo de purga (min)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Ácido Caprílico	500	610	692	725	710	721
Ácido Cáprico	640	725	785	810	811	805
Ácido Laurico	540	657	723	760	755	762
Ácido Mirístico	650	720	760	780	789	779
Ácido Palmítico	550	632	705	735	731	737
Ácido Estearico	450	578	661	693	698	689
Ácido Oleico	553	705	720	759	758	765
Ácido Aráquico	490	548	589	615	623	618
Ácido Behénico	443	502	502	563	566	559

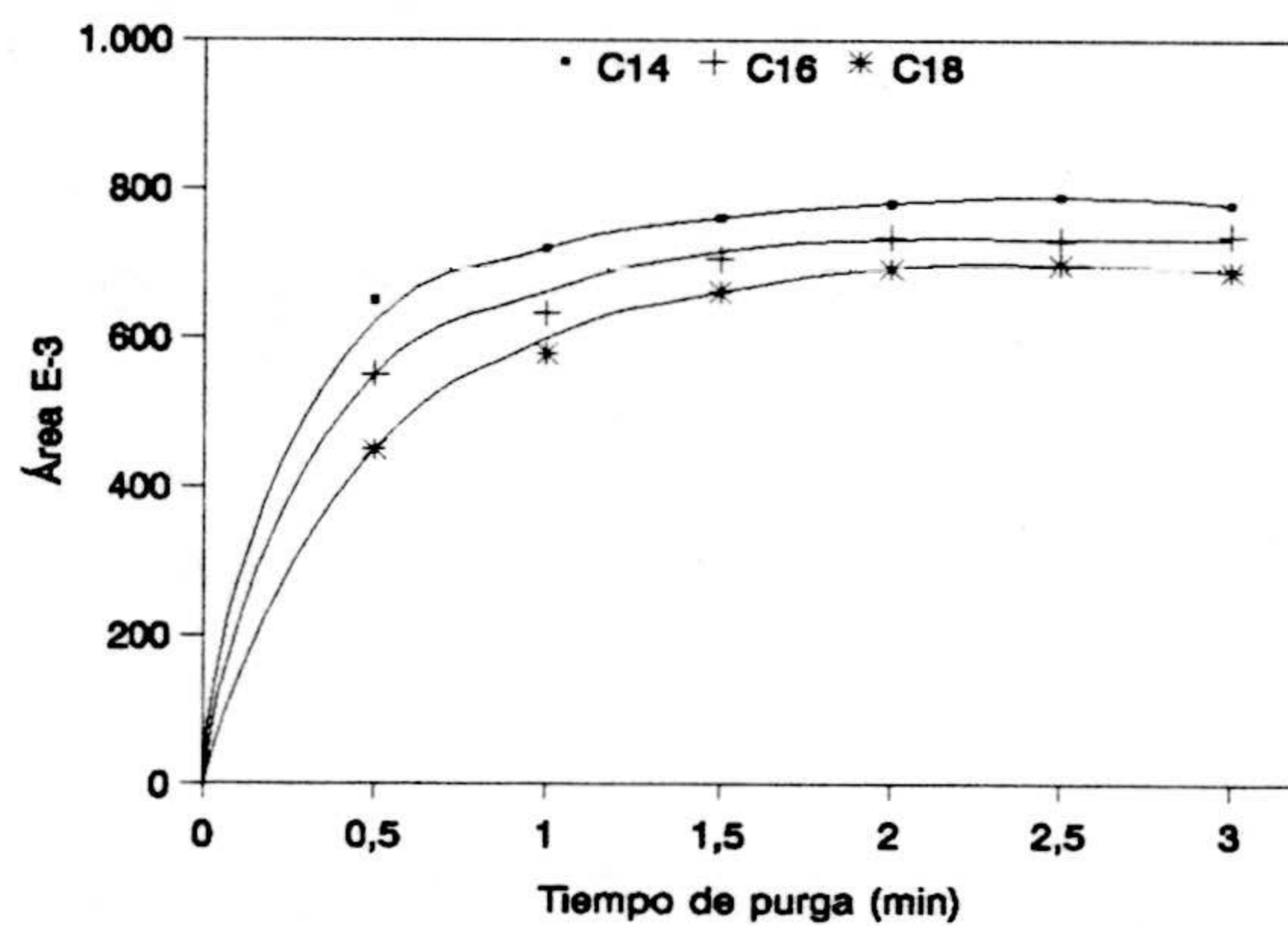
Tabla III.7.- Desviación estándar relativa en función del tiempo de purga.

ÉSTERES METÍLICOS	Tiempo de purga (min)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Ácido Caprílico	7.6	5.8	4.1	3.2	3.0	3.1
Ácido Cáprico	8.1	6.2	4.5	3.4	3.3	3.0
Ácido Laurico	7.9	6.5	4.9	3.6	3.2	3.4
Ácido Mirístico	8.3	6.3	4.6	3.2	3.1	3.1
Ácido Palmítico	8.7	6.8	5.1	3.6	3.5	3.4
Ácido Estearico	8.9	7.1	5.3	4.0	3.9	3.8
Ácido Oleico	8.6	7.1	5.9	3.5	3.3	3.4
Ácido Aráquico	7.5	6.4	4.7	3.3	3.4	3.5
Ácido Behénico	8.2	7.2	5.2	3.9	3.2	3.4

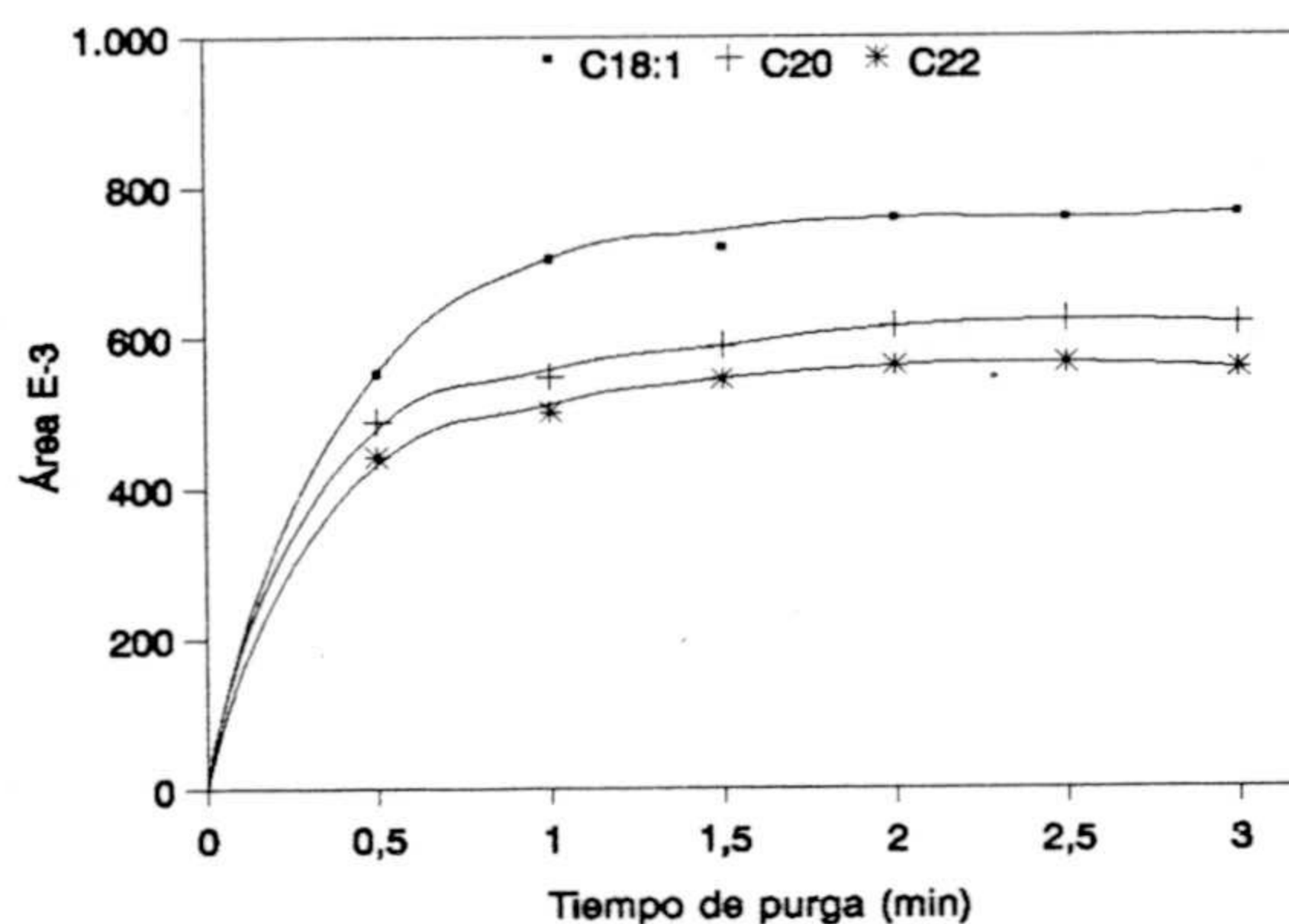
En la figuras III.6, III.7 y III.8 se han representado las áreas en función del tiempo de purga para los ácidos grasos estudiados.



**Figura III.6.-** Influencia del tiempo de purga en el área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>.



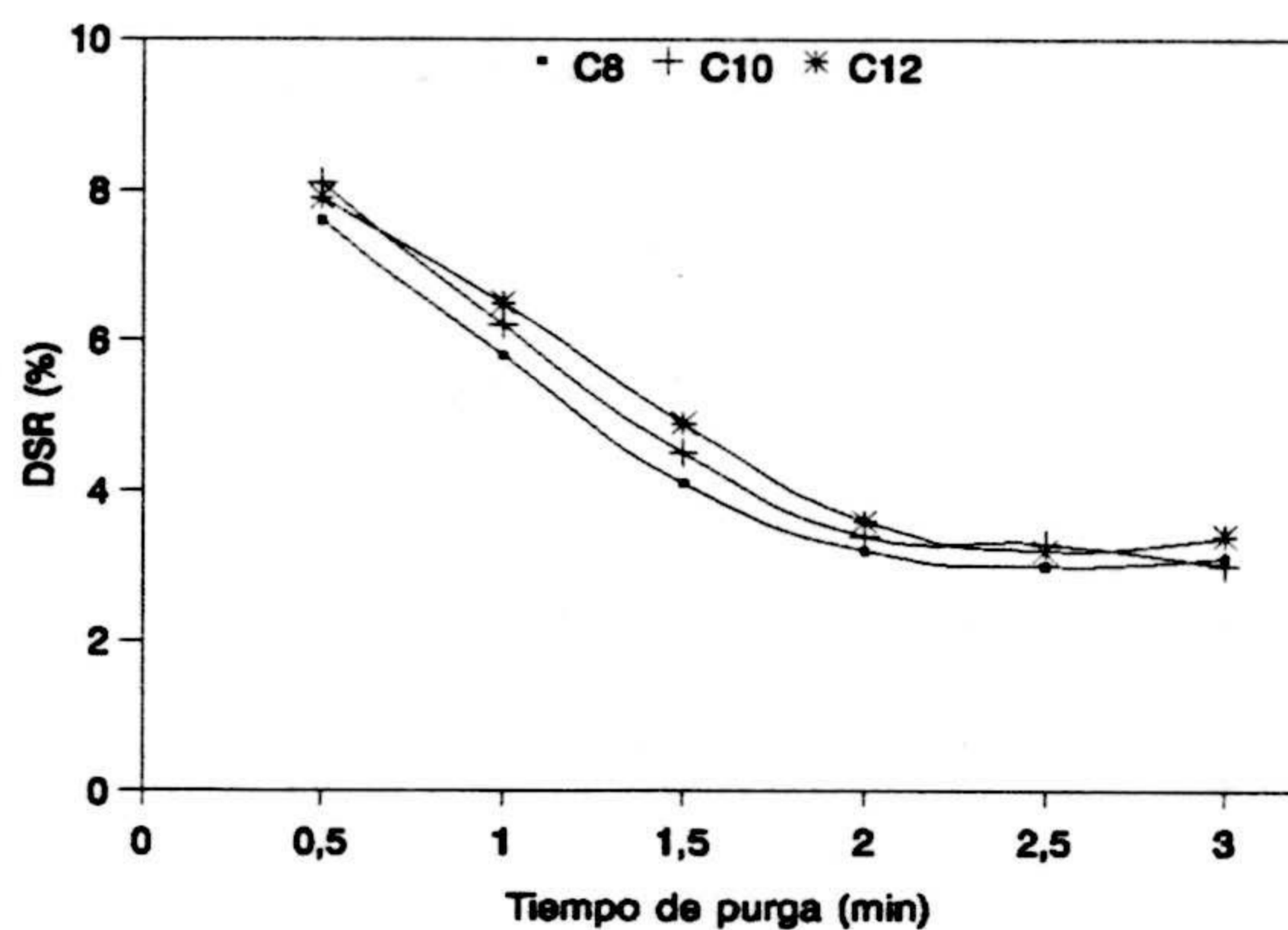
**Figura III.7.-** Influencia del tiempo de purga en el área de los ésteres metílicos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>.



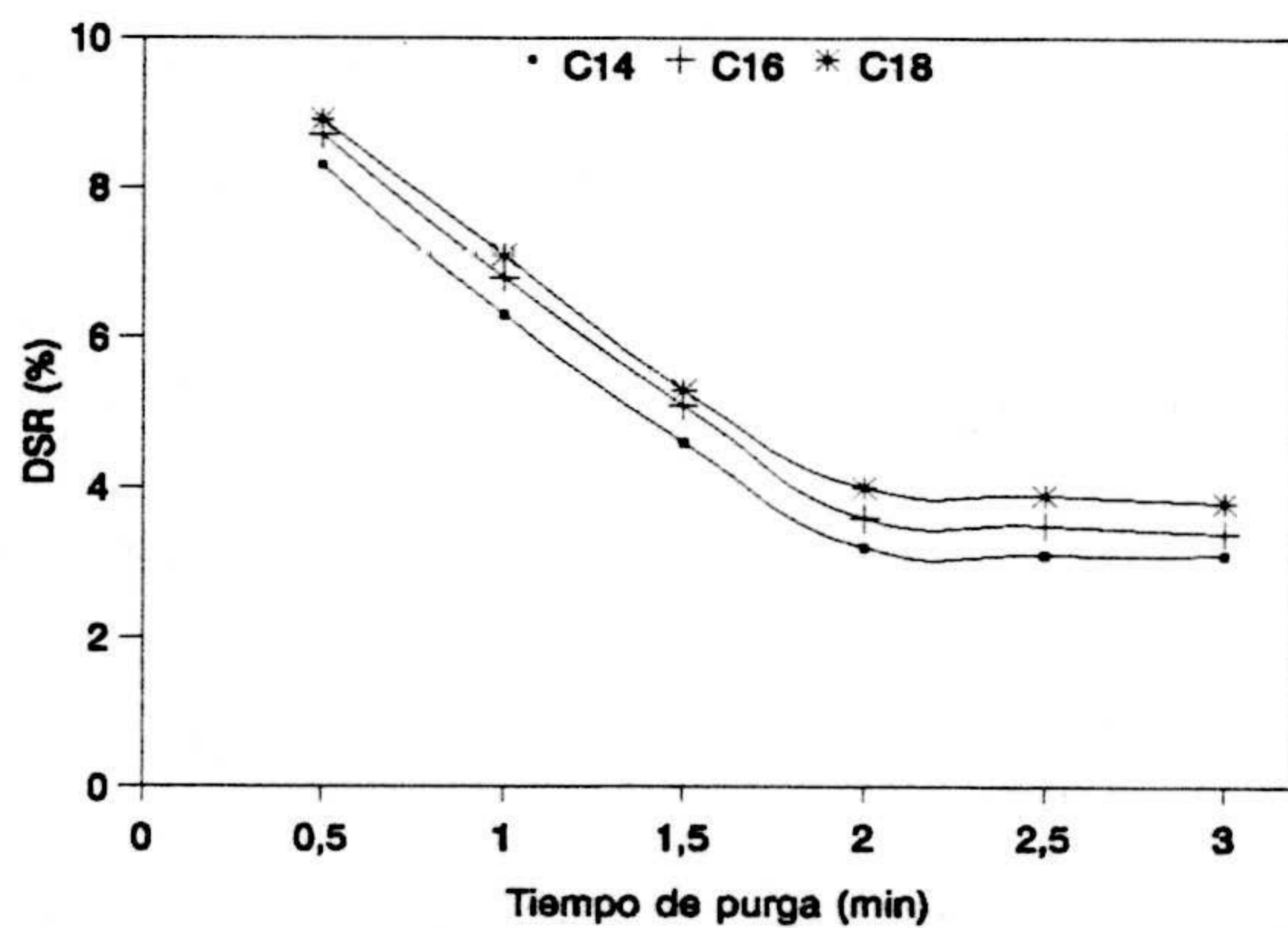
**Figura III.8.-** Influencia del tiempo de purga en el área de los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ .

En estas figuras se observa que independientemente de la volatilidad de cada éster metílico, a partir de un tiempo de purga de dos minutos el área de los picos cromatográficos permanece constante, o sea a partir de dos minutos la mayoría del analito se ha preconcentrado ya en cabeza de columna con lo que aumentar el tiempo de purga no aporta más analito a la cabeza de columna.

En las figuras III.9, III.10 y III.11 se ha representado la desviación estándar relativa de las áreas de los ésteres metílicos, frente al tiempo de purga. Se observa que la DSR% decrece al aumentar el tiempo de purga, estabilizándose a partir de dos minutos. Todo esto nos hace elegir el valor de dos minutos como valor óptimo de tiempo de purga.

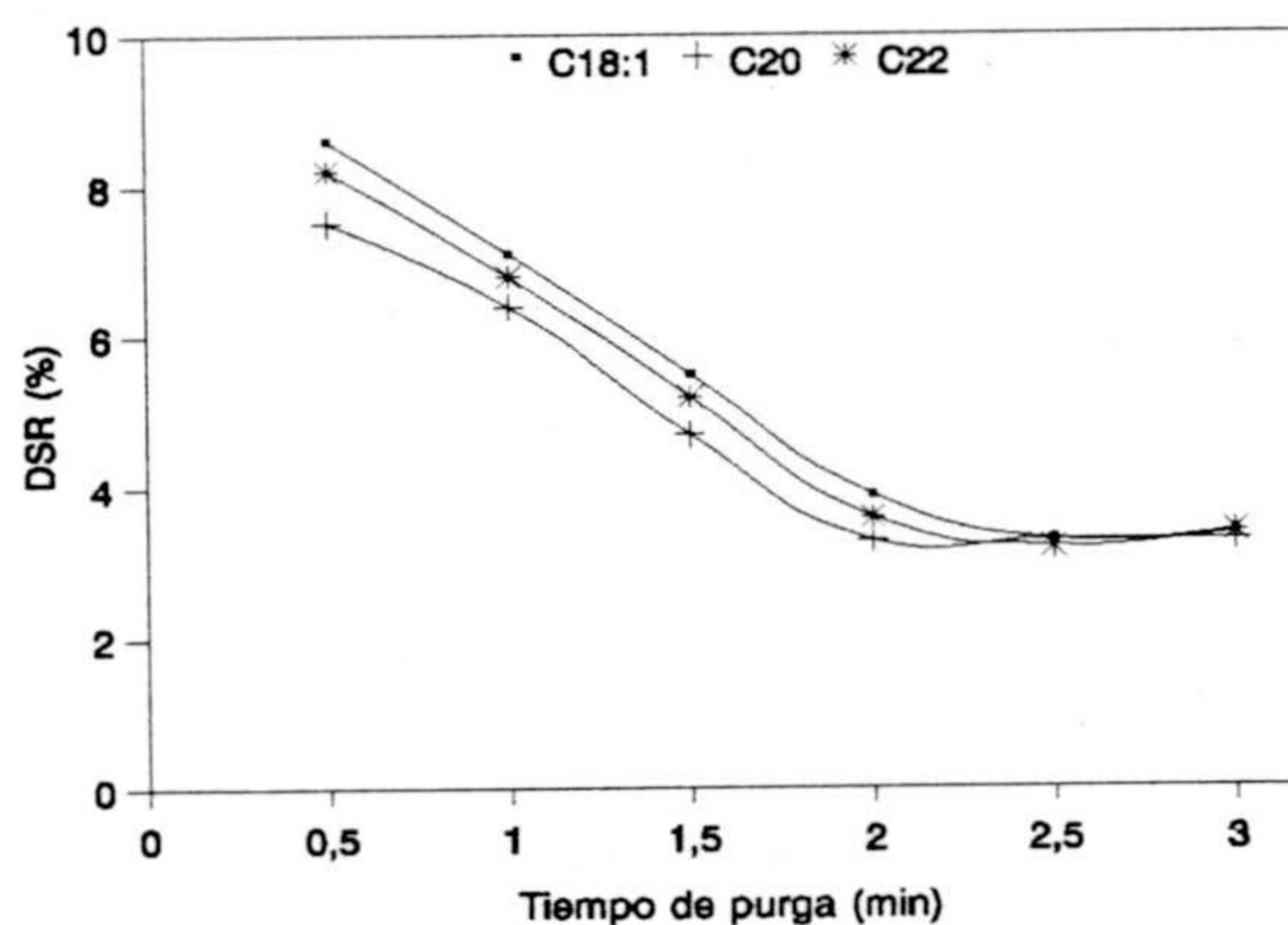


**Figura III.9.-** Desviación estándar relativa del área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>, en función del tiempo de purga.



**Figura III.10.-** Desviación estándar relativa del área de los ésteres metílicos C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> y C<sub>16</sub>, en función del tiempo de purga.





**Figura III.11.-** Desviación estándar relativa del área de los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ , en función del tiempo de purga.

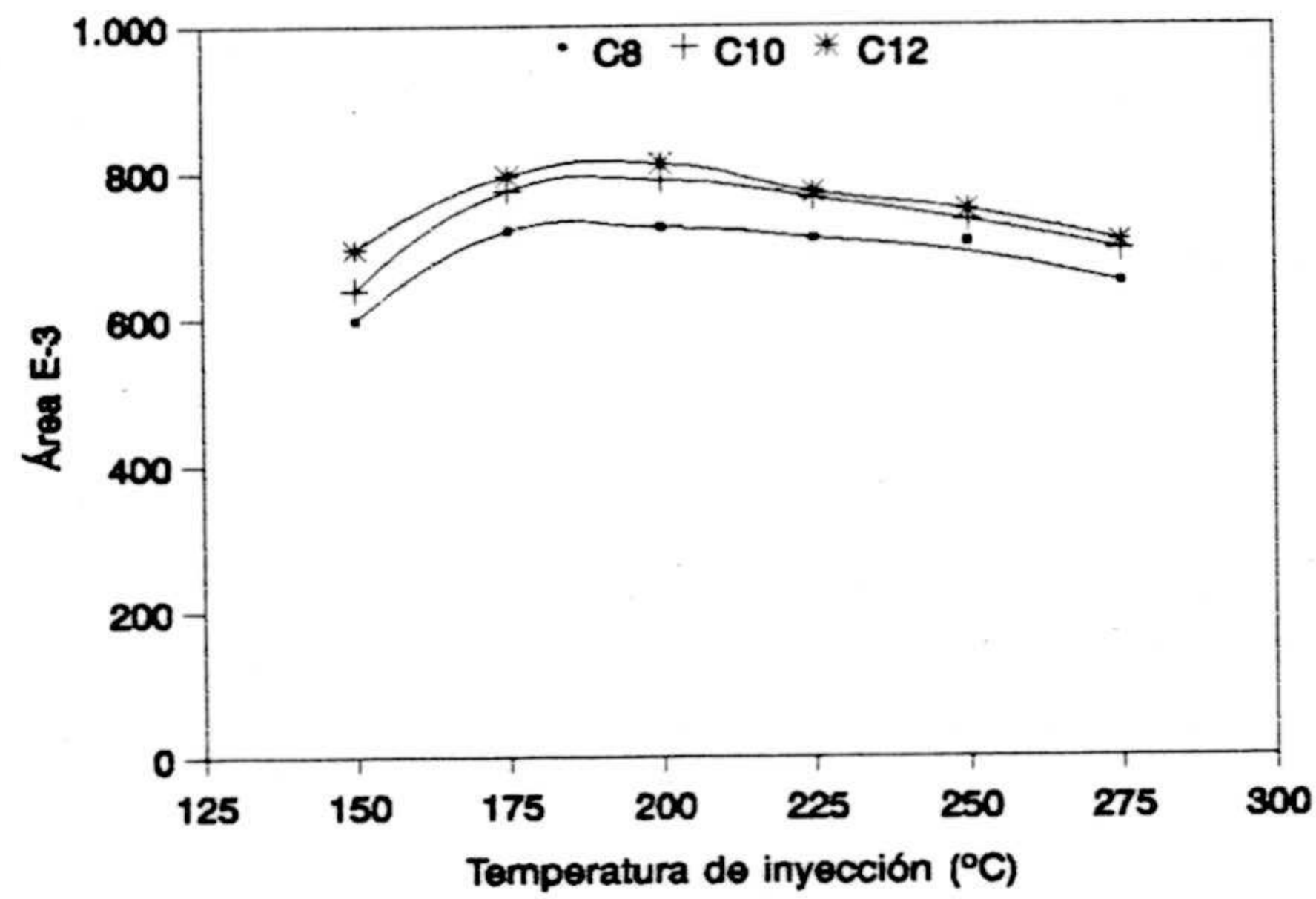
### ***2.1.5.- Temperatura del bloque de inyección.***

La temperatura del bloque de inyección debe ser lo suficientemente alta para volatilizar la muestra, sin llegar a descomponer a ninguno de los componentes de interés presentes en ésta. No es solo este último motivo el que nos impida elevar excesivamente esta temperatura, ya que además al aumentar excesivamente la temperatura del bloque de inyección, aumenta el volumen de la muestra vaporizada, con lo que hay más probabilidad de que parte de la muestra escape por la purga del septum.

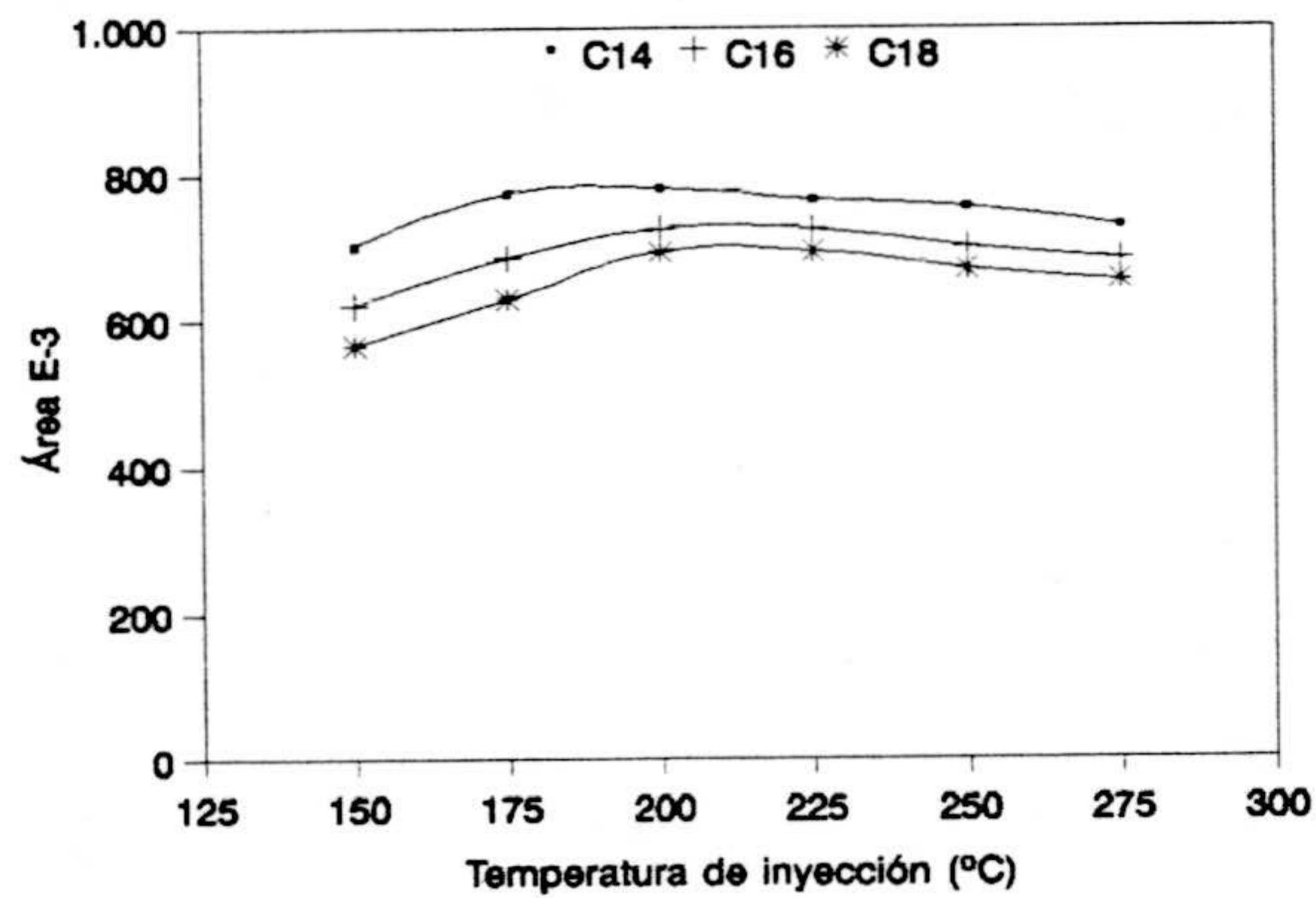
Para estudiar la influencia de esta variable se realizaron inyecciones de una disolución que contenía  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente esterificado, modificando la temperatura del bloque de inyección en el rango  $150\text{-}275^\circ \text{ C}$ . En cada caso se realizaron diez réplicas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.8.

**Tabla III.8.-** Áreas medias ( $A \times 10^{-3}$ ) en función de la temperatura del inyector.

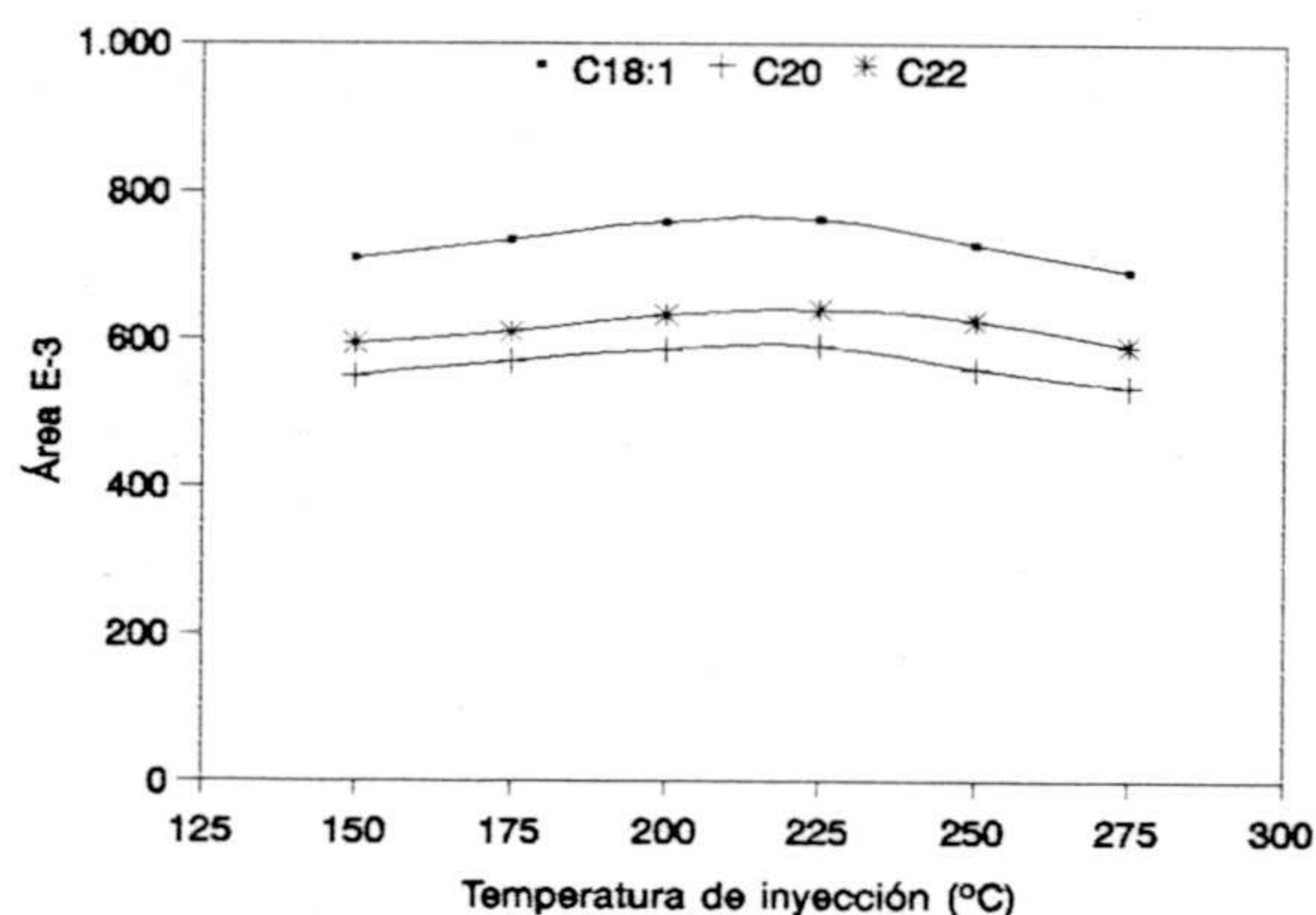
ÉSTERES METÍLICOS	Temperatura del inyector ( $^\circ\text{C}$ )					
	150	175	200	225	250	275
Ácido Caprílico	598	720	725	710	705	650
Ácido Cáprico	640	775	790	765	735	692
Ácido Laurico	695	795	811	773	748	705
Ácido Mirístico	701	773	780	765	755	729
Ácido Palmítico	620	685	725	724	702	683
Ácido Esteárico	566	629	693	694	670	654
Ácido Oleico	710	735	759	762	728	691
Ácido Aráquico	550	571	586	591	560	535
Ácido Behénico	535	610	633	640	625	590



**Figura III.12.-** Influencia de la temperatura de inyección sobre el área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>.



**Figura III.13.-** Influencia de la temperatura de inyección sobre el área de los ésteres metílicos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>.



**Figura III.14.-** Influencia de la temperatura de inyección sobre el área de los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ .

De la observación de las figuras III.12, III.13 y III.14, donde se representa el área de los picos cromatográficos de cada éster metílico frente a la temperatura del bloque de inyección, puede deducirse que todos los ésteres metílicos presentan un comportamiento similar. El área aumenta suavemente con la temperatura hasta alcanzar un valor máximo, para decrecer a continuación.

Este comportamiento es lógico ya que al aumentar la temperatura aumenta la proporción de muestra vaporizada, hasta que se alcanza un volumen crítico a partir del cual escapa muestra por la purga del septum, comenzando a disminuir la respuesta.

Por otra parte el desplazamiento del máximo hacia temperaturas mayores al aumentar el peso molecular, puede ser atribuido a una disminución de la correspondiente volatilidad.

Por otra parte el aumento de las DSR pone de manifiesto que por encima de 200°C la muestra empieza a perderse por la purga del septum de una manera poco repetitiva.

A la vista de estos resultados, adoptamos 200°C como temperatura óptima del bloque de inyección para experiencias posteriores.



## 2.2.- Optimización de los parámetros instrumentales que afectan a la separación cromatográfica.

### 2.2.1.- *Velocidad lineal y flujo volumétrico del gas portador.*

El flujo de gas portador utilizado en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas debe ser pequeño, ya que las condiciones de vacío extremo que requiere el detector ( $10^{-5}$ ) no son compatibles con un caudal elevado del gas portador. La velocidad lineal y el flujo de gas a través de la columna cromatográfica dependen del flujo total, del flujo de purga del séptum y de la presión en la cabeza de la columna. La importancia de estos parámetros es doble porque influyen en la altura equivalente de plato teórico (AEPT) y por otra parte, el detector de masas utilizado no permite un caudal de gas portador superior a un cierto valor. La determinación de ambos parámetros se realiza inyectando una sustancia que no sea retenida por la fase estacionaria, como puede ser aire o metano. Nosotros hemos inyectado  $1\ \mu$  de aire en las condiciones experimentales ya fijadas, observándose que los componentes de la mezcla son eluidos con un tiempo de retención de 1.15 minutos. En la figura III.15 se muestra el cromatograma correspondiente al aire inyectado y en la figura III.16 el espectro de masas obtenido para el pico correspondiente al aire.

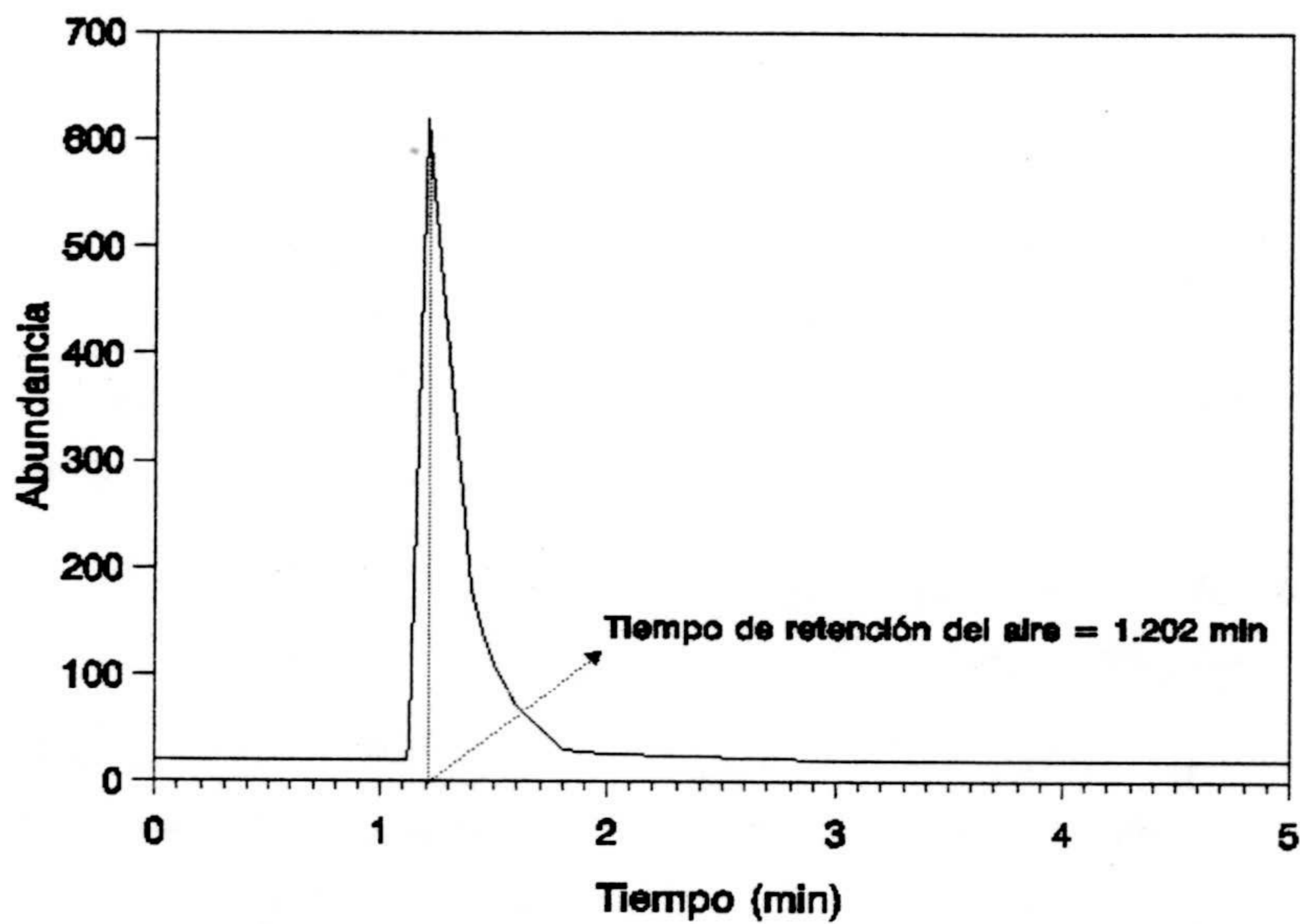


Figura III.15.- Cromatograma obtenido al inyectar aire con el método cromatográfico optimizado para la inyección de los ésteres metílicos.



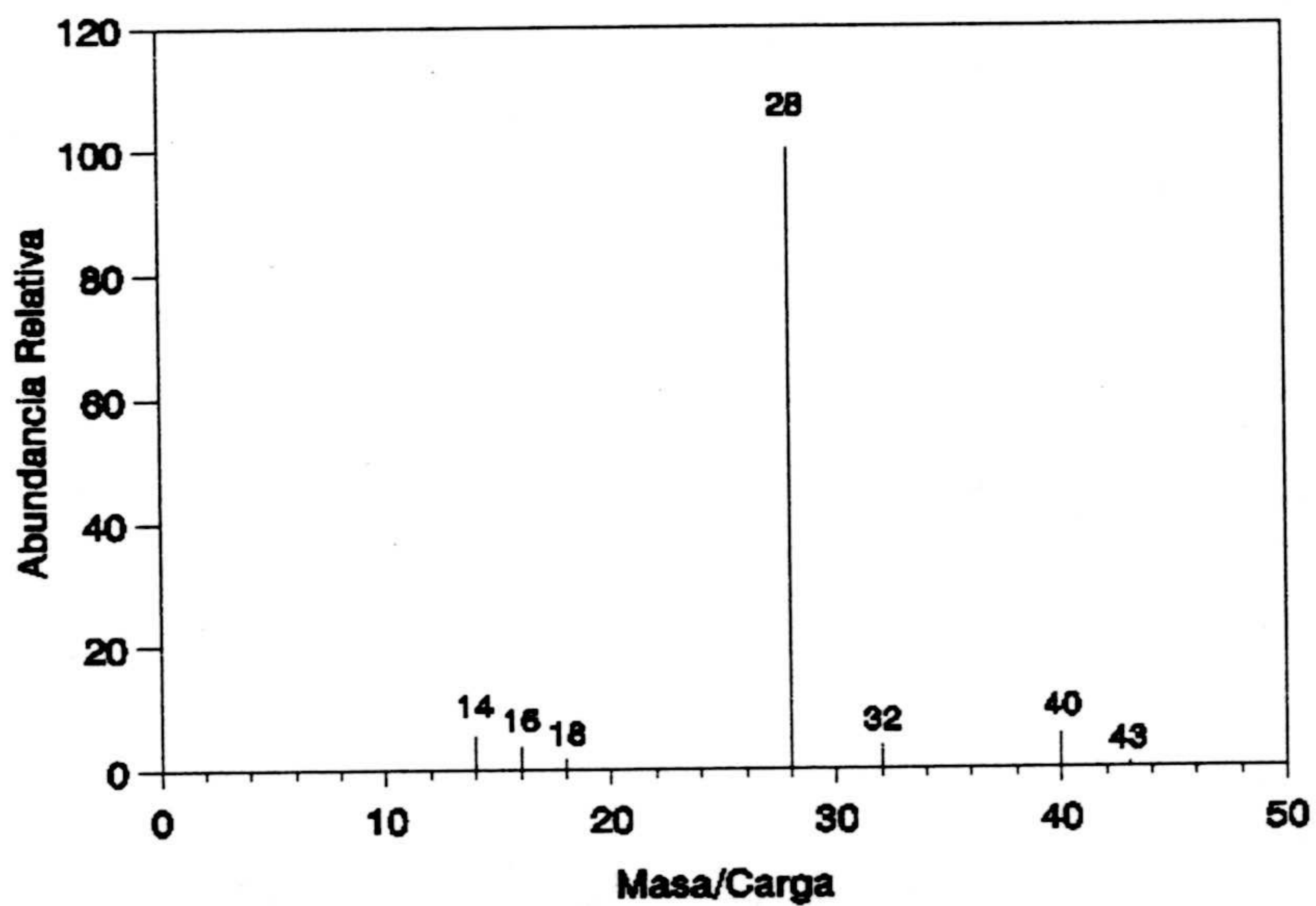


Figura III.16.- Espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente al aire.

2.2.1.1.- *Índice de flujo lineal (IFL)*. Se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$IFL(cm/s) = 1,67 \frac{L(m)}{t_R(\min)}$$

en donde L es la longitud de la columna y  $t_R$  el tiempo de retención.

Sustituyendo datos en la expresión anterior, hemos obtenido un valor de IFL de 41.75 cm/s.

2.2.1.2.- *Índice de flujo volumétrico IFV*. Se calcula mediante la expresión:

$$IFV(mL/min) = 0.785 \frac{D^2(mm)L(m)}{t_R(\min)}$$

siendo D el diámetro interno de la columna. Sustituyendo datos en la expresión anterior hemos obtenido un índice de flujo volumétrico de 1.23 mL/min, confirmándose que el flujo volumétrico utilizado por nosotros está dentro del margen permitido por nuestro espectrómetro de masas, o sea no debe ser superior a 1.5 mL/min.

### *2.2.2.- Programación de la temperatura de la columna.*

La temperatura de la columna se debe programar para lograr una separación de los analitos con la mayor resolución posible y el mínimo tiempo de análisis.

Durante la inyección se mantiene la columna a una temperatura baja, adecuada para la preconcentración de los componentes de la muestra en la cabeza de columna. Posteriormente se aumenta la temperatura para volatilizar la muestra y facilitar la separación o migración diferencial de sus componentes a través de la columna.

Nosotros vamos a utilizar una temperatura inicial, que iremos subiendo progresivamente mediante un gradiente, finalmente emplearemos una isoterma para estabilizar la temperatura.

### *2.2.3.- Temperatura inicial de la columna.*

La temperatura inicial de la columna se mantiene constante un cierto tiempo después de la inyección de la muestra, con objeto de concentrar los componentes de la muestra en la cabeza de columna. Esta temperatura afecta también al tiempo de análisis, puesto que al aumentarla se tarda menos tiempo en alcanzar la temperatura final para un gradiente dado.

La concentración de muestra , previa al desarrollo cromatográfico, se realiza según dos efectos diferentes:

- Efecto del disolvente. Los componentes de la muestra se concentran por el efecto del disolvente si la temperatura inicial de la columna está comprendida entre 10 y 30°C por debajo del punto de ebullición del disolvente. De esta forma, el disolvente condensa a la entrada de la columna formando un "tapón" o película de fase estacionaria en donde quedan atrapados los componentes de la muestra. Se produce así un efecto de preconcentración que depende de la velocidad de migración de la muestra a través de dicha película estacionaria. La preconcentración por efecto del disolvente no puede ser utilizada cuando los puntos de ebullición de los componentes de la muestra son muy superiores al punto de ebullición del disolvente.

- Efecto trampa fría. Esta forma de preconcentración se utiliza cuando el punto de ebullición de los componentes de la muestra es muy superior al del disolvente. En este caso, la temperatura inicial de la columna debe ser inferior al punto de ebullición del compuesto más volátil de la muestra, de forma que los componentes vaporizados condensan en la fase estacionaria líquida.

En nuestro caso, dadas las características de la muestra a analizar, podemos afirmar que el efecto trampa fría es el único que tiene influencia en la preconcentración de la muestra en cabeza de columna.

El efecto trampa fría se estudió analizando en las condiciones ya establecidas, una disolución conteniendo  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada analito. La temperatura inicial de la columna se varió entre 50 y 125 °C, mientras que la temperatura final de 250°C se alcanzó aplicando un gradiente de temperatura de 30 °C/min. La temperatura final se mantuvo constante durante el tiempo necesario para que eluyeran todos los ésteres metílicos.

En la tabla III.9 se han representado las áreas de los picos cromatográficos y el tiempo de análisis para cada una de las temperaturas estudiadas.

Tabla III.9.- Influencia de la temperatura inicial de la columna.

ÁCIDOS GRASOS	Temperatura inicial (°C)			
	50	75	100	125
Ácido Caprílico	701	724	675	624
Ácido Cáprico	798	811	767	748
Ácido Láurico	743	762	711	697
Ácido Mirístico	758	779	721	699
Ácido Palmítico	714	733	684	668
Ácido Esteárico	670	691	630	613
Ácido Oléico	731	765	709	696
Ácido Aráquico	600	619	575	555
Ácido Behénico	541	567	513	489
Tiempo anal.(min)	13.67	12.83	12.00	11.17

Se observa que la preconcentración por el efecto de trampa fría es máxima hasta una temperatura de 75 °C, a partir de este valor decrece el área de los picos cromatográficos, porque disminuye la diferencia de temperatura que favorece la migración de los analitos desde el inyector hasta la cabeza de columna. Por ello se deduce que 75 °C es la temperatura más adecuada porque proporciona la máxima señal y al mínimo tiempo de análisis.

#### 2.2.4.- *Gradiente de temperatura.*

Se denomina así al incremento de temperatura de la columna por unidad de tiempo. Un gradiente de temperatura elevado origina separaciones pobres de los componentes de la mezcla y por el contrario, un gradiente pequeño separa bien mezclas complejas, pero un gradiente pequeño hace incrementar el tiempo de análisis.

El gradiente de temperatura se ha optimizado analizando en las condiciones ya establecidas, una disolución que contenía 1 mg.L<sup>-1</sup> de cada ácido graso previamente esterificado, con la siguiente programación de temperaturas:

2 min                      Δ °C/min  
75 °C ----- 75 °C ----- 250°C

donde  $\Delta$  es el gradiente de temperatura aplicado a la columna. Los resultados se expresan para los ácidos oléico y esteárico, ya que son los que presentan mayores problemas de separación. Estas resoluciones se expresan en la tabla III.10.

**Tabla III.10.-** Influencia del gradiente de temperatura en la resolución y tiempo de análisis.

ÉSTERES METÍLICOS	Gradiente de temperatura (°C/min)			
	10	20	30	40
Ácido Oléico	1.20	1.10	1.11	0.75
Ácido Esteárico				
Tiempo anal.(min)	24.50	15.75	12.83	11.38

La primera consecuencia lógica que se observa en la tabla es que al aumentar el gradiente se acorta el tiempo de análisis, ya que alcanzamos en un tiempo más corto la temperatura final. Con el gradiente de diez la separación de los ésteres esteárico y oléico es excelente pero a costa de perder tiempo en el análisis. Con el gradiente de 40 °C/min, los dos isómeros aparecen fuertemente solapados. Nos quedamos por tanto con el gradiente de 30 °C/min que nos da una buena separación de los dos isómeros  $C_{18}$ .

### 2.2.5.- *Temperatura final del gradiente.*

La temperatura final de la rampa cromatográfica debe ser lo suficientemente alta para poder volatilizar y eluir al componente menos volátil de la muestra dentro de un tiempo de retención no demasiado alto. A continuación se mantiene esta temperatura constante para dejar que el compuesto menos volátil eluya por completo de la columna cromatográfica. Para optimizar esta temperatura hemos inyectado una muestra con  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada analito, manteniendo constantes las demás condiciones cromatográficas, que son:

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & 2 \text{ min} & & 30 \text{ C/min} & & \\
 75 \text{ }^{\circ}\text{C} & \text{-----} & 75 \text{ }^{\circ}\text{C} & \text{-----} & T_f \text{ }^{\circ}\text{C} & & 
 \end{array}$$

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla III.11.

**Tabla II.11.-** Influencia de la temperatura final en la resolución y tiempo de análisis.

ÉSTERES METÍLICOS	Temperatura final (°C)			
	250	260	270	280
Ácido Oléico	1.10	1.08	1.08	1.00
Ácido Esteárico				
Tiempo anal.(min)	12.83	11.17	10.50	8.83



A la vista de los resultados hemos elegido como temperatura final óptima de 270 °C, porque además de proporcionar buenas resoluciones, acorta el tiempo de análisis. Además no debemos olvidar que la temperatura máxima de trabajo de nuestra columna es 325°C, y cuanto más alejados estemos de ella menos desgaste sufrirá la columna.

### 2.2.6.- Conclusiones.

En la tabla III.12 se recogen los correspondientes tiempos de retención de cada éster metílico y en la figura III.17 se muestra un cromatograma típico con las condiciones cromatográficas óptimas.

Tabla III.12.- Tiempos de retención de los ésteres metílicos estudiados.

Éster Metílico	Tiempo de retención
Ácido Cáprilico	3.753
Ácido Cáprico	4.892
Ácido Láurico	5.878
Ácido Mirístico	6.748
Ácido Palmítico	7.527
Ácido Oléico	8.193
Ácido Esteárico	8.304
Ácido Aráquico	9.198
Ácido Behénico	10.397

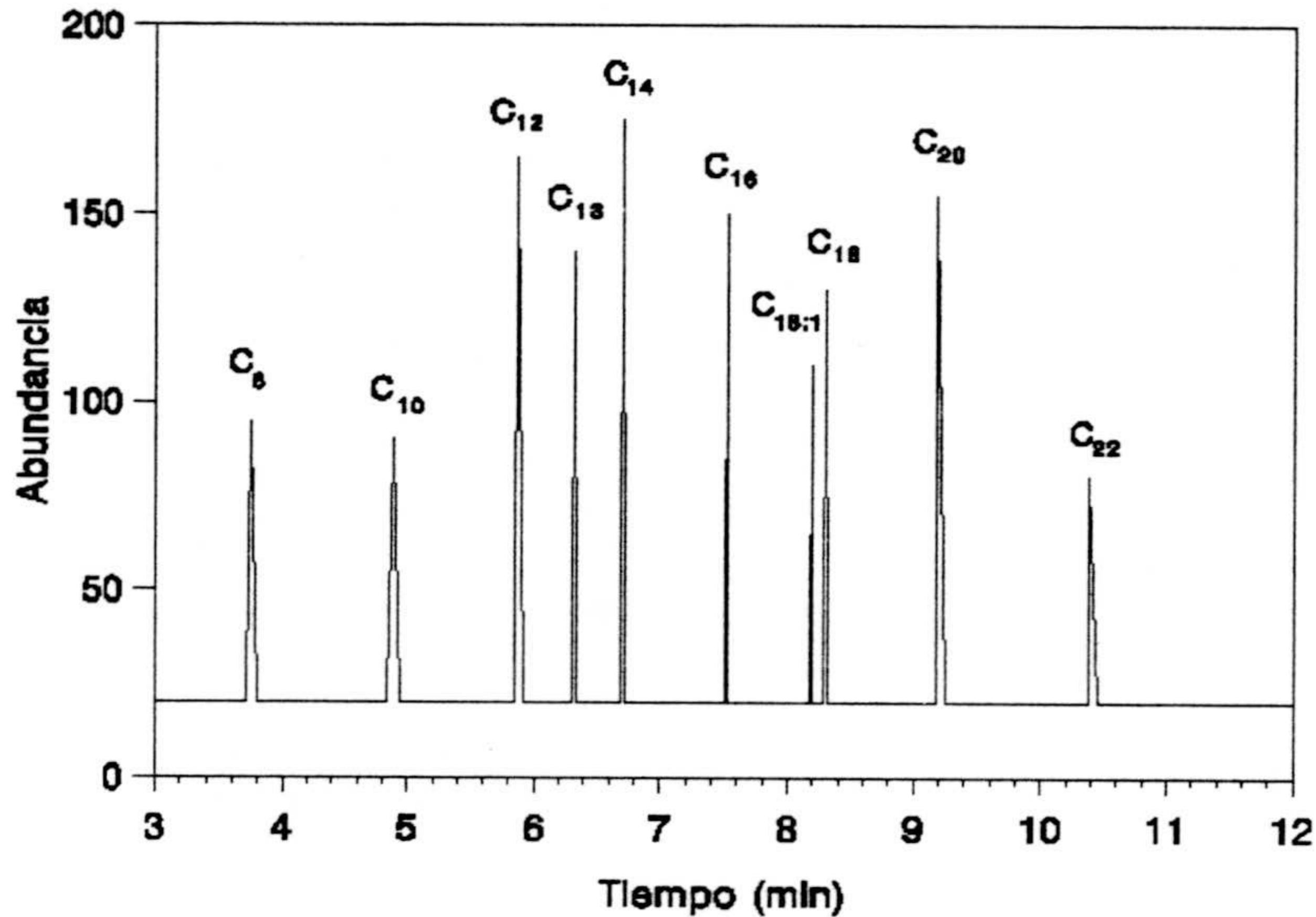


Figura III.17.- Cromatograma óptimo para los ésteres metílicos estudiados.

Como se observa hemos conseguido la separación óptima de todos los ésteres metílicos, incluso de los isómeros esteárico y oléico. Como vemos el orden de elución está íntimamente relacionado con sus pesos moleculares, ya que a menor peso molecular, menor tiempo de retención. Con respecto a los isómeros, el primero que eluye de los dos es el que posee el doble enlace lo que se corresponde con lo descrito por .....(ref).

## 2.3.- Optimización de variables asociadas al detector de masas.

### 2.3.1.- *Temperatura de la interfase GC/MS.*

La función de la interfase situada entre la columna y el detector, es introducir los analitos que emergen de la columna dentro de la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Nuestra interfase es de las denominadas de entrada directa, ya que toda lo que sale de la columna cromatográfica entra en la cámara de ionización. Su temperatura debe mantenerse constante en un valor adecuado por las siguientes razones:

2.3.1.1.- Se debe evitar la condensación de los analitos a la salida de la columna.

2.3.1.2.- La eficiencia de la ionización que se produce en el espectrómetro de masas depende de la temperatura, aunque en menor grado que de la energía de los electrones ionizantes. La interfase calienta por convección la cámara de ionización, así como el resto de componentes del detector. Por tanto controlando ésta, controlaremos la temperatura a la que se realiza la ionización.

Para estudiar la temperatura óptima de la interfase se ha analizado una disolución que contenía  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente

esterificado, observando la respuesta del detector al variar la temperatura de la interfase entre 250 y 300 °C. En la tabla III.13 y en las figuras III.18, III.19 y III.20 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla II.13.-** Influencia de la temperatura de la interfase GC/MS.

ÉSTERES METÍLICOS	Temperatura de la interfase (°C)					
	250	260	270	280	290	300
Ácido Caprílico	225	615	727	743	729	738
Ácido Cáprico	261	709	818	825	821	827
Ácido Laurico	252	658	765	770	772	768
Ácido Mirístico	257	687	781	801	795	805
Ácido Palmítico	248	645	743	762	768	763
Ácido Estearico	235	580	698	715	713	720
Ácido Oleico	253	654	763	781	779	785
Ácido Aráquico	209	511	621	644	648	640
Ácido Behénico	193	438	578	600	605	595

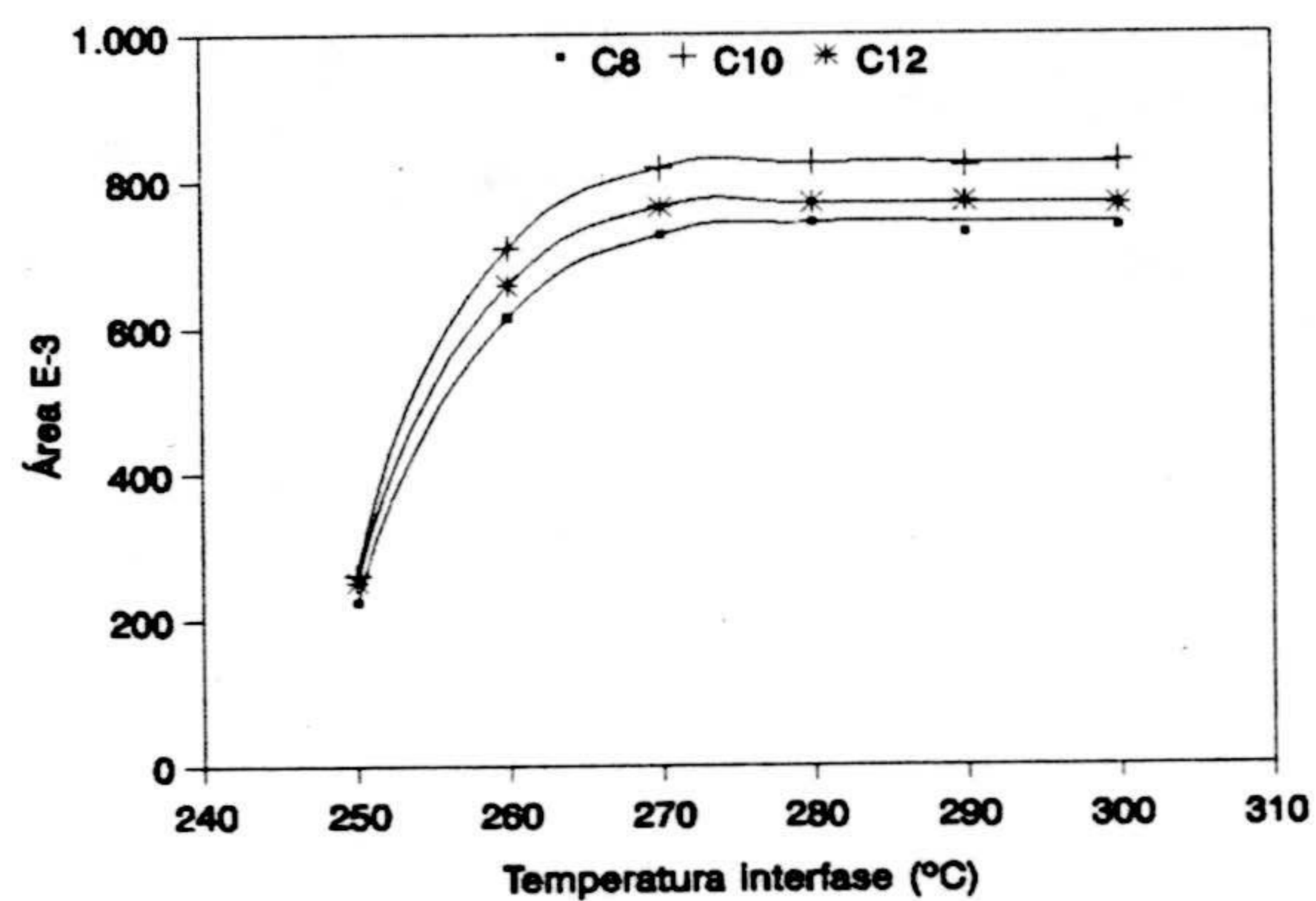


Figura III.18.- Influencia de la temperatura de la interfase en el área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>.

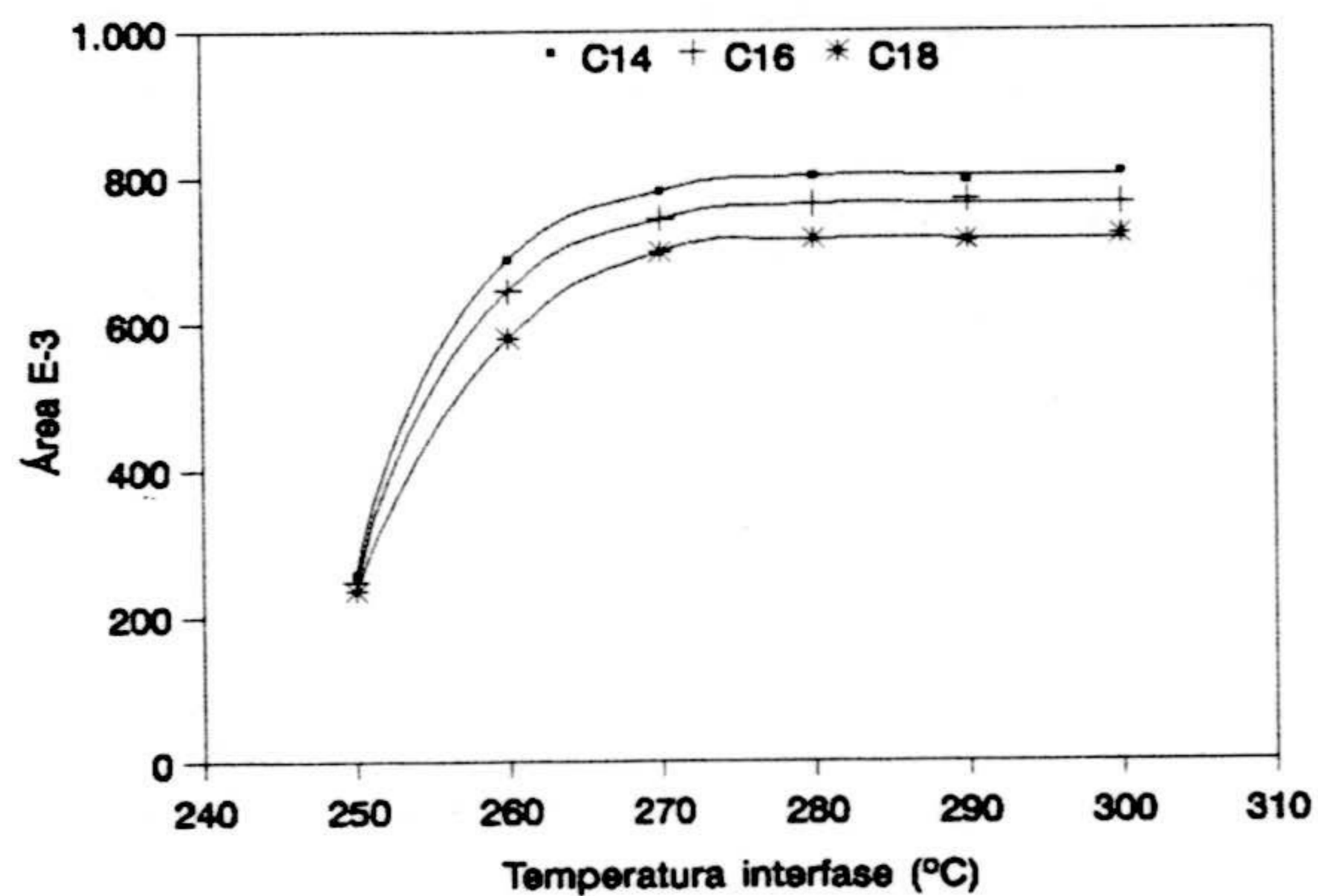
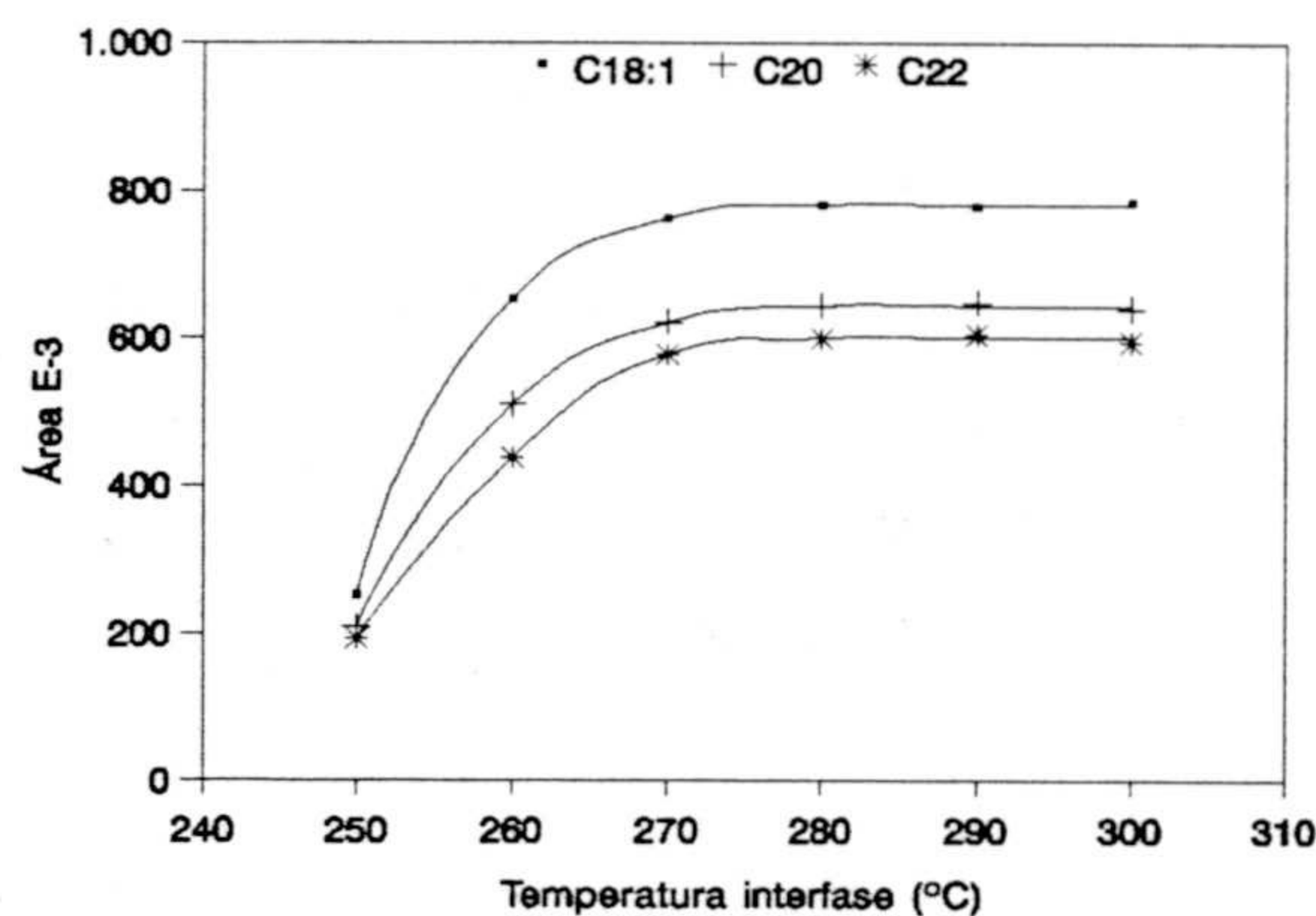


Figura III.19.- Influencia de la temperatura de la interfase en el área de los ésteres metílicos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>.



**Figura III.20.-** Influencia de la temperatura de la interfase en el área de los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ .

Los datos obtenidos indican que al aumentar la temperatura de la interfase aumenta la sensibilidad del detector. Se observa además que a  $280^{\circ}\text{C}$ , la respuesta del detector se estabiliza, por lo que hemos elegido esta temperatura como la óptima para las próximas experiencias.

### ***2.3.2.- Optimización de los parámetros instrumentales asociados a las medidas en modo SCAN.***

En modo Scan el detector realiza un barrido lineal en un rango de  $m/z$  previamente seleccionado por el operador, obteniéndose espectros de masas completos dentro de ese rango.

Las medidas de la abundancia de los iones en función de la razón masa/carga se realizan de forma discontinua en etapas de valor 0.125 m/z. Si la abundancia de un ion es mayor que un valor prefijado (valor umbral de detección), el dato es almacenado en la memoria del ordenador y por tanto, al final del barrido, tendremos un espectro de masas completo que se traduce en un punto del cromatograma. Al cabo de un tiempo, llamado tiempo de borrado, se inicia un nuevo barrido que conduce a la obtención de un nuevo espectro de masas.

El tiempo de barrido viene determinado por los parámetros seleccionados para realizar el análisis, siendo necesario seleccionar estos parámetros juiciosamente, pues de ello depende la calidad del cromatograma y de los espectros de masas. Realizando barridos rápidos, se obtienen espectros de masas de mala calidad y en cambio picos cromatográficos bien definidos por muchos puntos o espectros. En cambio, realizando barridos lentos se obtienen espectros de calidad, pero los picos cromatográficos quedan pobremente definidos a través de pocos puntos.

El tiempo de barrido para el espectrómetro de masas HP5970A, depende de tres factores:

- Número de medidas realizadas de cada ion.
- Rango de masas estudiado.
- Número de valores m/z medidos durante el barrido.

Una estimación del tiempo de barrido en milisegundos viene dada por la ecuación:

$$\text{Tiempo de barrido} = (Q \times 2^N) \times (M_2 - M_1) + 0.07 P_{m/z}$$

siendo:

$Q$ , coeficiente que en el HP5970A vale 0.43.

$2^N$ , número de veces que se mide la abundancia de una masa en particular antes de pasar a la siguiente masa.  $N$  puede tomar valores entre 0 y 7.

$(M_2 - M_1)$ , rango de masa que debe ser medido.

$P_{m/z}$ , número de iones medidos dentro del rango de masa/carga estudiado. Este número es tanto mayor cuanto menor sea el valor prefijado como umbral de detección.

Otros parámetros importantes del espectrómetro de masas, que afectan a la señal analítica son el voltaje del detector electrón- multiplicador y el tiempo de borrado del disolvente o tiempo que debe estar desconectado el detector.



---

Resumiendo podemos decir que un análisis por espectrometría de masas debe tener en cuenta los siguientes parámetros:

- Rango masa/carga del espectro de masas.
- Número de medidas de cada ion.
- Valor umbral de detección (Scan Threshold).
- Voltaje del electrón-multiplicador.
- Tiempo de borrado del disolvente.

A continuación vamos a optimizar cada parámetro para el análisis de ácidos grasos, previa esterificación.

#### **2.3.2.1.- Rango m/z del espectro de masas.**

El rango vendrá dado por los valores superior e inferior del espectro de masas de trabajo.

El rango a estudiar debe ser seleccionado para hacerlo coincidir con la zona que genera mayor información analítica, sin ampliarlo innecesariamente porque aumentaría el tiempo de barrido, afectando a la calidad de la señal analítica.

El límite inferior a ser posible debe evitar las masas 18, 28, 32 y 44, correspondientes a H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> respectivamente. Proceden de trazas de aire y humedad y si no suprimimos esta zona de masas bajas, se originará un ruido de fondo en el cromatograma que afectará a la reproducibilidad de la señal. Por esta razón hemos seleccionado un valor mínimo de 50 u.m.a., ya que además por debajo de este valor no hay información de interés en los ácidos grasos previamente esterificados, ya que el fragmento de interés más pequeño es el 55 m/z.

El límite superior del rango de masas dependerá de los pesos moleculares de los ésteres de los ácidos grasos, que son los que se muestran en la tabla III.14.

**Tabla III.14.-** Pesos moleculares de los ésteres metílicos estudiados.

<b>Ester Metílico</b>	<b>Peso Molecular</b>
Ácido Cáprilico	158.129
Ácido Cáprico	186.161
Ácido Láurico	214.192
Ácido Mirístico	242.223
Ácido Palmítico	270.254
Ácido Oléico	296.269
Ácido Esteárico	298.286
Ácido Aráquico	326.317
Ácido Behénico	354.348

A la vista de los pesos moleculares , hemos seleccionado un límite superior de 400 u.m.a.

### 2.3.2.2- Número de medidas de cada ión.

Es el número de veces que el detector mide la abundancia de una masa particular con objeto de obtener un valor medio más exacto de las medidas realizadas. El número de medidas realizadas es  $2^N$ , donde N puede tomar valores entre 0 y 7.

El número de medidas de cada ion es un parámetro importante porque afecta al tiempo de barrido y por tanto a la resolución del cromatograma. Si N tiene un valor elevado, el tiempo de barrido también lo es de manera que el pico cromatográfico queda definido por pocos puntos y su área es poco reproducible. Por el contrario, si N es pequeño, el pico cromatográfico estará definido por muchos puntos pero poco precisos por ser también imprecisa la medida que se obtiene a través de un grupo de medidas repetitivas poco numeroso.

La influencia de N en la resolución del pico cromatográfico se ha establecido analizando una disolución de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente esterificado, a diferentes valores de N. Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.15, en la que  $\Delta t$  es el tiempo que se tarda en

representar un punto del cromatograma.

**Tabla III.15.-** Influencia de N en el cromatograma.

ÉSTERES METÁLICOS	Influencia de N								
	N	0	1	2	3	4	5	6	7
	$\Delta t$ (s)	0.25	0.45	0.65	1.03	1.79	3.33	6.66	12.5
Ácido Cáprilico	----	450	650	743	675	----	----	----	----
Ácido Cáprico	----	550	713	825	781	----	----	----	----
Ácido Láurico	----	508	687	770	715	----	----	----	----
Ácido Mirístico	----	523	715	801	735	----	----	----	----
Ácido Palmítico	----	500	671	762	702	----	----	----	----
Ácido Oléico	----	427	621	715	658	----	----	----	----
Ácido Esteárico	----	511	674	781	712	----	----	----	----
Ácido Aráquico	----	410	537	644	598	----	----	----	----
Ácido Behénico	----	389	498	600	525	----	----	----	----

Cuanto menor sea el valor de  $\Delta t$ , mayor será la resolución del cromatograma si bien la reproducibilidad del pico cromatográfico no será la más adecuada. Se observa en la tabla que en algunos casos no se pudieron medir las áreas de los picos debido a la forma confusa del cromatograma. En las figuras III.21, III.22 y III.23 se han representado el área del pico cromatográfico (promedio de cinco réplicas) y en las figuras III.24, III.25 y

III.26 se han representado la DSR (%) en función de N, obteniéndose curvas en las que se observa que el valor de N=3 es el más adecuado en todos los casos para el análisis.

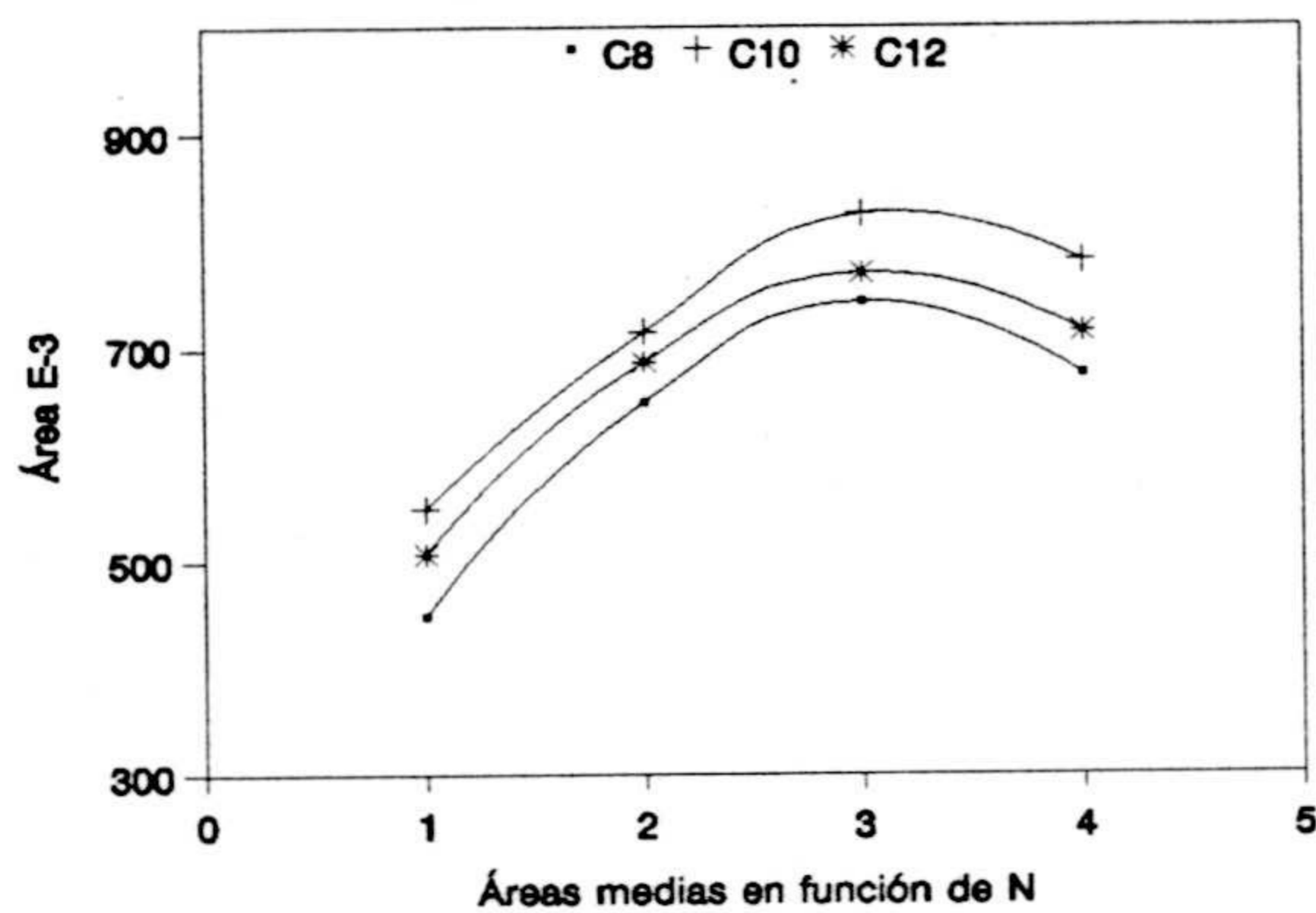


Figura III.21.- Influencia de N en el área de los ésteres metílicos  $C_8$ ,  $C_{10}$  y  $C_{12}$ .

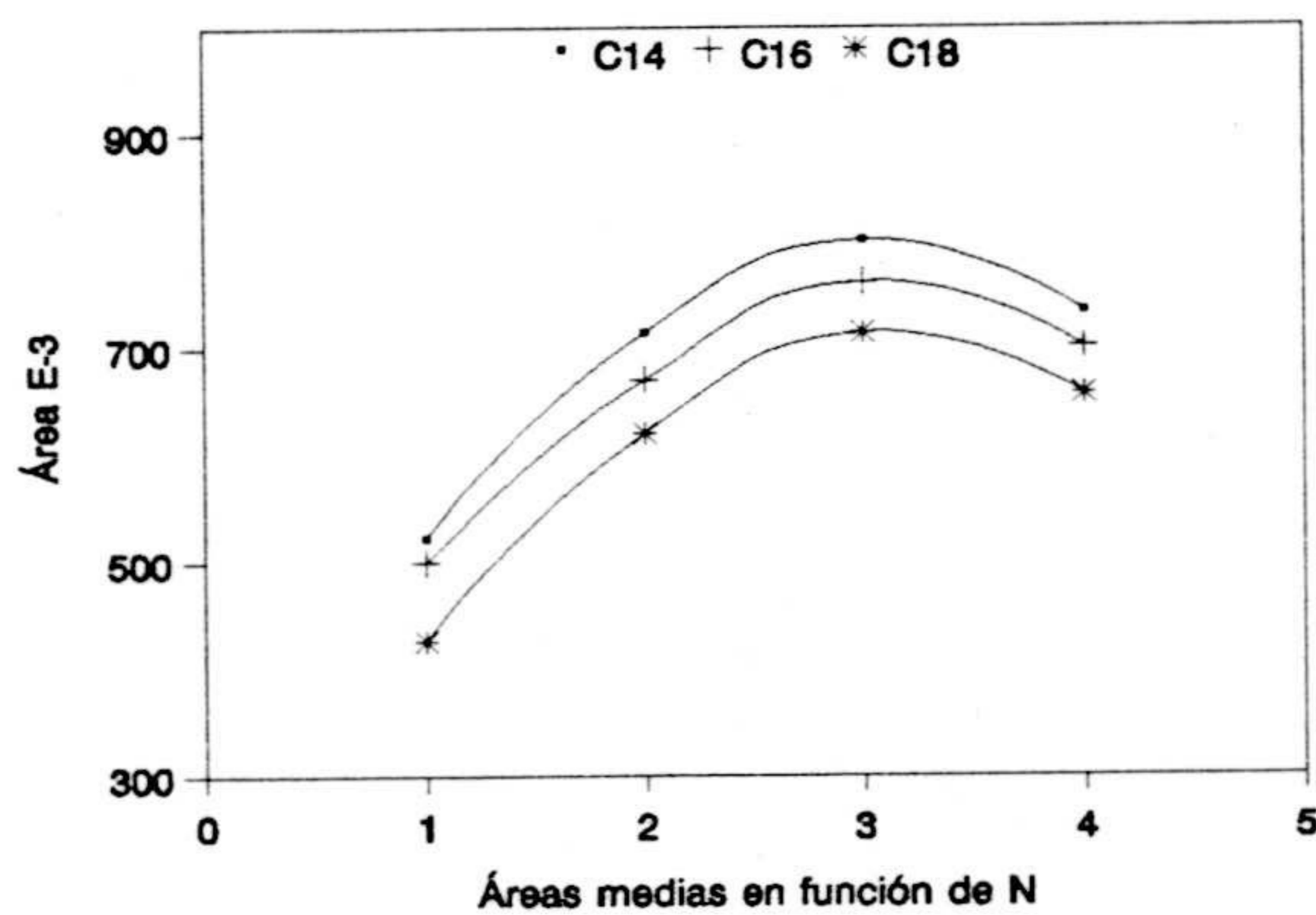


Figura III.22.- Influencia de N en el área de los ésteres metílicos  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18}$ .

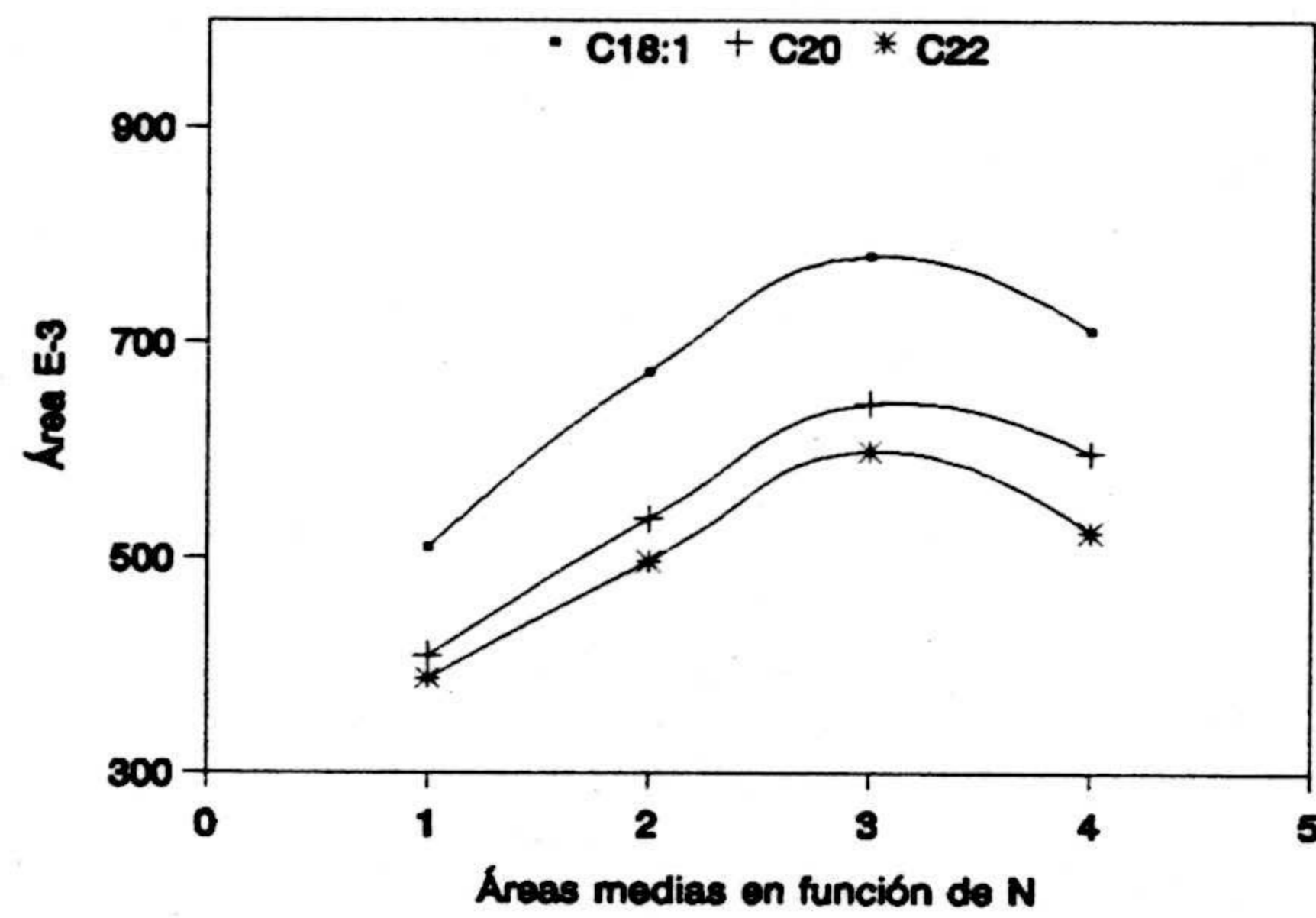


Figura III.23.- Influencia de N en el área de los ésteres metílicos C<sub>18:1</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>.

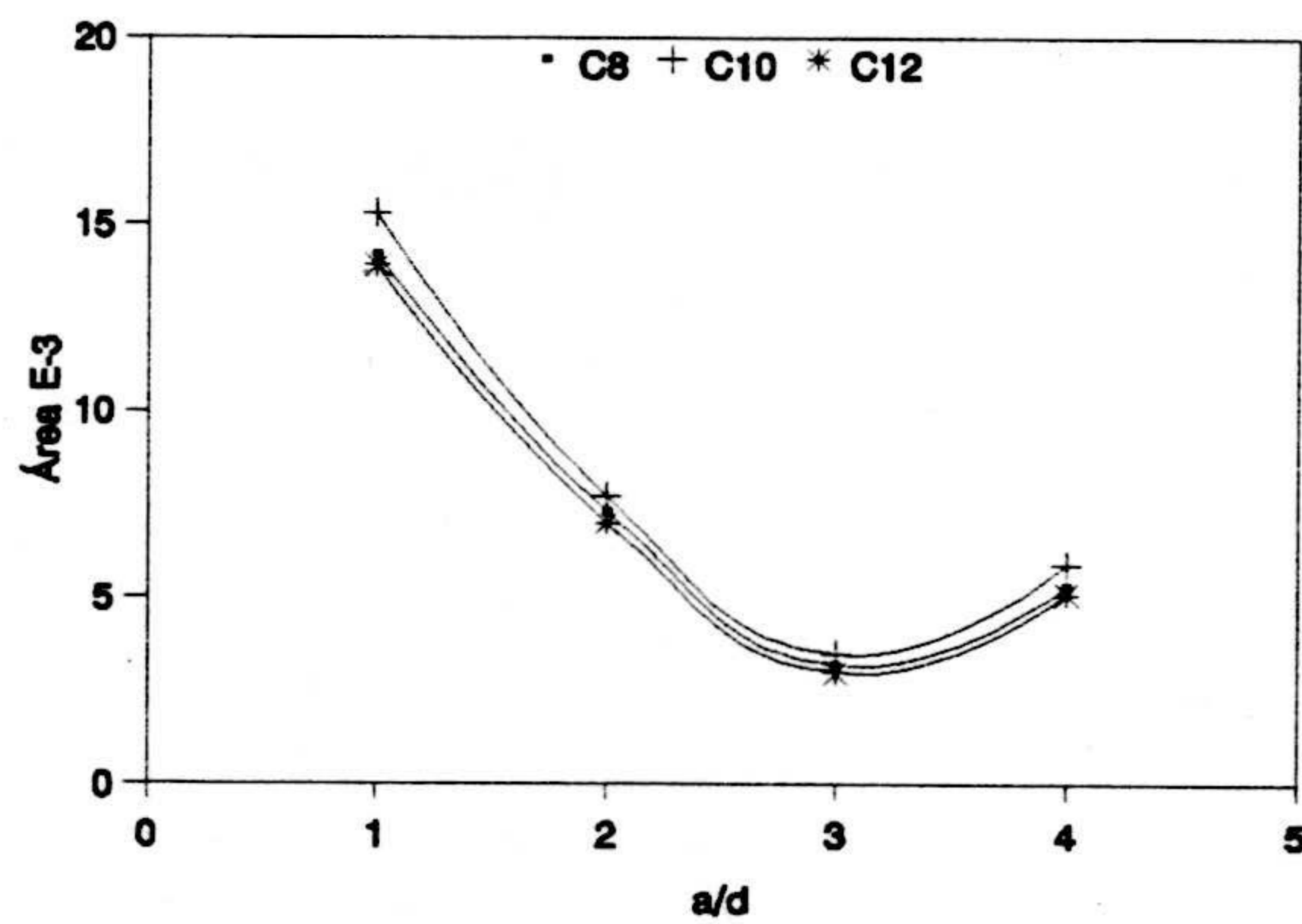


Figura III.24.- DSR en función de N para los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>

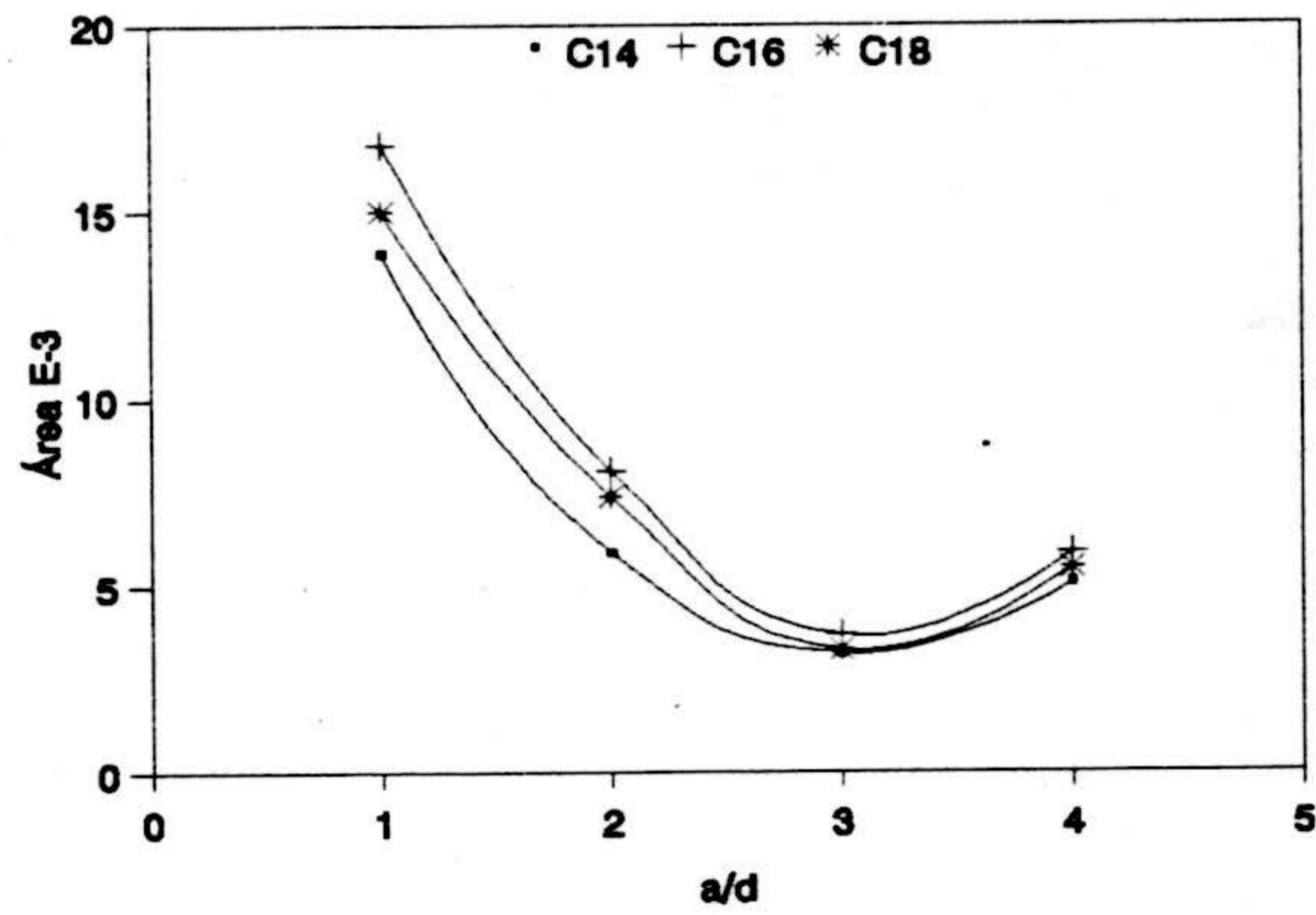


Figura III.25.- DSR en función de N para los ésteres metílicos  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18}$ .

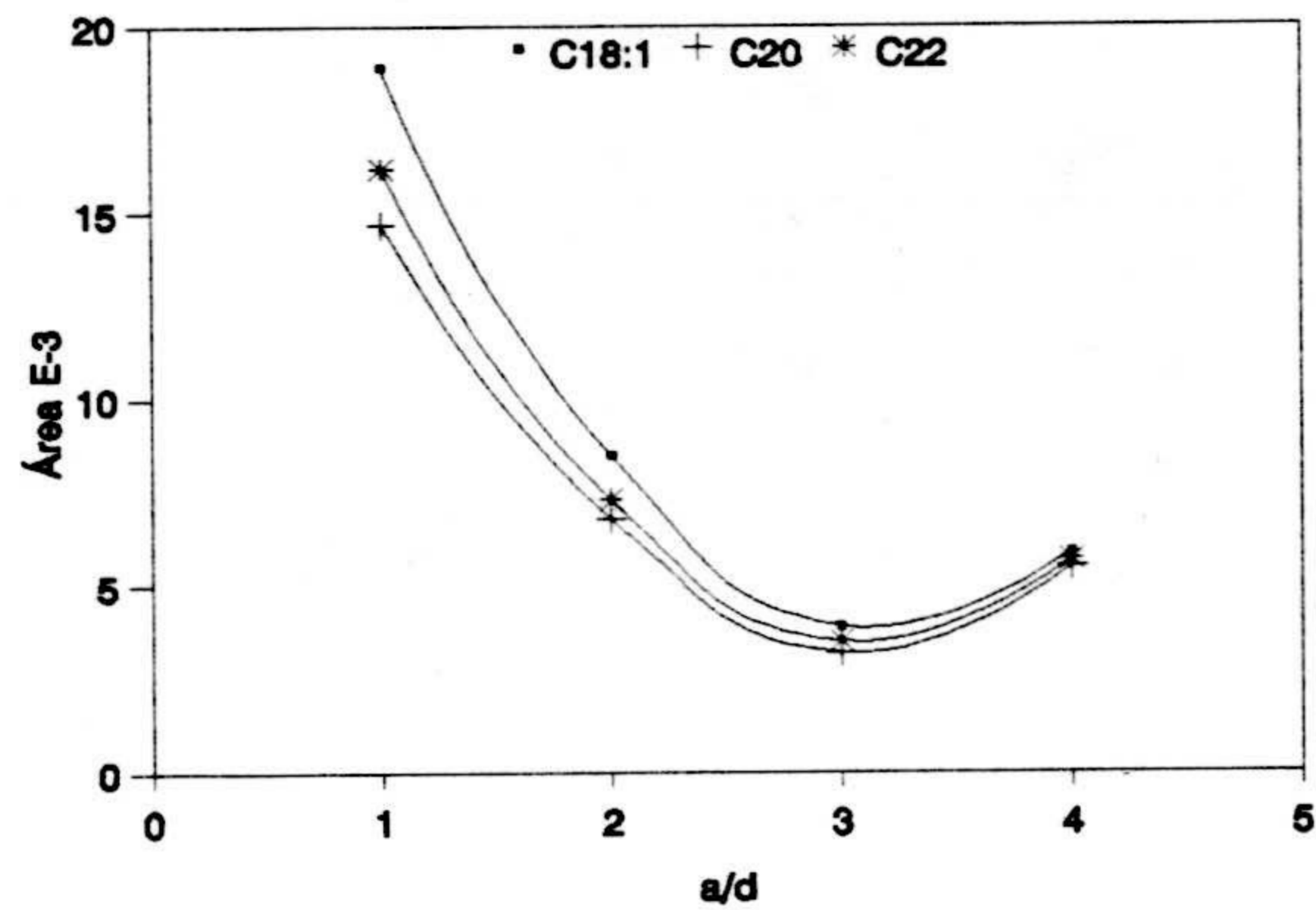


Figura III.26.- DSR en función de N para los ésteres metílicos  $C_{18:1}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ .

En la figuras III.27, III.28 y III.29 se muestran los cromatogramas obtenidos con diferentes valores de N.

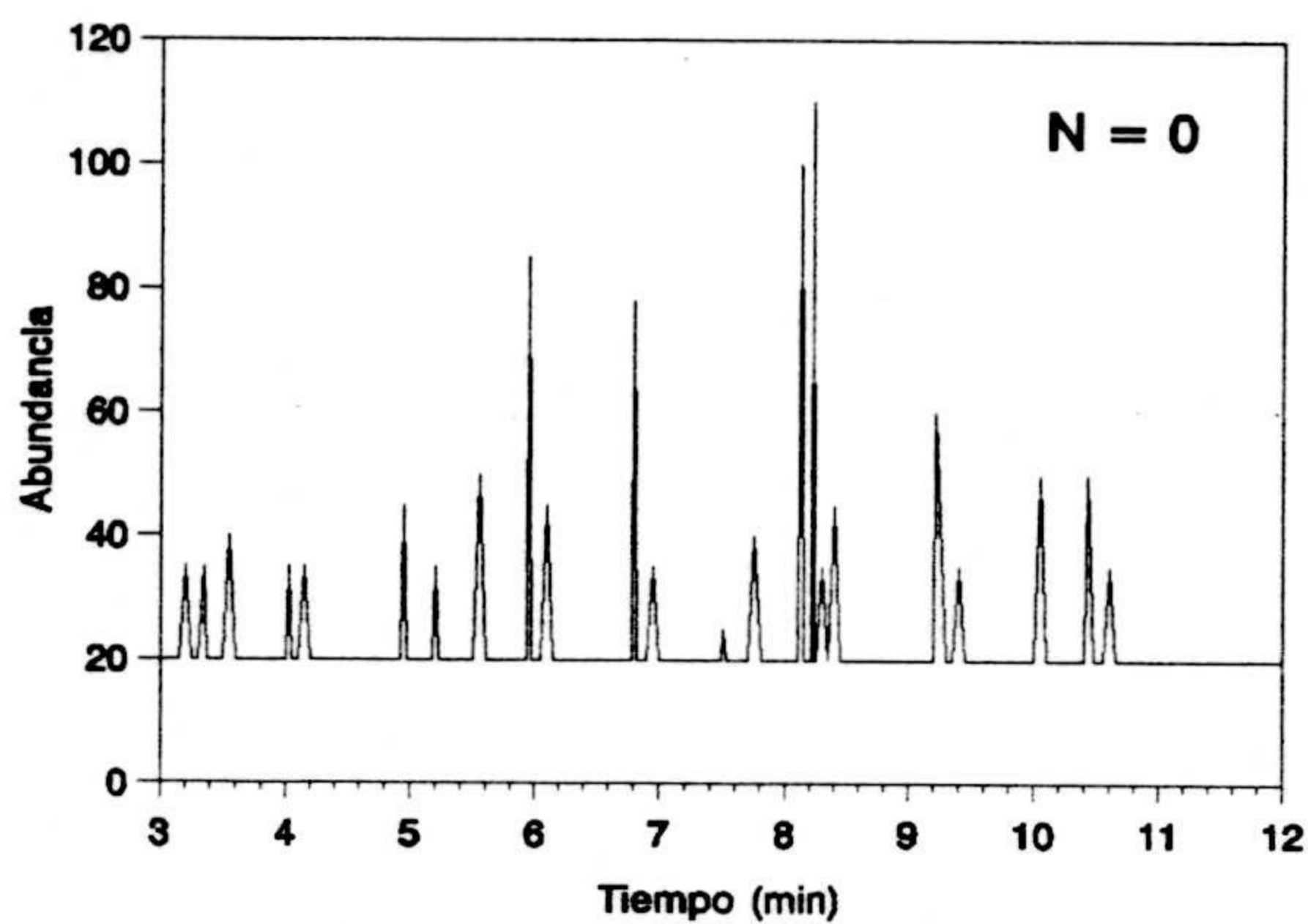


Figura III.27.- N = 0.

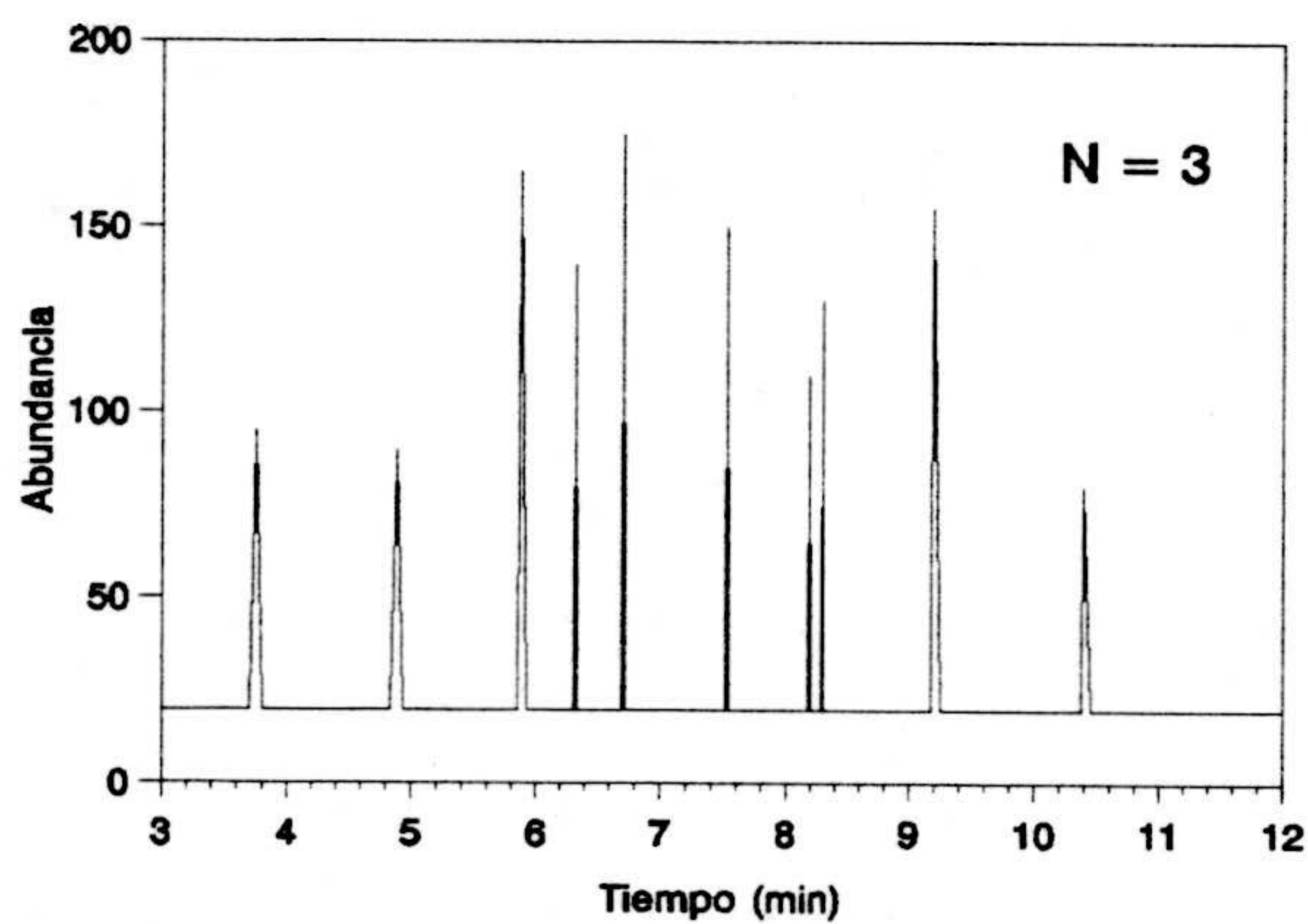


Figura III.28.- N = 3.



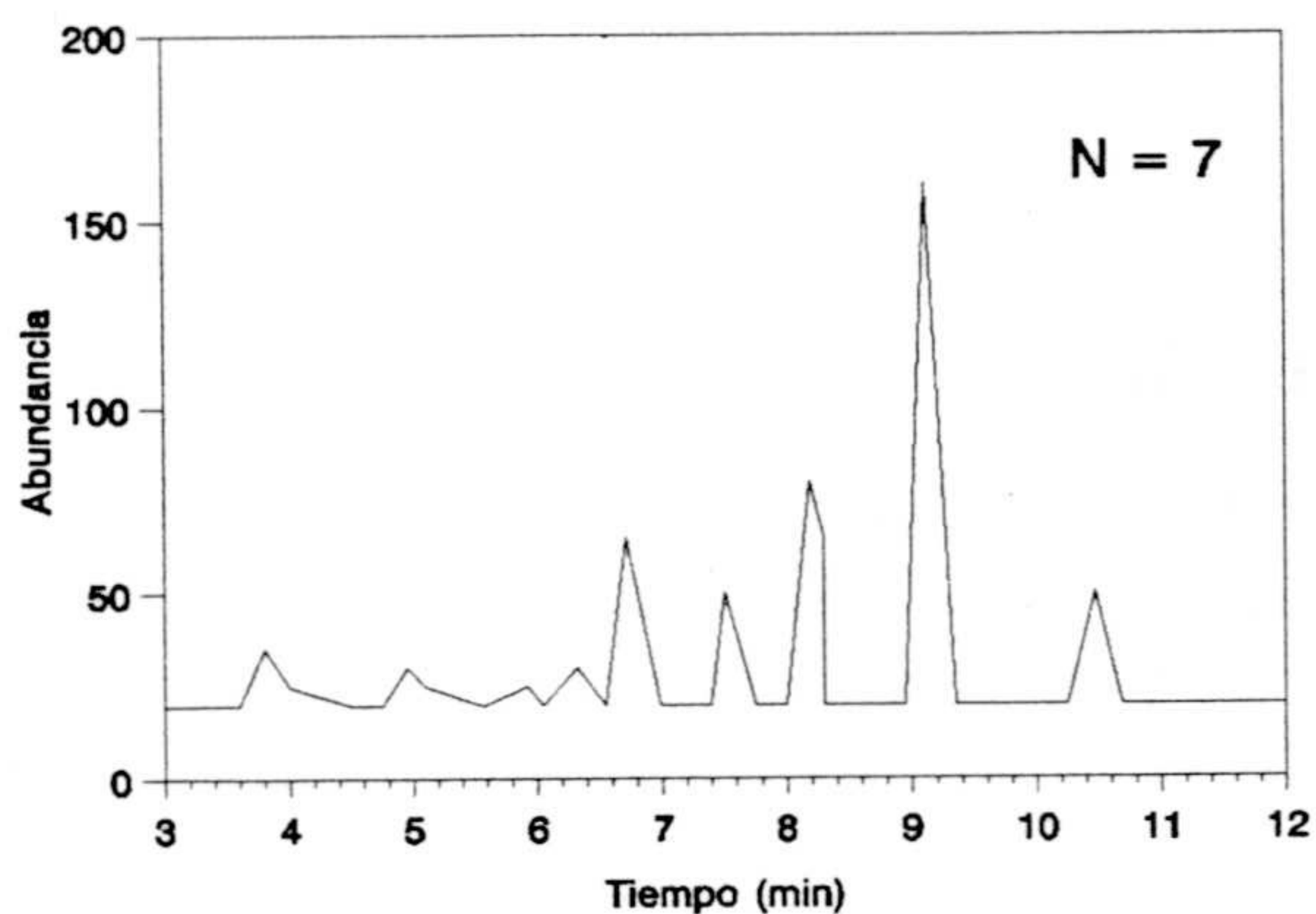


Figura III.29.- N = 7.

### 2.3.2.3.- Valor umbral de detección.

El valor umbral de detección (Scan Threshold) es la menor abundancia que debe poseer un ion determinado para que sea considerado como existente.

Un valor umbral bajo origina espectros de mala calidad, ya que contienen muchos fragmentos de poca intensidad que no proceden de los analitos estudiados. Además, se observa que el cromatograma tiene un ruido de fondo alto, debido a la contribución a la señal de todos esos pequeños fragmentos, con lo que la relación señal/ruido será pequeña. Por el contrario

si fijamos un valor umbral elevado, el detector rechazará fragmentos que contienen información analítica al proceder éstos de nuestros compuestos de interés.

Para optimizar el valor umbral, hemos analizado una disolución que contiene  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente esterificado, a distintos voltajes del electrón-multiplicador. Para estas experiencias se ha seleccionado un valor umbral de 10, valor muy bajo para que el detector no rechace ninguna de las medidas efectuadas.

Para seleccionar el valor umbral óptimo a cada voltaje del electromultiplicador, se ha tomado un espectro de masas correspondiente a un punto de la línea base del cromatograma y hemos elegido aquel valor umbral que elimine la mayor parte del ruido de fondo. En la figura III.30 se muestra el espectro de masas correspondiente a un punto de la línea base del cromatograma, estando el voltaje del electrón-multiplicador a 1800 V.

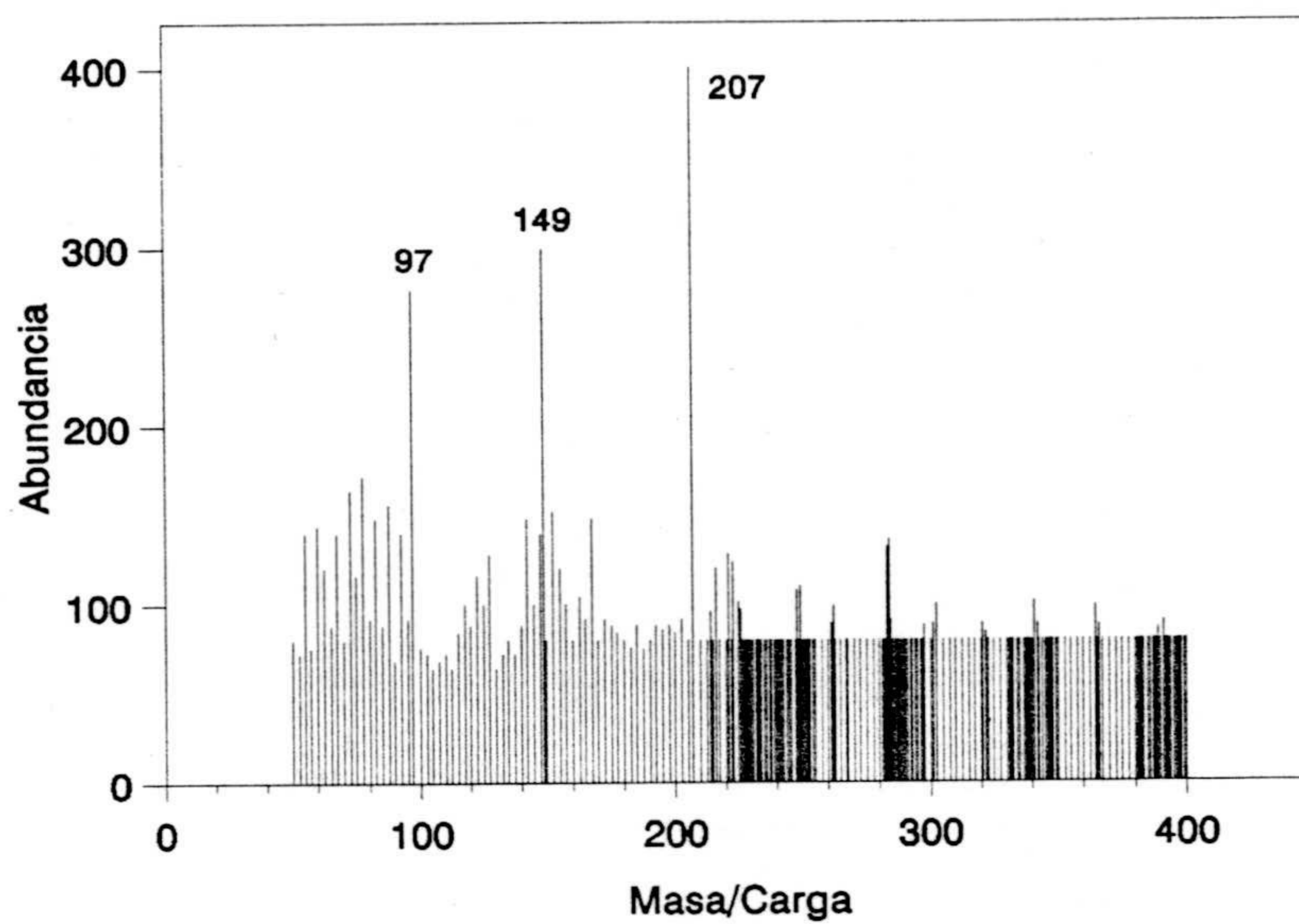
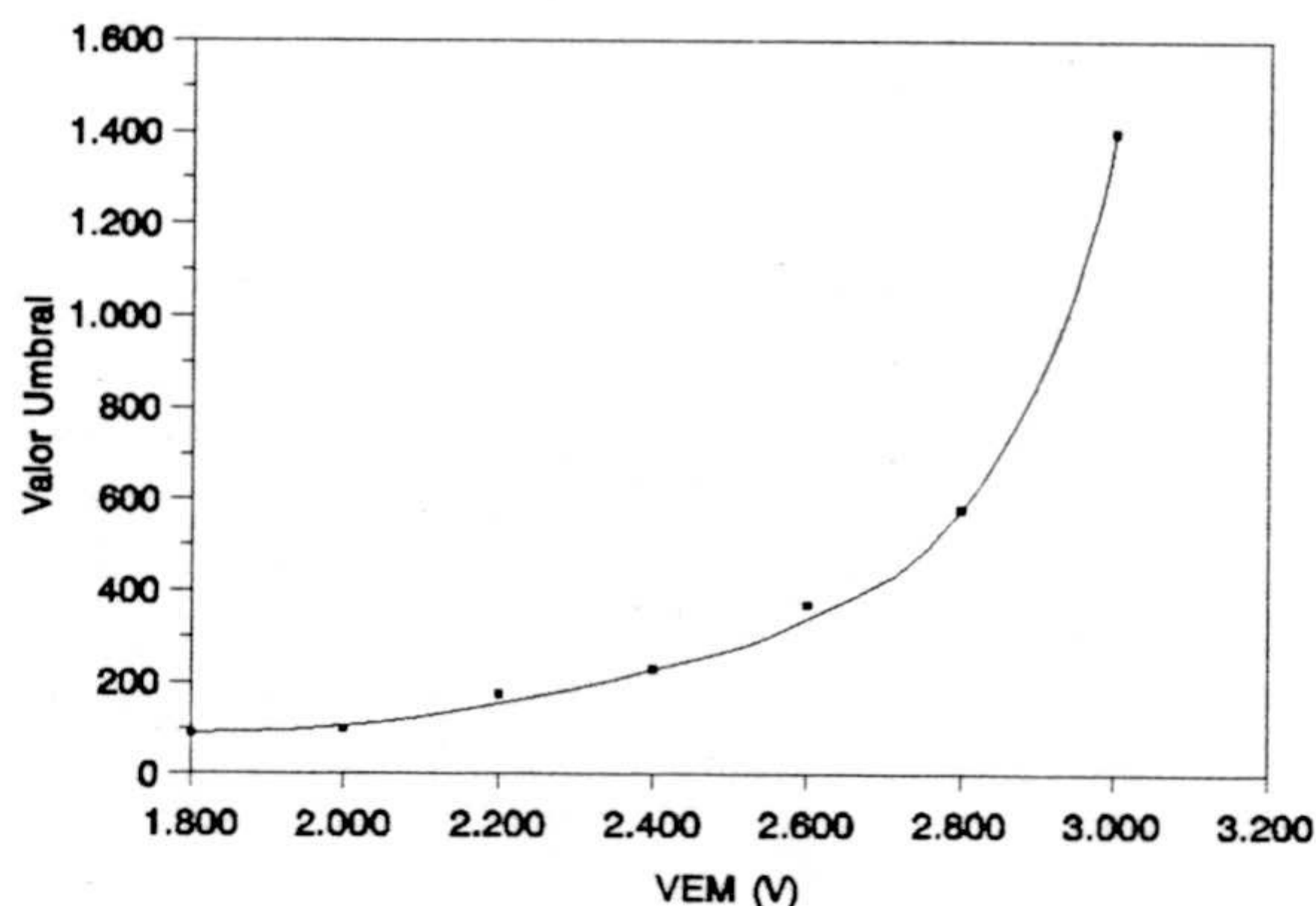


Figura III.30.- Espectro de masas en un punto de la linea base con VEM a 1800 V.

En la figura III.31 se ha representado el valor umbral seleccionado en función del voltaje aplicado al electrón-multiplicador.



**Figura III.31.-** Valor umbral seleccionado en función del VEM.

Al estar el voltaje habitual de trabajo del electrón-multiplicador comprendido entre 2200-2400 V, hemos seleccionado un valor umbral de 250 para la realización de posteriores experiencias.

#### **2.3.2.4.- Voltaje del electrón-multiplicador**

La señal generada por el detector es proporcional a la concentración de analito y a la amplificación de la señal que viene dada por el voltaje aplicado al electrón-multiplicador.

En la tabla III.16, así como en las figuras III.32, III.33 y III.34 se ha representado el área correspondiente a una concentración de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente esterificado en función del voltaje aplicado al electrón multiplicador.

**Tabla III.16.-** Influencia del VEM.

ÉSTERES METÍLICOS	Voltaje Electrón-Multiplicador (V)					
	2000	2200	2400	2600	2800	3000
Ácido Caprílico	756	850	1890	3420	4825	6325
Ácido Cáprico	831	935	2101	3721	5134	6622
Ácido Laurico	775	895	1995	3573	4992	6432
Ácido Mirístico	787	905	1915	3495	5013	6391
Ácido Palmítico	731	824	1823	3410	4817	6231
Ácido Esteárico	705	793	1750	3283	4728	6105
Ácido Oleico	782	911	2126	3613	5101	6498
Ácido Aráquico	638	752	1685	3102	4531	5889
Ácido Behénico	595	710	1572	2996	4319	5717

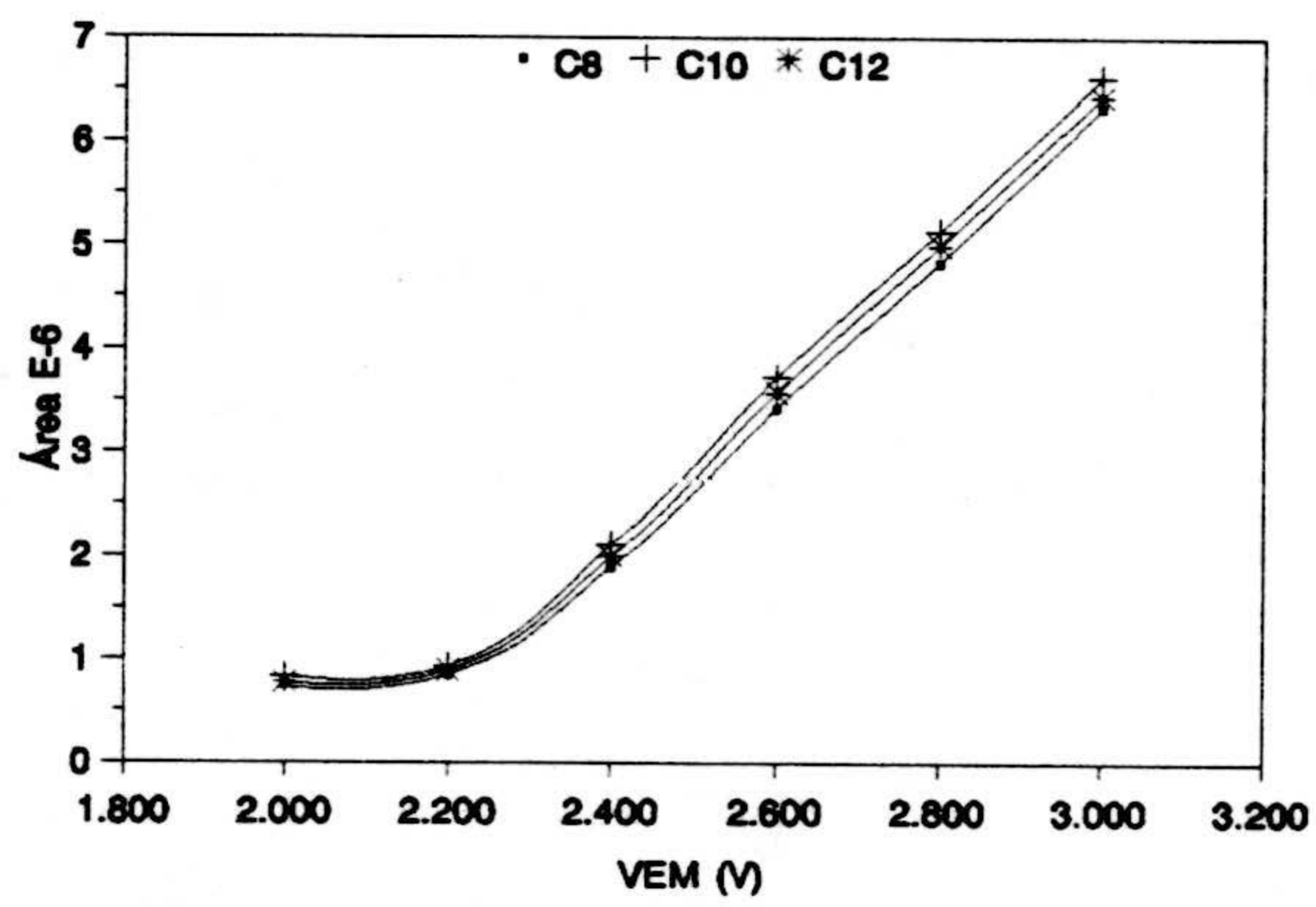


Figura III.32.- Influencia del VEM en el área de los ésteres metílicos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub>.

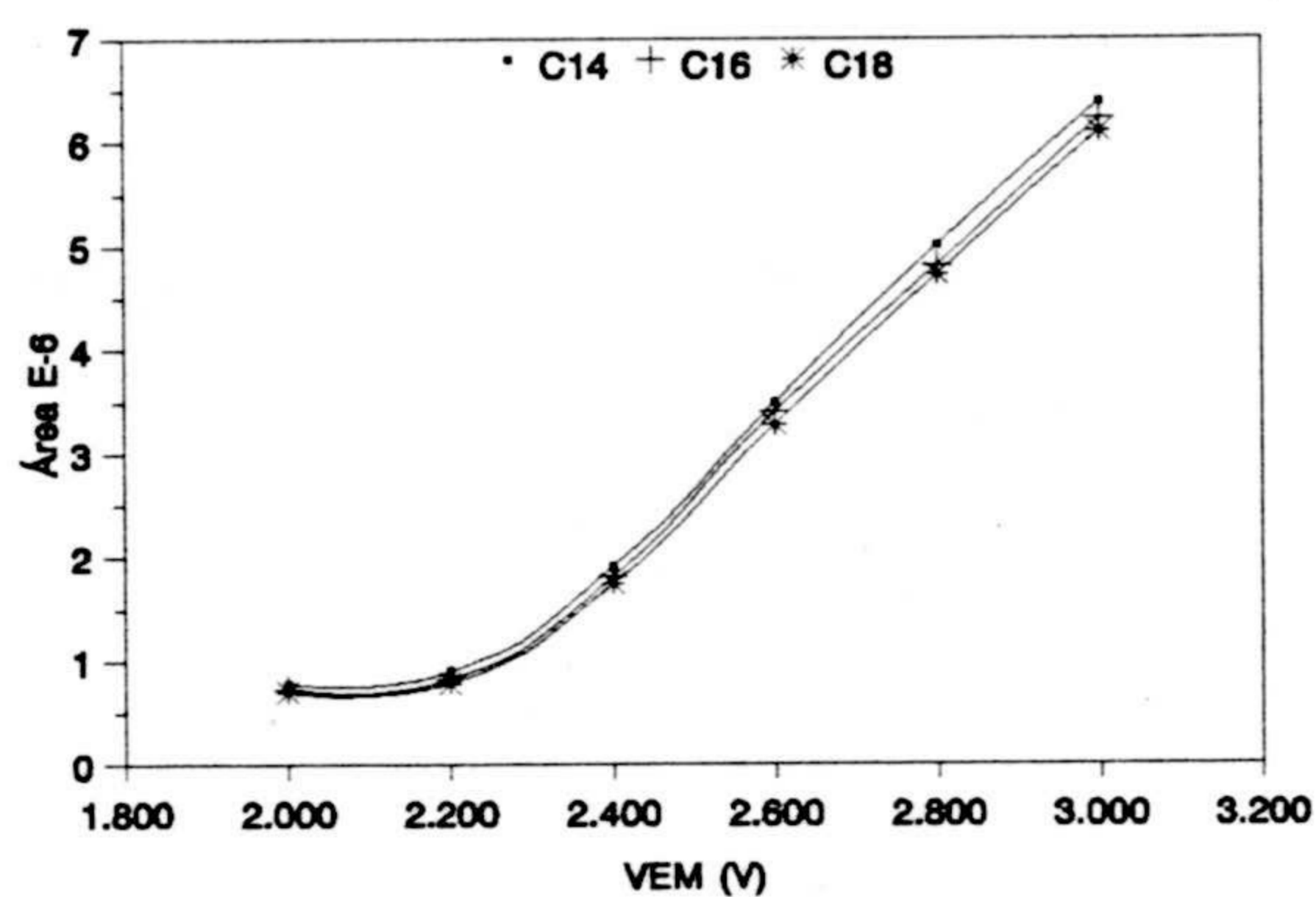


Figura III.33.- Influencia del VEM en el área de los ésteres metílicos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>.

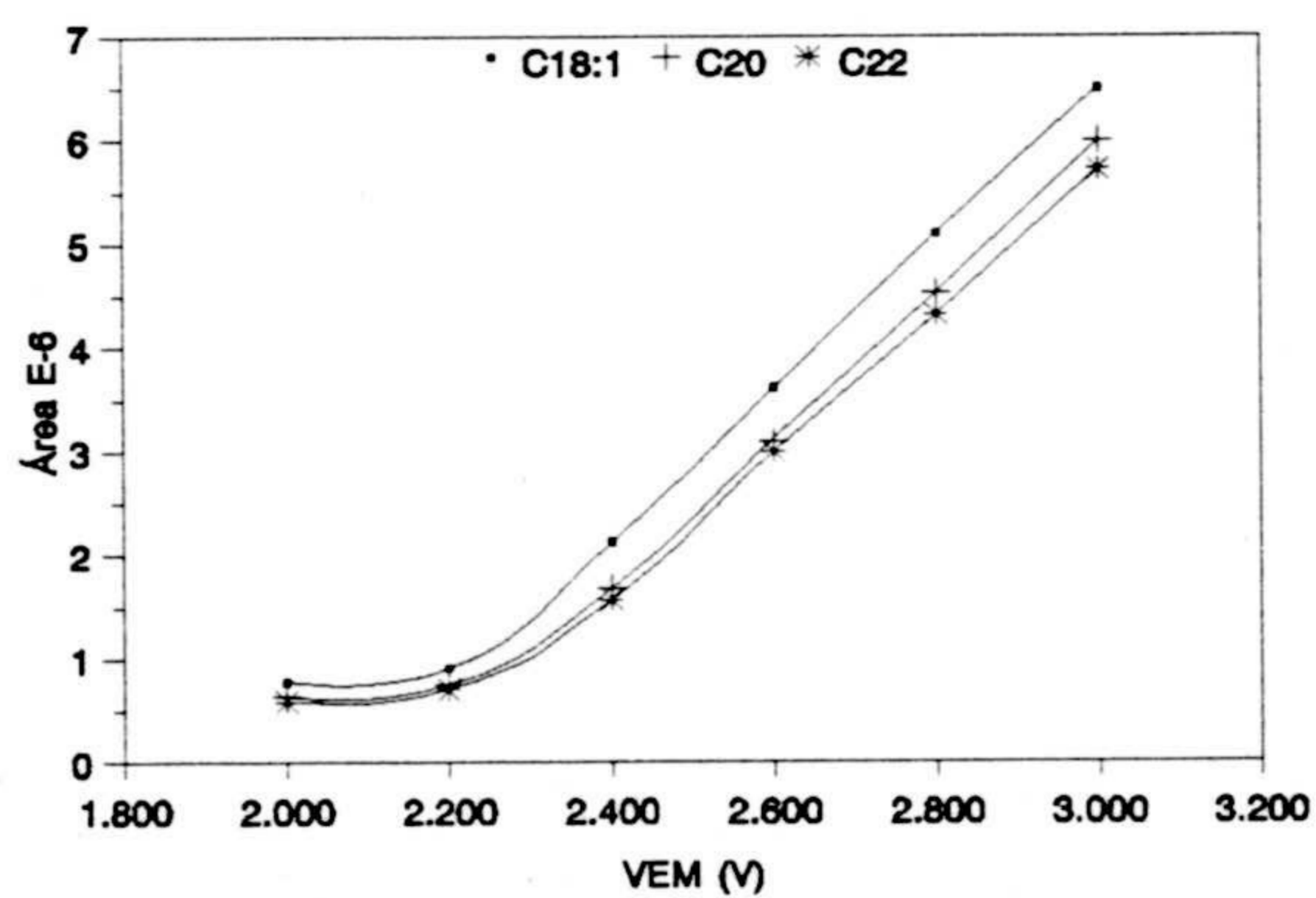


Figura III.34.- Influencia del VEM en el área de los ésteres metílicos C<sub>18:1</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>.

Se observa que la intensidad de la señal obtenida aumenta con el voltaje aplicado al electrón-multiplicador. Se puede operar seleccionando un VEM determinado o dejar que el aparato lo ajuste automáticamente. En el segundo caso, el detector modifica automáticamente su voltaje hasta conseguir que la abundancia del ion  $m/z$  69 del perfluorotributilamina sea aproximadamente 250.000. Es conveniente operar con ajuste automático del voltaje porque a medida que disminuye la sensibilidad del detector (envejece), aumenta paralelamente el voltaje, con objeto que la señal analítica sea constante y reproducible. Algunas veces se producen subidas repentinas de VEM debido a suciedad de la fuente de ionización y no por envejecimiento del detector. Por este motivo es conveniente limpiar la fuente de ionización cuando tras un calibrado automático (Autotune), el VEM alcanza valores mayores a 2400 V. Si una vez realizada la limpieza continua alto el VEM, debemos contemplar la posibilidad de un envejecimiento del electrón-multiplicador.

#### **2.3.2.5.- Borrado del disolvente.**

El detector debe permanecer desconectado "ciego", mientras el disolvente pasa a través de éste. Si el detector se mantuviera conectado "leyendo", se saturaría la fuente de ionización al llegarle una gran cantidad de moléculas del disolvente, que provocarían una disminución drástica de vacío e incluso podrían dañar tanto el filamento encargado de generar los



electrones ionizantes como al medidor de vacío.

Para determinar el tiempo que tarda en salir el disolvente, se hacen distintas experiencias disminuyendo cada vez el tiempo de conexión del detector. La primera experiencia que detecte cola del disolvente nos indicará que el tiempo de conexión de la anterior experiencia será el adecuado para nuestro análisis.

Las experiencias realizadas en nuestro caso nos indican que el tiempo óptimo para la conexión del detector es de 3 minutos.

### **2.3.3.- Optimización de medidas en modo SIM.**

Cuando nosotros seleccionamos en el espectrómetro de masas esta modalidad de medida, éste solo mide unos determinados iones previamente seleccionados por nosotros ( Selected Ion Monitoring ), en lugar de realizar un barrido completo como en modo Scan.

El sistema de lectura en modo SIM ofrece las siguientes ventajas con relación al modo Scan:

- 1.- Disminuye el tiempo de barrido, ya que sólo se mide la abundancia de unos pocos iones.

2.- Aumenta la precisión de las medidas respecto al modo Scan, por dos motivos:

2.a.- Al ser mayor el número de veces que se repite la medida para un ion, la media de estas medidas será más precisa. Esto es posible porque al ser menor el número de iones a medir, se hace compatible realizar muchas medidas repetitivas con un tiempo de barrido corto.

2.b.- Como la señal final es la suma de las abundancias de los iones seleccionados para el análisis, existe menos probabilidad que en esta suma entren a formar parte abundancias de otros iones que aleatoriamente se encuentren en el detector.

3.- Mejor definición del pico cromatográfico porque el modo SIM viene delimitado por un mayor número de puntos al ser pequeño el tiempo de barrido. Como las medidas de las abundancias son más precisas y además el pico está mejor definido, será también mejor la precisión en la medida del área.

4.- Mayor sensibilidad analítica. Aun siendo la pendiente del calibrado mayor en modo Scan (medimos abundancias de un mayor número de iones), la desviación estandar del calibrado ( $S_{R,C}$ ) en modo SIM es menor que en modo Scan, por lo que el cociente  $S_{R,C} / b$  es menor en modo SIM, por lo que la sensibilidad analítica en modo SIM a partir de los datos del calibrado es más favorable.

5.- Mejora la selectividad de la determinación en el caso de compuestos eluidos con el mismo tiempo de retención. Esta mejora se debe a que el detector sólo mide los fragmentos característicos del compuesto de interés, eliminando por completo las posibles interferencias causadas por fragmentos comunes de otros compuestos que coeluyan con nuestro analito.

En modo de trabajo SIM utilizamos parámetros comunes con el modo de trabajo Scan. Éstos son el tiempo de borrado del disolvente y el voltaje aplicado al electrón-multiplicador. El tiempo de borrado es el mismo porque depende de las condiciones cromatográficas y éstas no varían de un modo de trabajo a otro. El VEM se ajusta automáticamente para mantener constante la respuesta del detector. Los parámetros específicos del modo SIM son los siguientes:

- 1.- Los iones seleccionados para el análisis de cada compuesto.
- 2.- Iniciación del análisis de cada ión.
- 3.- El tiempo de medida de cada ion (Dwell Time).

#### **2.3.3.1.- Iones seleccionados para el análisis.**

Para seleccionar los iones característicos de cada compuesto hay que tener en cuenta dos factores:

- Seleccionaremos aquellos fragmentos del compuesto que tengan una abundancia relativa mayor.

- Si alguno de estos fragmentos previamente seleccionado fuera común a un posible interferente, descartaríamos el fragmento común analito-interferente.

Para la caracterización de un compuesto se aconseja, según Sphon ( ), seleccionar para la medida no menos de dos o tres iones, pero no más de seis ya que no reportaría beneficios. Está bastante aceptado el criterio de seleccionar los dos o tres iones más abundantes o característicos del compuesto siempre que se pueda.

En nuestro caso al analizar el espectro de masas de los ésteres metílicos derivados de ácidos grasos lineales, se han escogido los fragmentos de  $m/z$  74, 55, ya que los demás fragmentos son poco abundantes.

#### **2.3.3.2.- Iniciación del análisis de cada ión.**

En nuestro caso poseemos un ion común para todos los ésteres metílicos, este es el ión de  $m/z$  74, por lo que ésta relación  $m/z$  se leerá durante todo el desarrollo del cromatograma, solamente el ion característico del doble enlace  $m/z$  55 del oleato de metilo se medirá en el intervalo de

tiempo que esté eluyendo éste compuesto.

Ion m/z 74 . . . . . 3.0 min

Ion m/z 55 . . . . . 7.5 min

### 2.3.3.3.- Tiempo de medida de cada ion.

Es el tiempo que se mide un ion antes de pasar a leer el siguiente ion seleccionado.

Para medir dos o tres iones en modo SIM se aconseja un tiempo de medida de cada ion de 100 ms, debiéndose disminuir proporcionalmente este tiempo si fuese mayor el número de iones seleccionados para el análisis.

Para optimizar el tiempo de medida de cada ion analizamos una disolución que contiene  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada ácido graso previamente esterificado. Se han hecho tres réplicas y los resultados se muestran en la tabla III.17.

Tabla III.17.- Optimización del tiempo de medida para dos iones

ÉSTERES METÁLICOS	Tiempo de medida de cada ion (ms)					
	50		75		100	
	A.10 <sup>-2</sup>	% DER	A.10 <sup>-2</sup>	% DER	A.10 <sup>-2</sup>	% DER
Ácido Caprílico	73	2.5	75	2.3	79	2.1
Ácido Cáprico	84	2.3	87	2.1	91	2.0
Ácido Laurico	81	2.1	83	2.0	87	1.9
Ácido Mirístico	82	2.0	86	2.0	89	2.0
Ácido Palmítico	72	2.4	76	2.6	81	2.4
Ácido Esteárico	69	2.3	74	2.4	78	2.2
Ácido Oleico	85	2.4	87	2.4	90	2.3
Ácido Aráquico	64	2.3	70	2.3	74	2.5
Ácido Behénico	60	2.1	65	2.2	71	2.0

Como se observa en la tabla a 100 ms tenemos la máxima respuesta y una desviación estandar similar a los otros casos. Hemos comprobado experimentalmente lo que nos aconsejaba el fabricante, o sea, para dos o tres iones el tiempo de medida debe ser de 100 ms.

### 3.- MÉTODO ANALÍTICO

#### 3.1.- Análisis en modo SCAN.

##### *3.1.1.- Establecimiento de las rectas de calibrado.*

Para establecer las funciones de calibrado se ha seguido el método operatorio que a continuación se describe. Se preparó una de cinco tubos de ensayo de 20 mL en los que se introducen volúmenes crecientes (0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 mL ) de disolución madre de los ácidos grasos de  $10\text{mg.L}^{-1}$ . A continuación a cada tubo se añadió 1 mL de patrón interno ( $10\text{ mg.L}^{-1}$  de ácido tridecanóico ) y se aplicó el método de esterificación con  $\text{BF}_3$  descrito en la página 125, tras lo cual se transfieren a diferentes matraces aforados de 10 mL y se enrasan con  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ . A cada muestra se le registra el correspondiente cromatograma. Al esterificar simultáneamente la muestra y el patrón interno, la denominación de éste cambia, ahora se definirá como patrón interno "surrogate" (REF), corrige tanto el método cromatográfico,

como todo el proceso de esterificación. De cada punto experimental se han preparado dos réplicas, y de cada réplica se han hecho tres inyecciones.

Para medir la señal del blanco cromatográfico seguiremos la metodología descrita en el capítulo II. Para ello se hicieron inyecciones adicionales al calibrado. Se prepararon disoluciones de 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\text{mgL}^{-1}$  de cada ácido graso que fueron sometidas al procedimiento operatorio anterior. Se realizó una sola réplica, así como una única inyección de cada réplica, ya que no se pretende ajustar la respuesta a ningún modelo, sino simplemente observar la tendencia de la señal en la zona del blanco. Con las respuestas obtenidas al inyectar estas disoluciones, se representaron las anchuras a mitad de pico frente a la concentración, obteniéndose en cada caso la anchura de pico para cada éster metílico a concentración cero. En la figuras III.35, III.36 y III.37 se observan estas representaciones y en la tabla III.18 se indican las correspondientes  $W_{0.5h}$ ,  $W_{b0}$ ,  $t_R \pm 0.5 W_{b0}$  a cada ácido graso. Las áreas del blanco cromatográfico correspondientes a cada intervalo calculado son las que se indican en la tabla III.19, correspondiente a los datos del calibrado.



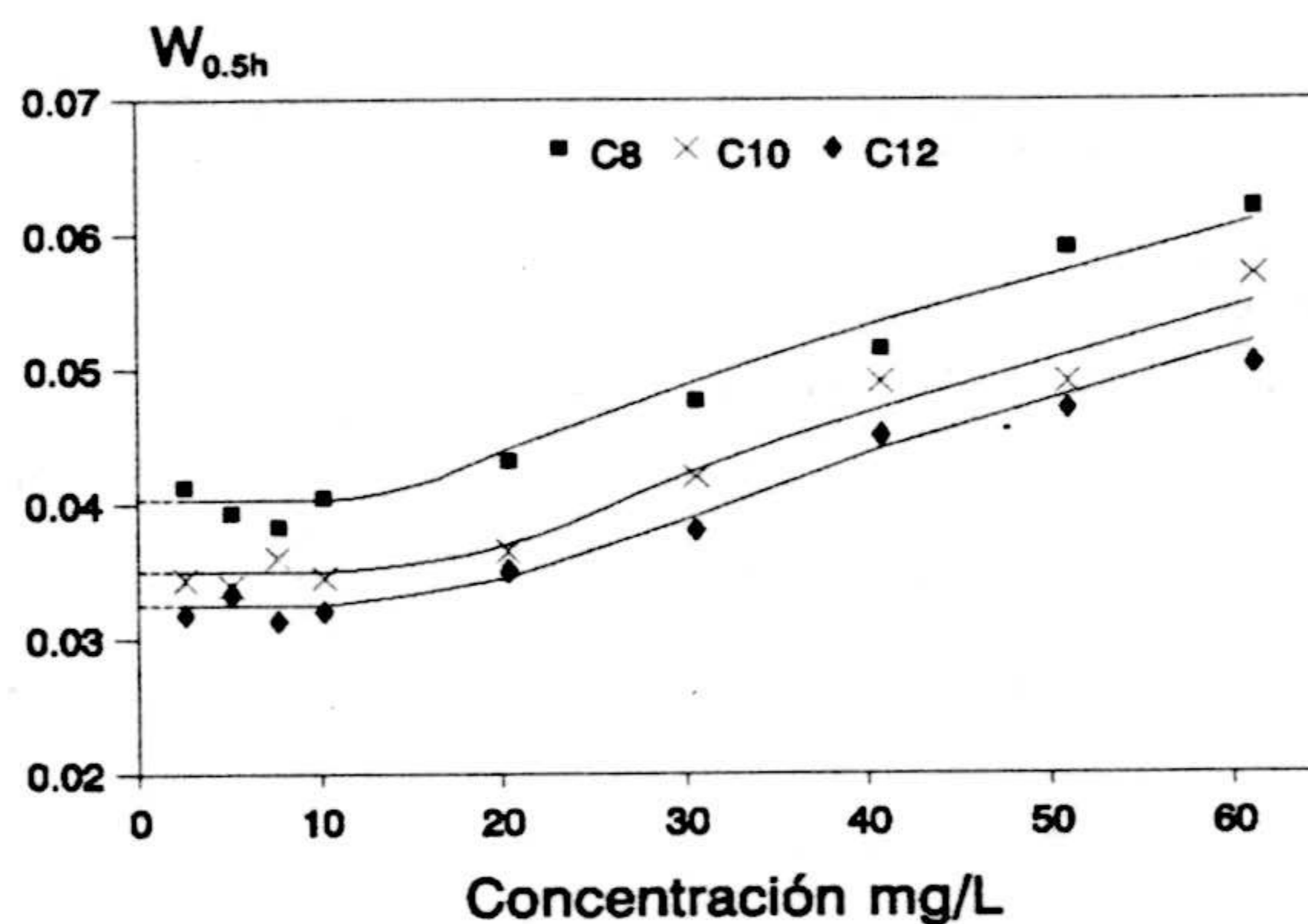


Figura III.35.- Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres metílicos  $C_8$ ,  $C_{10}$  y  $C_{12}$ .

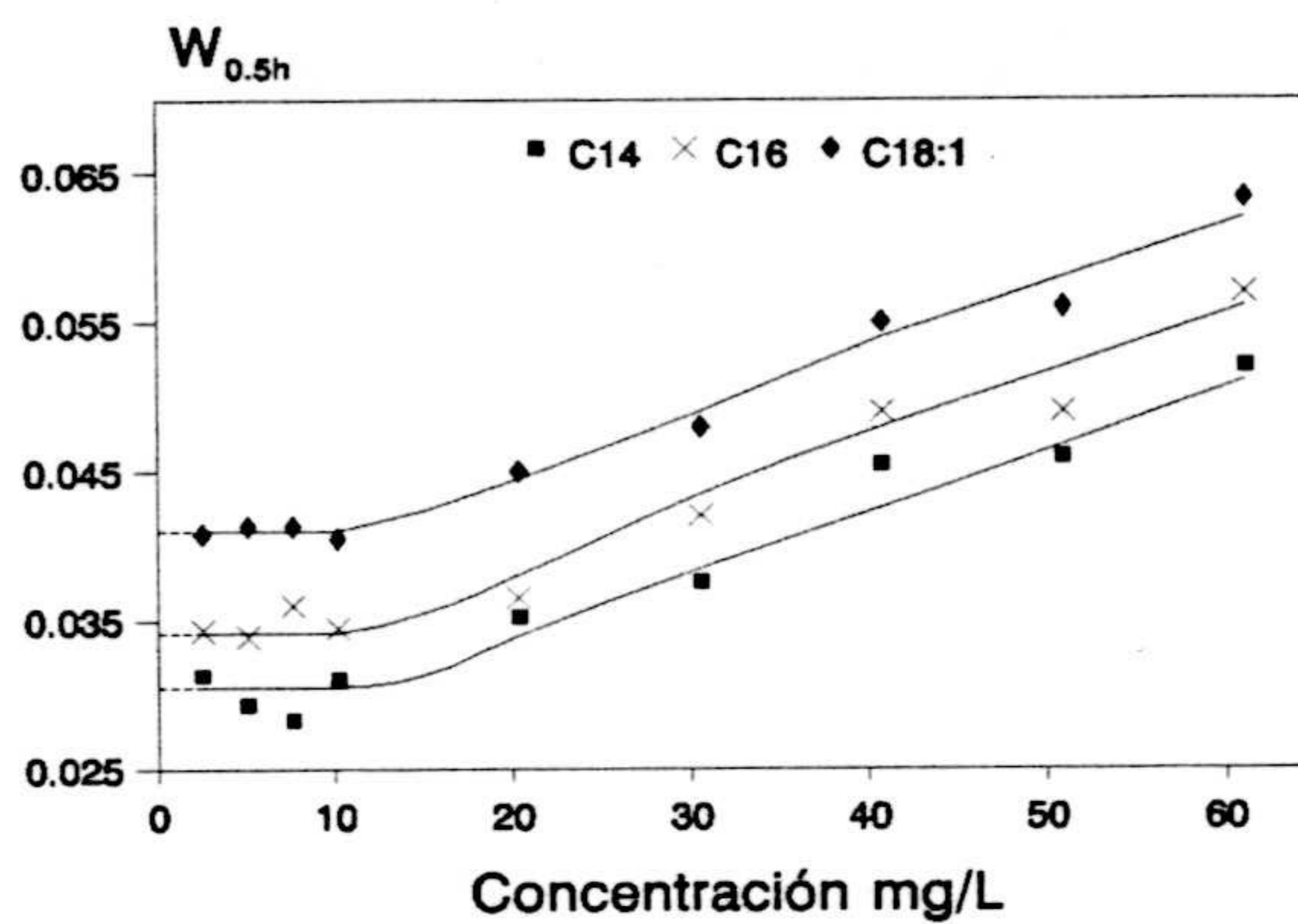
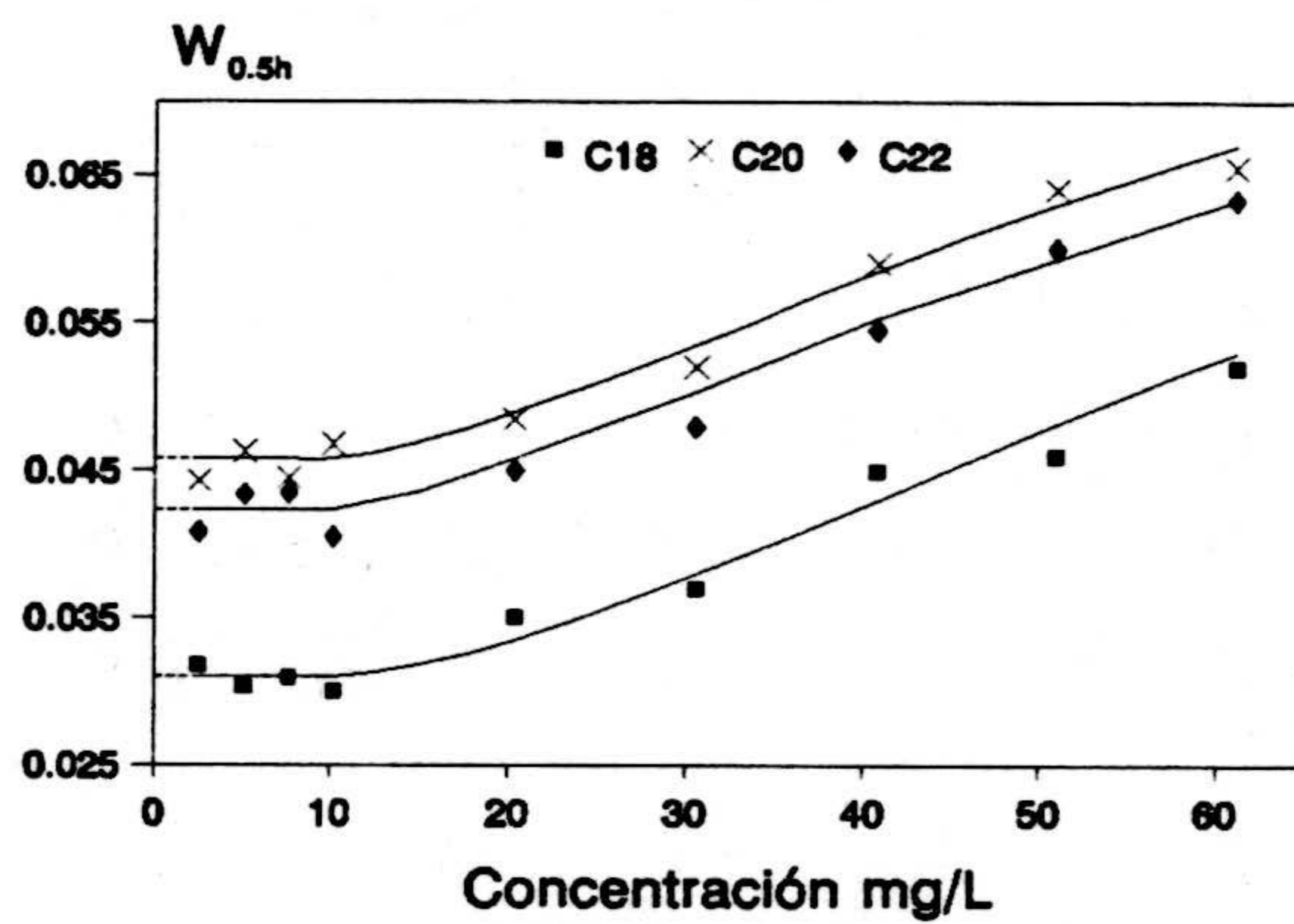


Figura III.36.- Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres metílicos  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18:1}$ .



**Figura III.37.-** Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres metílicos  $C_{18}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$

Tabla III.18.- Cálculo de la anchura de pico a concentración cero.

ÉSTERES METÍLICOS	$W_{0.5h}$ (min)	$W_{b0}$ (min)	$t_R \pm 0.5 W_{b0}$ (min)
Ácido Caprílico	0.0403	0.1027	$3.917 \pm 0.051$
Ácido Cáprico	0.0350	0.0892	$4.461 \pm 0.045$
Ácido Laurico	0.0324	0.0826	$5.485 \pm 0.042$
Ácido Mirístico	0.0305	0.0777	$5.876 \pm 0.039$
Ácido Palmítico	0.0342	0.0871	$6.317 \pm 0.043$
Ácido Estearico	0.0310	0.0790	$7.084 \pm 0.039$
Ácido Oleico	0.0410	0.1045	$7.795 \pm 0.052$
Ácido Aráquico	0.0423	0.1078	$8.571 \pm 0.054$
Ácido Behénico	0.0458	0.1167	$9.509 \pm 0.058$

En la tabla III.19 se indican las áreas obtenidas para cada ácido graso a concentración cero, así como para el patrón interno. Se observa que para cada analito tenemos seis señales, al tener dos réplicas y tres inyecciones de cada réplica.

**Tabla III.19.-** Señales obtenidas para las diferentes concentraciones de ácidos grasos y para el patrón interno "surrogate".

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	12	0.01	428	0.47	751	0.86	1233	1.36	1638	1.84
	7	0.01	424	0.47	839	0.92	1056	1.27	1709	1.75
	48	0.06	373	0.47	742	0.91	1330	1.48	1346	1.74
	55	0.07	326	0.39	546	0.82	1439	1.39	1916	2.09
	5	0.01	471	0.47	694	0.96	1200	1.21	1198	1.63
	13	0.01	312	0.35	619	0.76	955	1.12	1515	1.68
C <sub>10</sub>	11	0.01	243	0.27	532	0.61	744	0.82	966	1.09
	6	0.01	300	0.33	454	0.50	641	0.77	1110	1.13
	47	0.06	206	0.26	467	0.58	841	0.94	760	0.98
	54	0.07	281	0.34	420	0.63	823	0.79	885	0.97
	4	0.00	336	0.33	420	0.58	781	0.79	838	1.14
	14	0.02	186	0.21	494	0.61	593	0.69	964	1.07
C <sub>12</sub>	8	0.01	258	0.28	510	0.58	719	0.80	1058	1.19
	19	0.02	246	0.27	491	0.54	728	0.88	1054	1.08
	30	0.04	255	0.32	478	0.59	813	0.91	893	1.16
	27	0.04	275	0.33	375	0.57	899	0.87	1062	1.16
	27	0.03	306	0.30	449	0.62	897	0.91	807	1.10
	55	0.06	254	0.28	509	0.58	741	0.87	1045	1.16

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.19.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub>	8	0.01	289	0.32	435	0.50	853	0.94	883	0.99
	11	0.01	233	0.26	560	0.62	655	0.79	1042	1.07
	45	0.06	248	0.31	458	0.56	763	0.85	901	1.17
	54	0.07	206	0.25	452	0.68	896	0.86	960	1.05
	13	0.01	356	0.35	477	0.66	760	0.77	796	1.08
	9	0.01	242	0.27	406	0.50	786	0.92	870	0.97
C <sub>16</sub>	5	0.00	224	0.25	417	0.48	760	0.84	906	1.02
	2	0.00	238	0.26	490	0.54	557	0.67	1064	1.09
	41	0.05	235	0.29	416	0.51	776	0.86	939	1.22
	48	0.06	230	0.28	341	0.51	906	0.87	1006	1.10
	4	0.00	355	0.35	403	0.56	860	0.87	678	0.92
	21	0.02	182	0.20	471	0.58	803	0.94	1019	1.13
C <sub>18</sub>	15	0.02	278	0.31	553	0.63	778	0.86	1149	1.29
	12	0.01	275	0.30	545	0.60	800	0.96	1173	1.20
	36	0.04	280	0.35	521	0.64	880	0.98	971	1.26
	33	0.04	294	0.36	416	0.63	995	0.96	1167	1.28
	20	0.02	328	0.33	482	0.67	977	0.99	888	1.21
	48	0.05	272	0.30	508	0.62	827	0.97	1149	1.28

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.19.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	14	0.02	418	0.46	711	0.81	1116	1.23	1418	1.60
	13	0.01	407	0.45	674	0.74	1175	1.42	1817	1.86
	35	0.04	349	0.44	624	0.77	1096	1.22	1255	1.62
	32	0.04	366	0.44	503	0.76	1202	1.16	1661	1.82
	21	0.02	464	0.46	614	0.85	1219	1.23	1225	1.66
	49	0.06	340	0.38	620	0.76	1114	1.30	1578	1.75
C <sub>20</sub>	5	0.01	210	0.23	422	0.48	646	0.72	819	0.92
	2	0.00	211	0.23	413	0.45	602	0.73	895	0.91
	41	0.05	207	0.26	360	0.44	686	0.76	747	0.97
	48	0.06	195	0.24	337	0.51	721	0.69	873	0.96
	3	0.00	287	0.29	399	0.55	708	0.72	674	0.92
	21	0.02	178	0.20	398	0.49	588	0.69	839	0.93
C <sub>22</sub>	6	0.01	178	0.20	364	0.42	569	0.63	697	0.78
	1	0.00	182	0.20	358	0.39	529	0.64	764	0.78
	42	0.05	179	0.22	309	0.38	597	0.66	654	0.85
	49	0.06	168	0.20	297	0.45	620	0.60	738	0.81
	2	0.00	262	0.26	348	0.48	617	0.62	596	0.81
	20	0.02	156	0.17	347	0.43	516	0.60	711	0.79

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla II.19.- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-3</sup> )				
C <sub>13</sub>	870	908	873	904	889
	1015	901	909	829	979
	834	798	813	899	773
	768	826	663	1037	914
	985	1005	723	989	736
	884	893	816	855	901

En la tabla III.20 se indican los principales parámetros estadísticos del calibrado para cada analito calculados mediante el paquete informático STATGRAPHICS. La definición de cada parámetro es la siguiente:

- a** : ordenada en el origen.
- s<sub>a</sub>** : desviación estándar de **a**.
- P<sub>a</sub>** : nivel de significación para el test de la ordenada, en el cual  
 $H_0 \equiv a = 0$ .
- b** : pendiente.
- s<sub>b</sub>** : desviación estándar de **b**.
- P<sub>b</sub>** : nivel de significación para el test de independencia, en el cual  
 $H_0 \equiv b = 0$ .
- r** : coeficiente de correlación.
- R<sup>2</sup>** : coeficiente de determinación.
- s<sub>R,C</sub>** : desviación estándar de la regresión.
- P<sub>F.A.</sub>** : nivel de significación para el test de de fallo de ajuste, en el cual  
 $H_0 \equiv$  "Los datos se ajustan al modelo lineal".



Tabla III.20.- Parámetros estadísticos del calibrado.

	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
a	0.006	0.034	0.010	0.038	0.008	0.004	0.013	0.016	0.018
s <sub>a</sub>	0.031	0.019	0.011	0.019	0.020	0.011	0.023	0.009	0.009
P <sub>a</sub>	86	8	35	7	70	68	58	10	7
b	1.028	0.986	1.127	1.058	1.034	0.998	1.127	0.890	0.786
s <sub>b</sub>	0.030	0.029	0.017	0.033	0.033	0.014	0.025	0.015	0.015
P <sub>b</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r	0.988	0.988	0.997	0.987	0.986	0.997	0.993	0.996	0.995
R <sup>2</sup>	97.66	97.66	99.34	97.38	97.29	99.45	98.66	99.23	98.97
S <sub>R.C</sub>	0.099	0.059	0.034.	0.063	0.066	0.034	0.073	0.030	0.025
P <sub>F.A.</sub>	84	55	89	23	70	79	20	70	51

En la figuras III.38 - III.46 se representan las rectas de calibrado correspondientes a cada ácido graso.

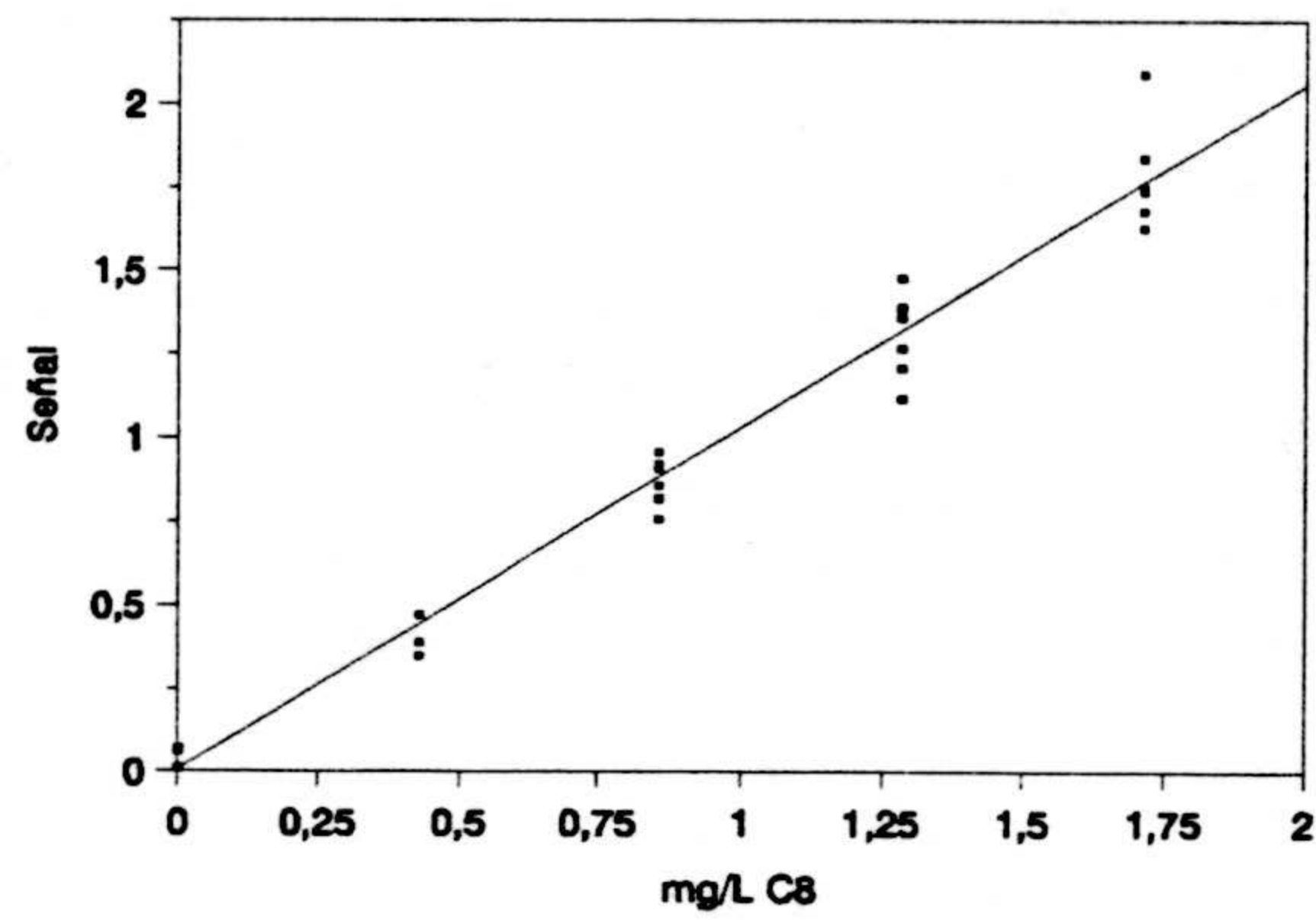


Figura III.38.- Función de calibrado en modo SCAN para el caproato de metilo.

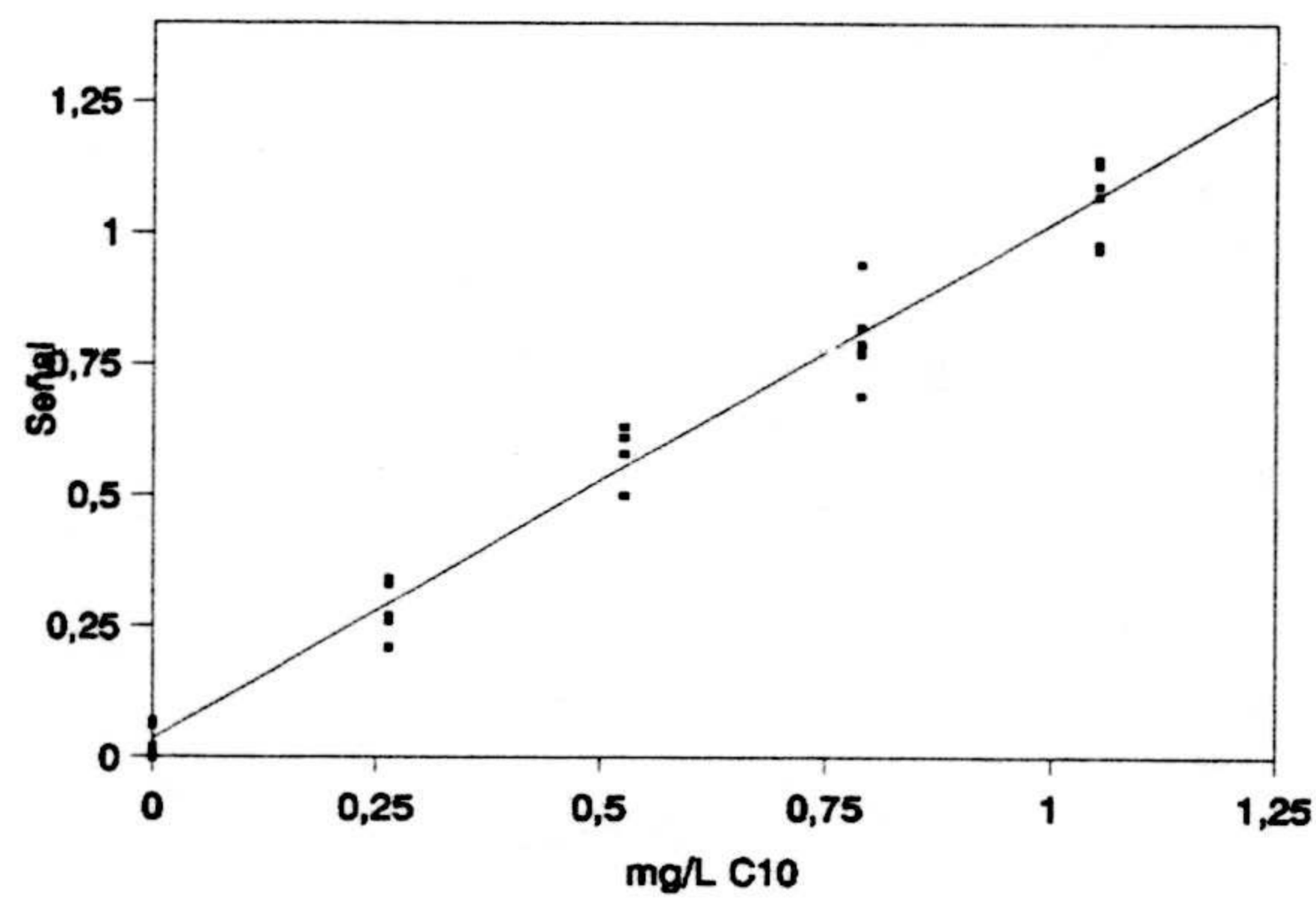


Figura III.39.- Función de calibrado en modo SCAN para el caprato de metilo

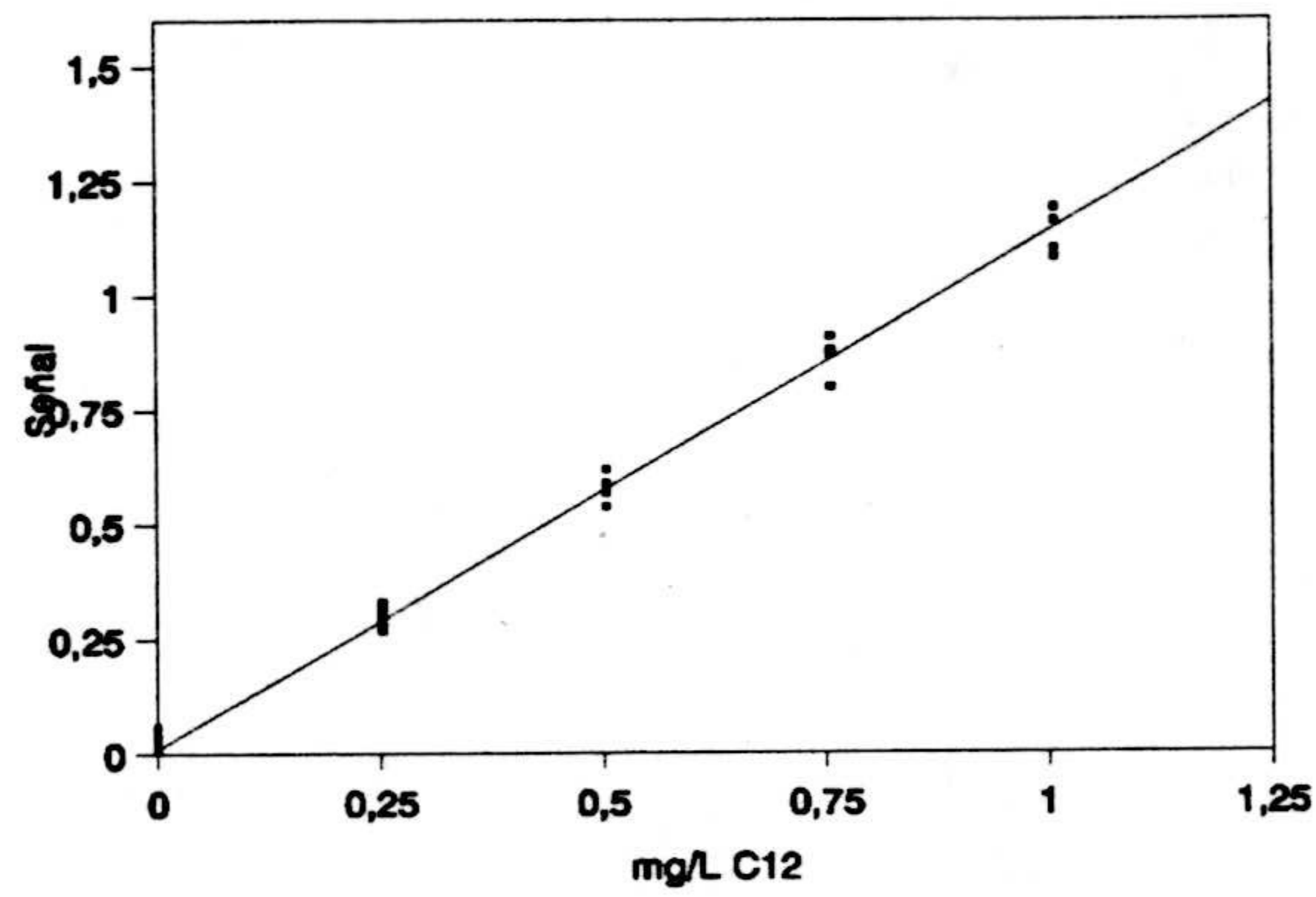


Figura III.40.- Función de calibrado en modo SCAN para el laurato de metilo

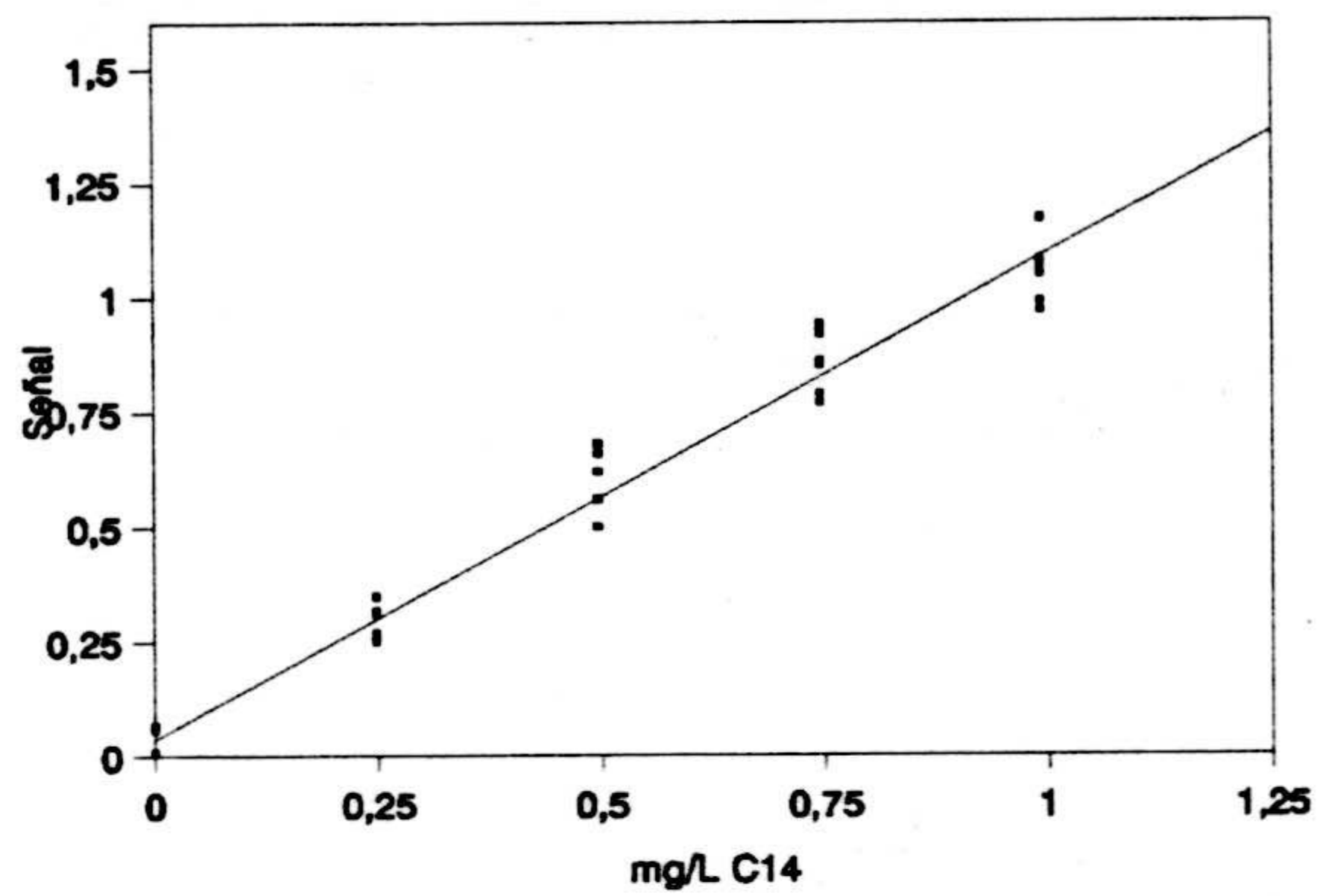


Figura III.41.- Función de calibrado en modo SCAN para el miristato de metilo

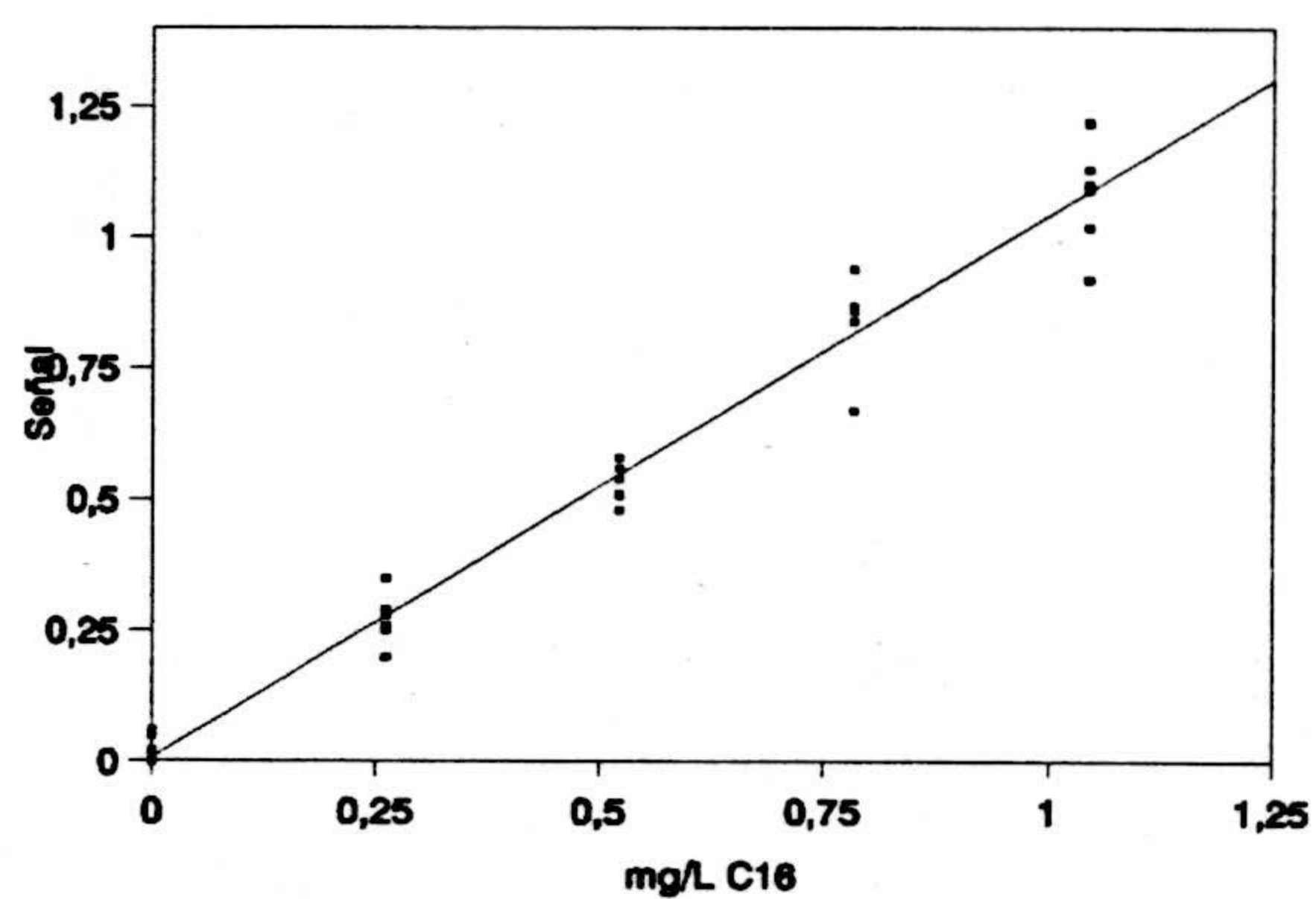


Figura III.42.- Función de calibrado en modo SCAN para el palmitato de metilo

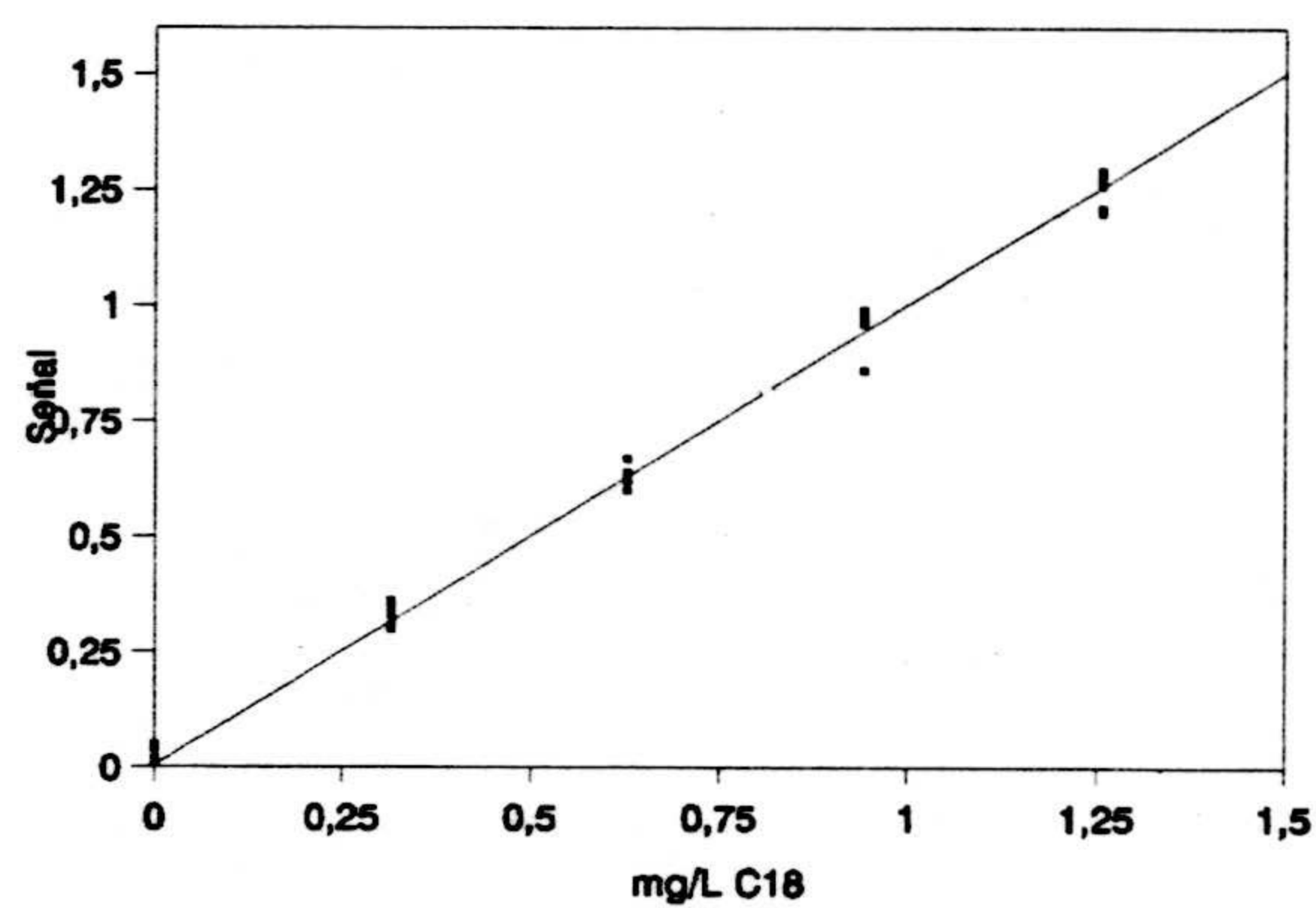


Figura III.43.- Función de calibrado en modo SCAN para el estearato de metilo

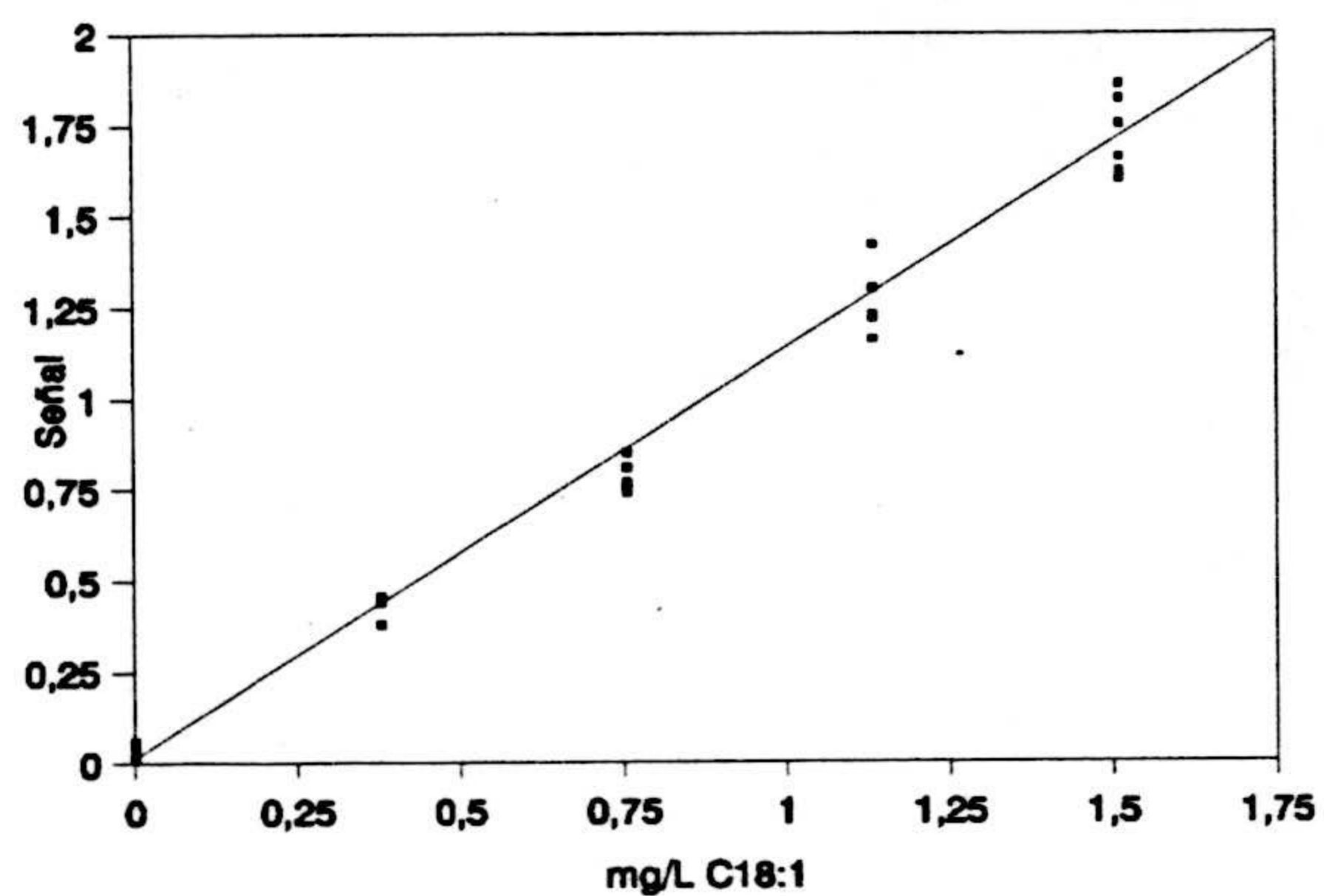


Figura III.44.- Función de calibrado en modo SCAN para el oleato de metilo

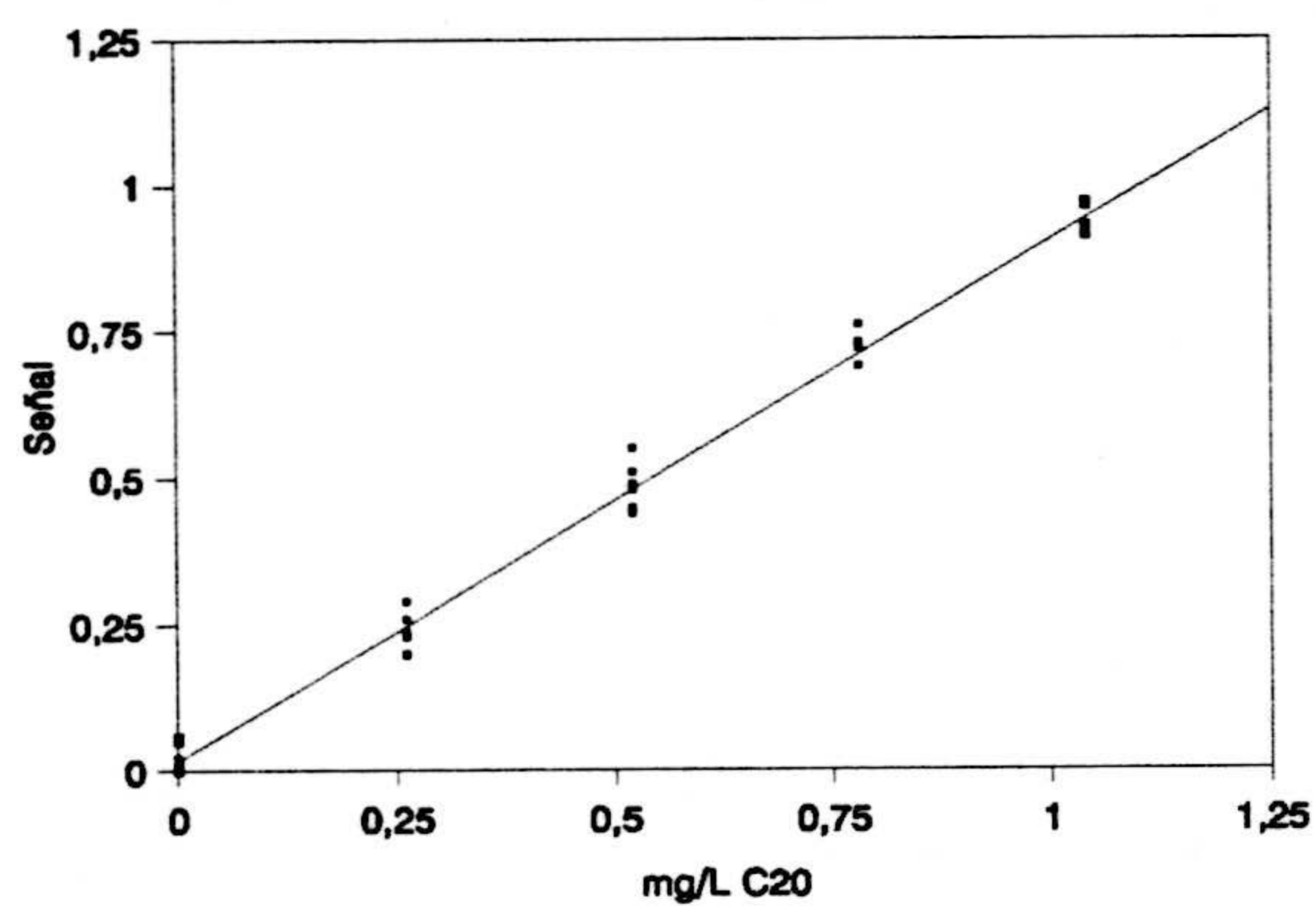


Figura III.45.- Función de calibrado en modo SCAN para el aracato de metilo



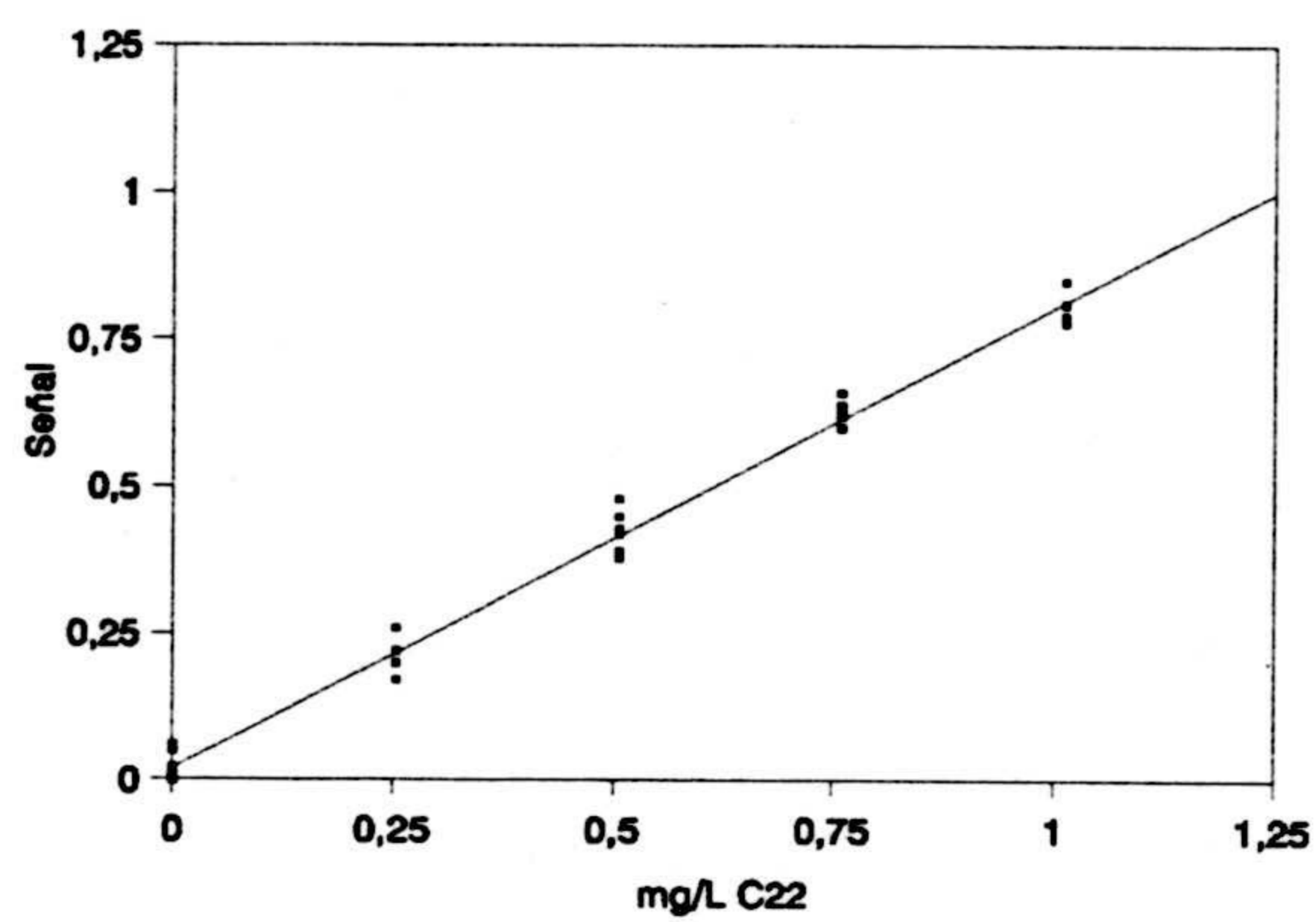


Figura III.46.- Función de calibrado en modo SCAN para el behenato de metilo

**3.1.2.- Cálculo de los parámetros de calidad del método analítico a partir de los datos del calibrado.**

Se aplicará la metodología descrita por CUADROS y col.<sup>1</sup> para determinar los parámetros de calidad del método a partir de la experiencia del calibrado.

Los parámetros de calidad calculados han sido los siguientes:

1.-- LINEALIDAD.- La linealidad nos indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado. La calcularemos a partir de la DSR de la pendiente, según la fórmula:

$$LIN = [ 1 - DSR(b) ] \times 100$$

$DSR(b)$ , desviación estándar relativa de la pendiente, que viene dada por:

$$DSR(b) = \frac{s_b}{b} \times 100$$

---

<sup>1</sup> CUADROS RODRIGUEZ L., GARCÍA CAMPAÑA A., JIMÉNEZ LINARES C. y ROMÁN CEBA M., *Analytical Letters* 26 1993.

$s_b$ , desviación estándar de la pendiente, que viene dada por:

$$s_b = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

2.- SENSIBILIDAD.- Indica la máxima diferencia de concentración que es estadísticamente discernible en cualquier punto de la recta de calibrado. Esta sensibilidad analítica obtenida a partir de los datos del calibrado, viene dada por la ecuación:

$$s_{anal} = \frac{s_{R,C}}{b}$$

$s_{R,C}$ , desviación estándar de la regresión, que viene dada por:

$$s_{R,C} = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n - 2}}$$

3.- PRECISIÓN.- La precisión mide el grado de incertidumbre que podemos esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir del calibrado. Expresada como desviación estándar relativa de la concentración viene dada por la ecuación:



$$DSR(c) = \frac{s_c}{c} 100$$

$s_c$ , desviación estándar para cada concentración:

$$s_c = \frac{s_{Rc}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

4.- LÍMITE DE DETECCIÓN.- El límite de detección calculado a partir de los datos del calibrado, se obtiene calculando la desviación estándar a concentración cero ( $s_{c0}$ ), al haber hecho seis medidas del blanco dentro del propio calibrado.

$$LD = 3s_{c0}$$

5.- LÍMITE DE DETERMINACIÓN.- El límite de determinación se obtiene al sustituir el valor 3 de la ecuación anterior, por el valor 10.

$$LQ = 10s_{c0}$$

$s_{c0}$ , desviación estándar a concentración cero:

$$s_{c0} = \frac{s_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R_0 - R)^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

5.- RANGO DINÁMICO LINEAL.- Viene definido por los límites superior e inferior del intervalo de concentraciones en el que hemos aplicado el método.

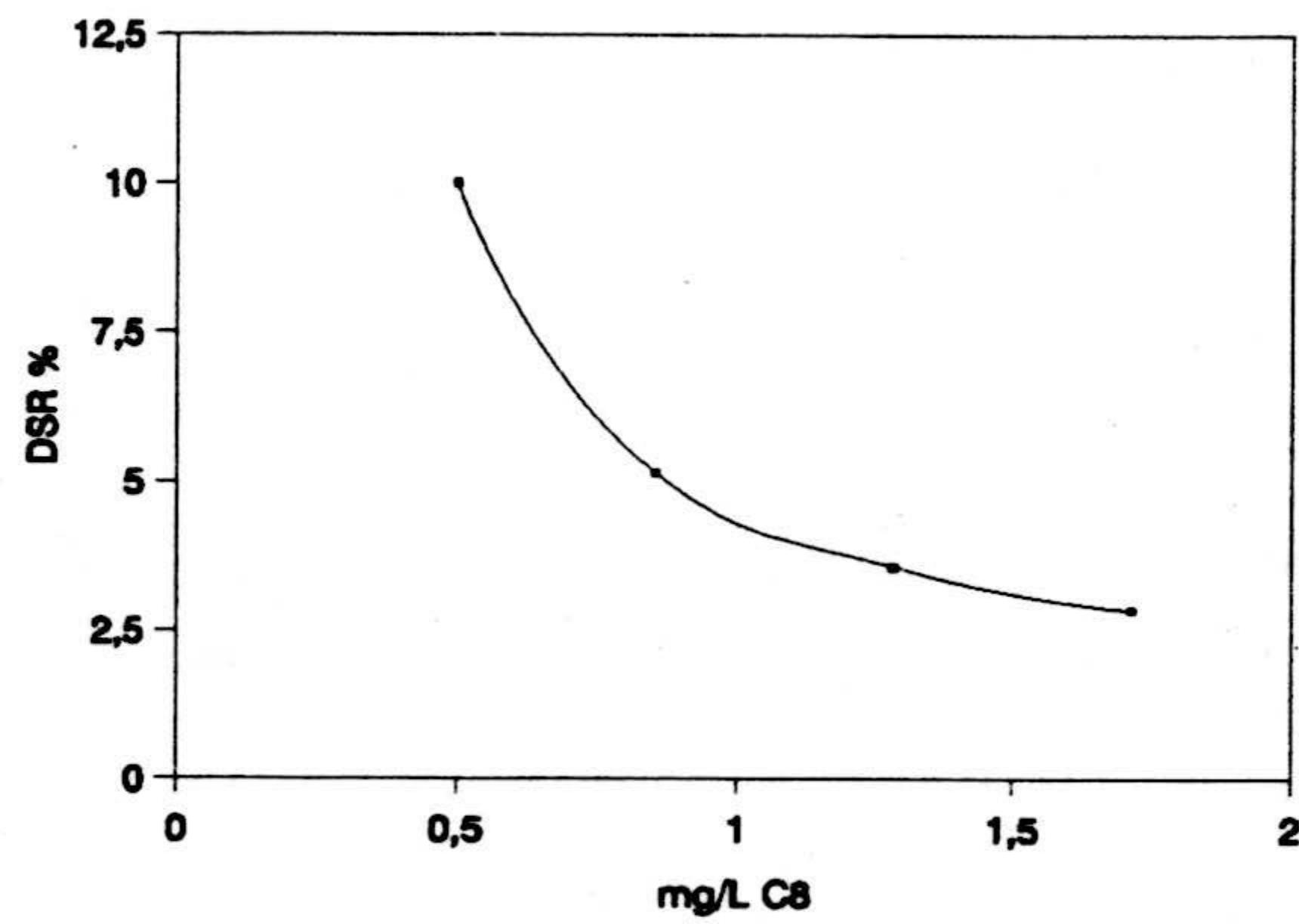
$$RDL = 0.1 \frac{Lim_{superior}}{Lim_{inferior}}$$

En la tabla III.21 se muestran los parámetros de calidad del método analítico para cada ácido graso.

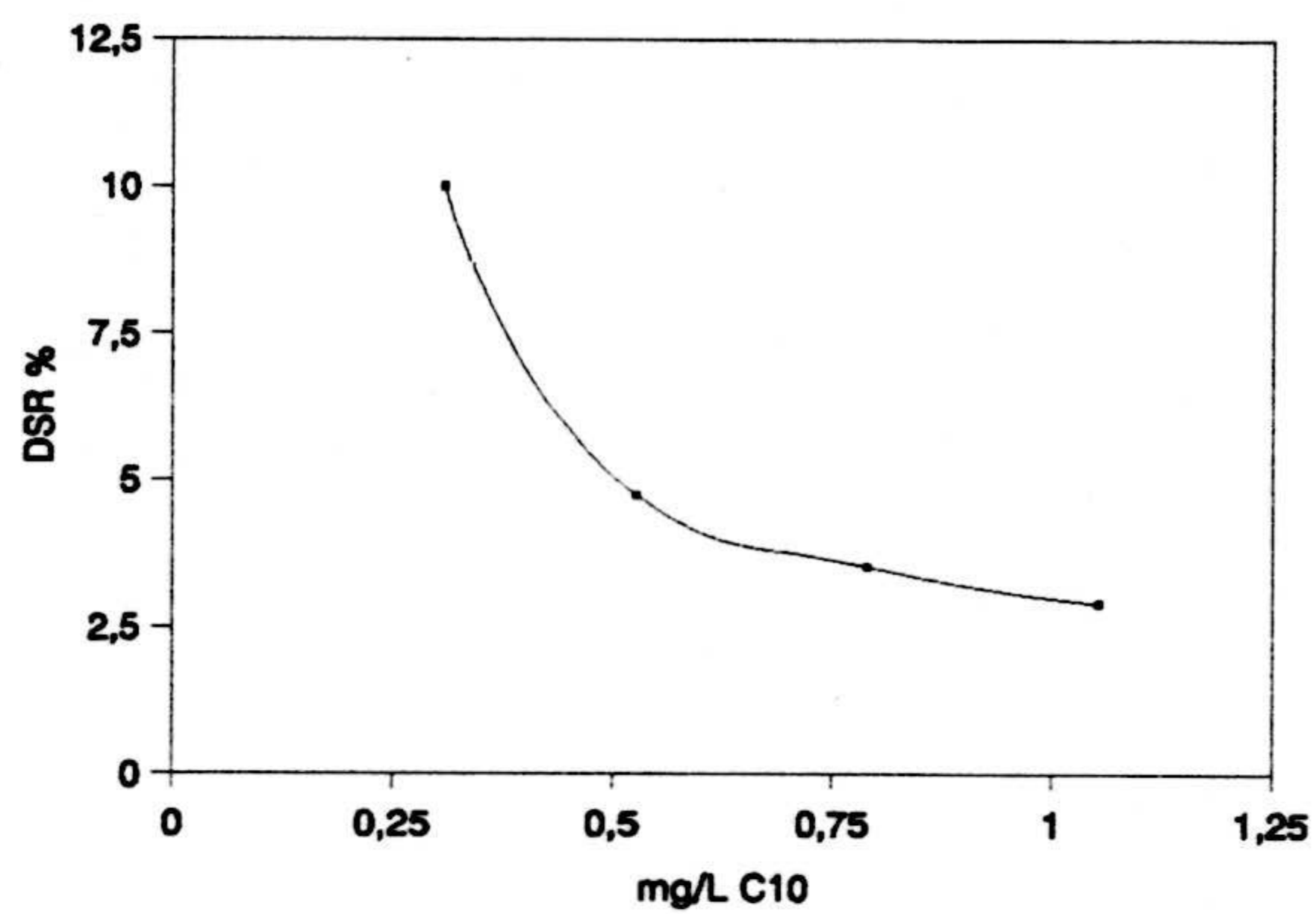
**Tabla III.21.-** Parámetros de calidad del método analítico a partir de los datos del calibrado.

<b>ÉSTERES METÁLICOS</b>	<b>Lin. %</b>	<b>RDL mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Sensi. mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LD mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LQ mgL<sup>-1</sup></b>
Ácido Caprílico	97.07	0.15-1.71	0.097	0.150	0.500
Ácido Cáprico	97.10	0.09-1.05	0.059	0.092	0.307
Ácido Laurico	98.58	0.04-1.01	0.028	0.043	0.143
Ácido Mirístico	96.92	0.09-0.99	0.059	0.092	0.308
Ácido Palmítico	98.71	0.05-1.04	0.031	0.049	0.162
Ácido Esteárico	96.84	0.10-1.25	0.064	0.099	0.329
Ácido Oleico	97.77	0.10-1.51	0.065	0.101	0.335
Ácido Aráquico	98.37	0.05-1.04	0.033	0.051	0.170
Ácido Behénico	98.14	0.06-1.01	0.037	0.057	0.189

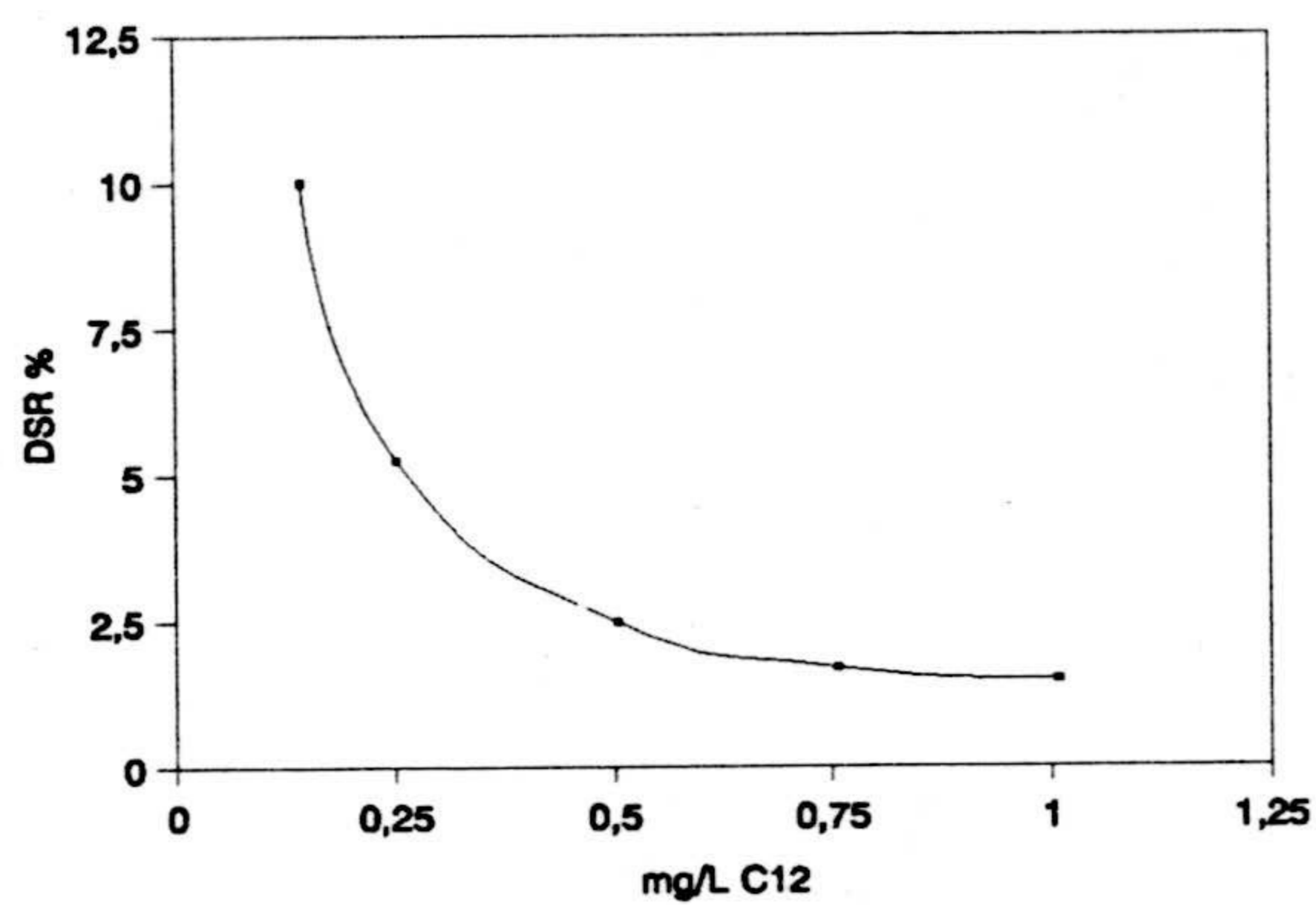
En las figuras III.47 - III.55 se representa la variación de la precisión del método en función de la concentración de ácido graso, DSR (c).



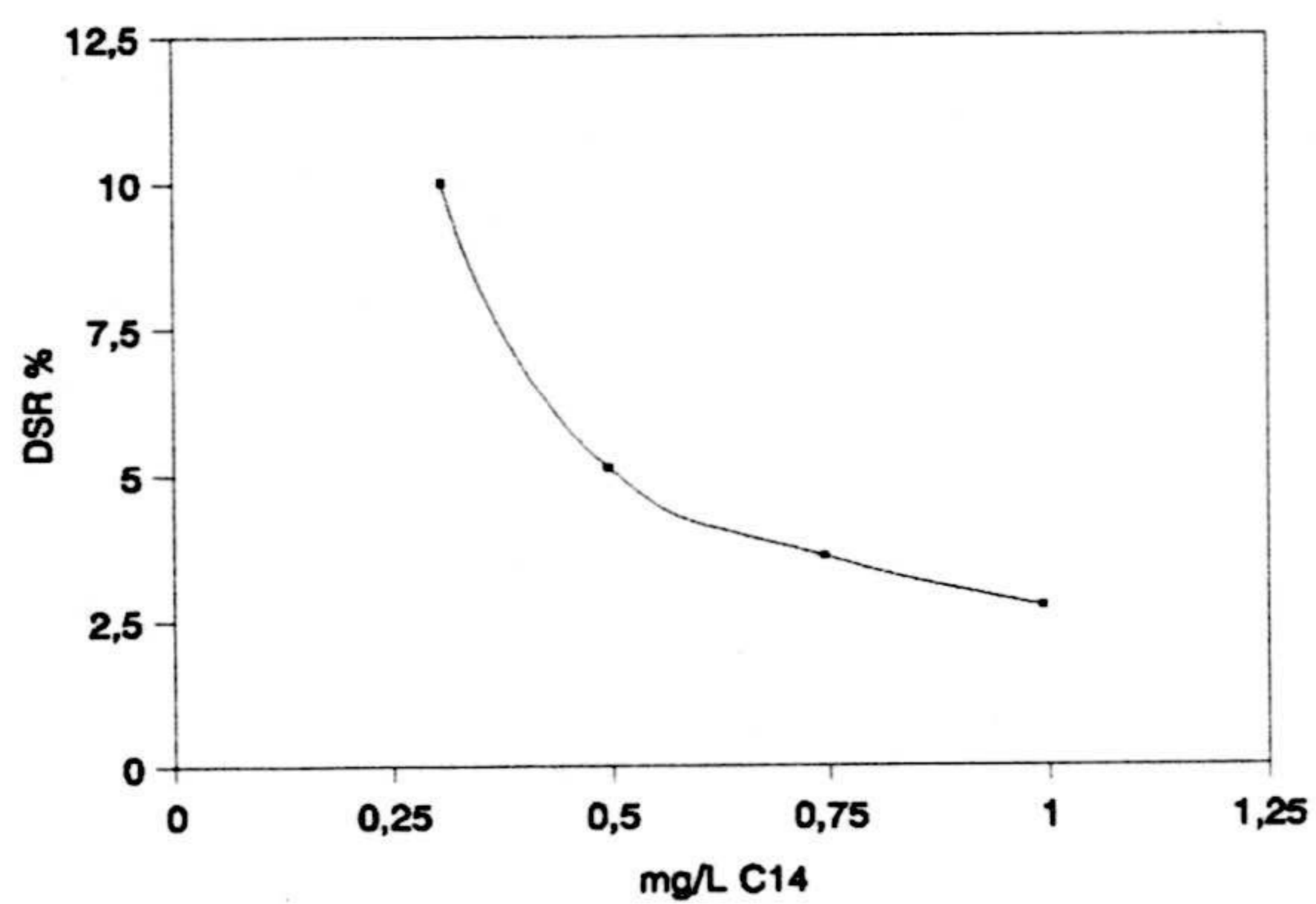
**Figura III.47.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el caproato de metilo.



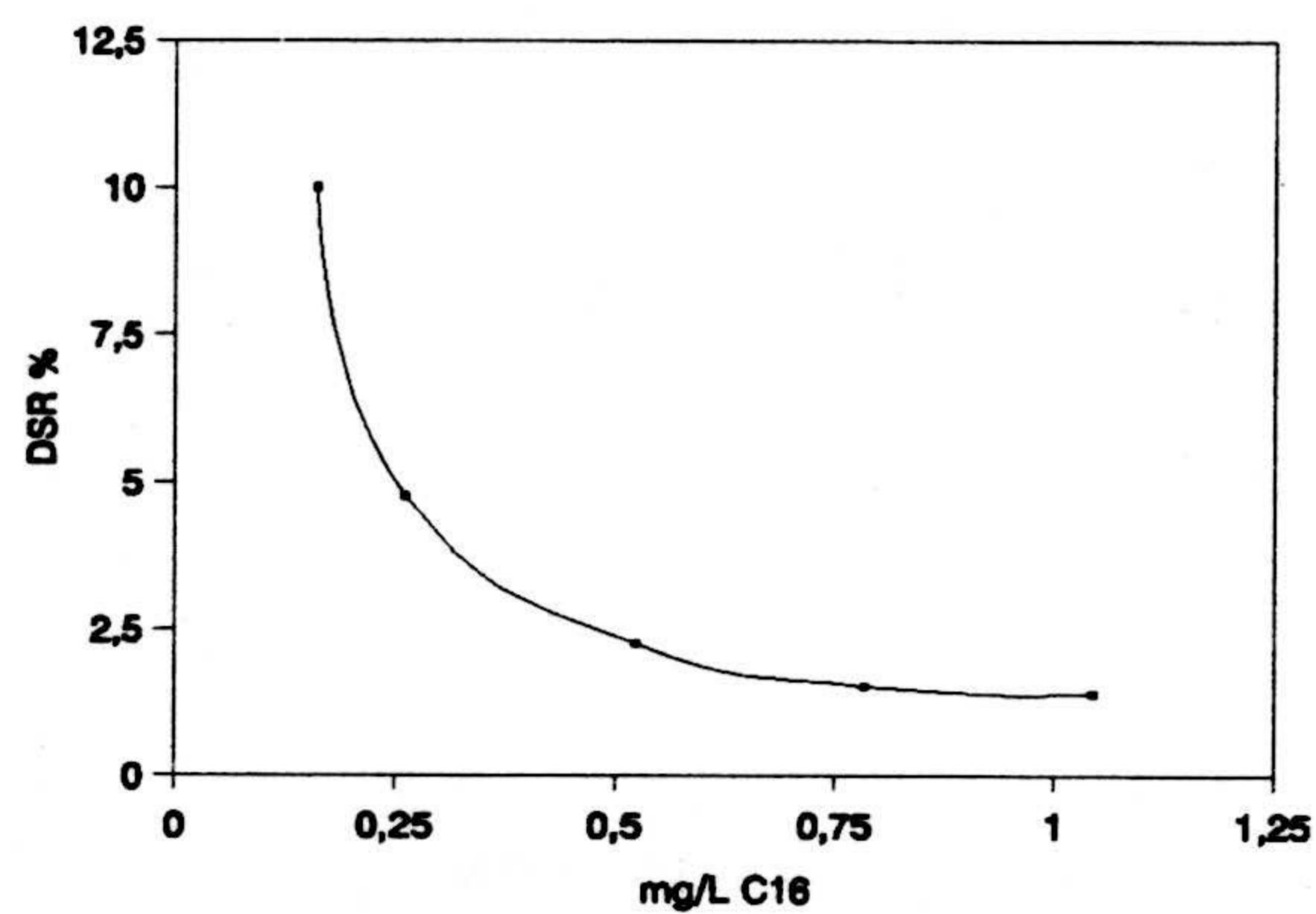
**Figura III.48.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el caproato de metilo.



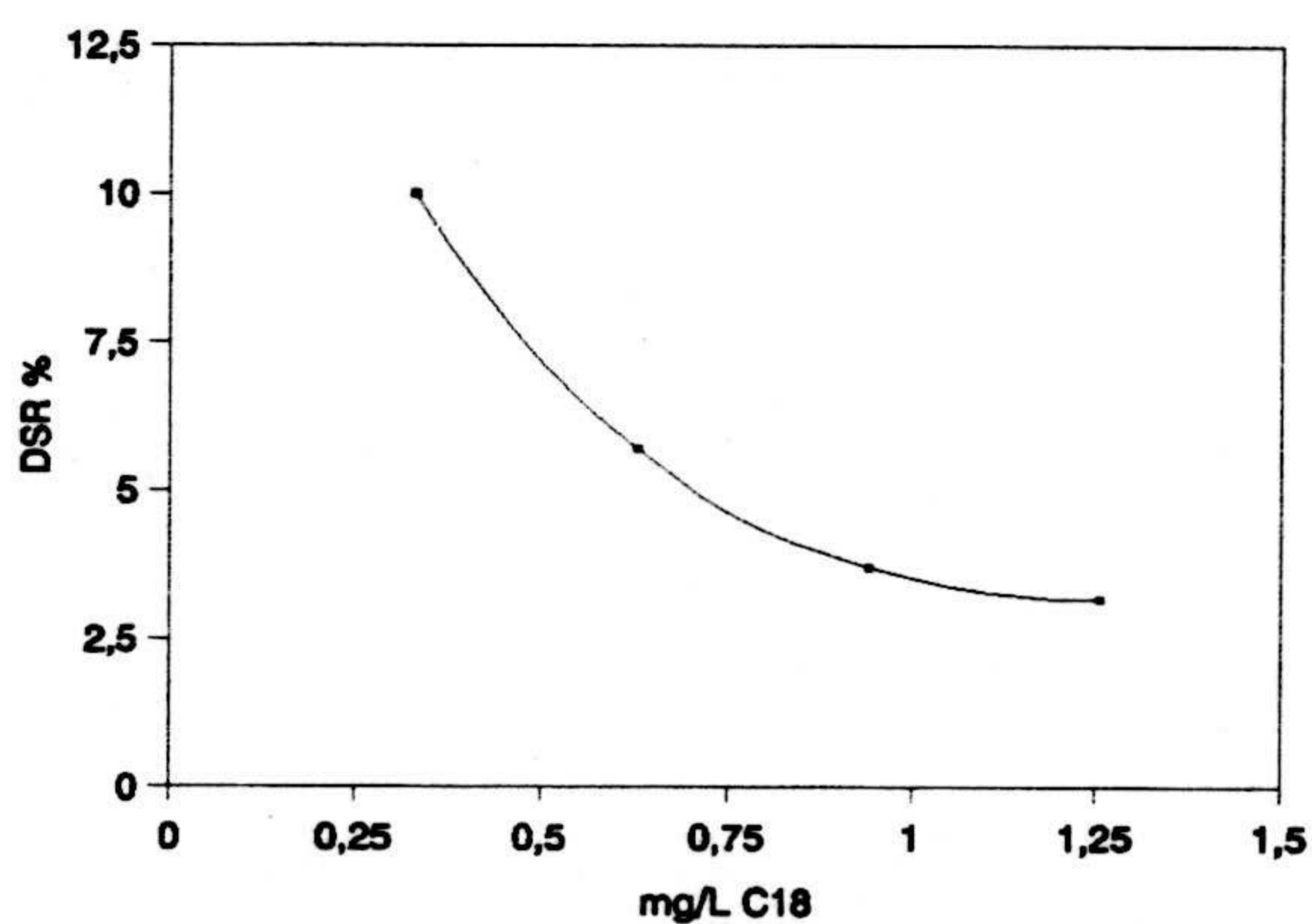
**Figura III.49.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el laurato de metilo



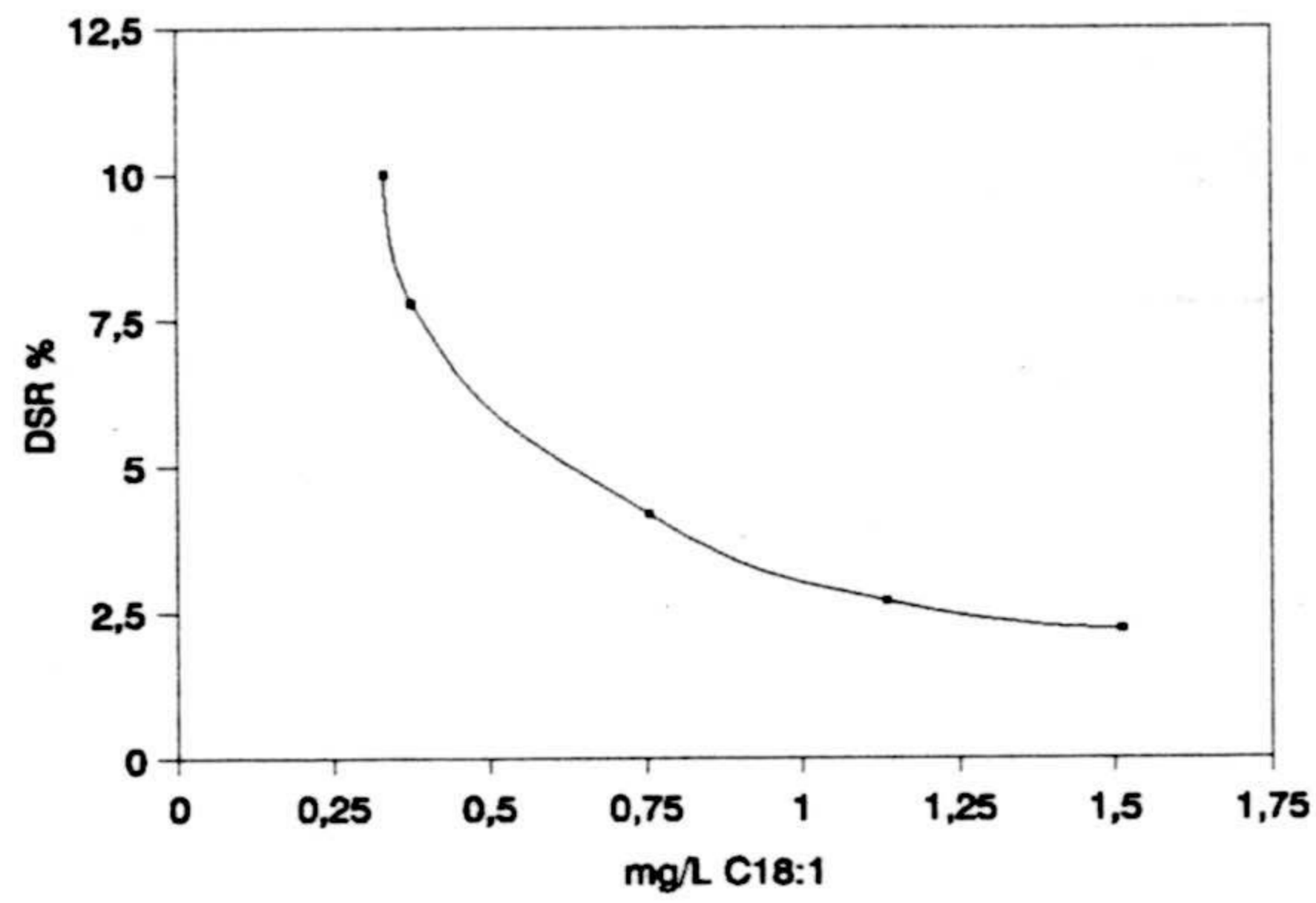
**Figura III.50.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el miristato de metilo



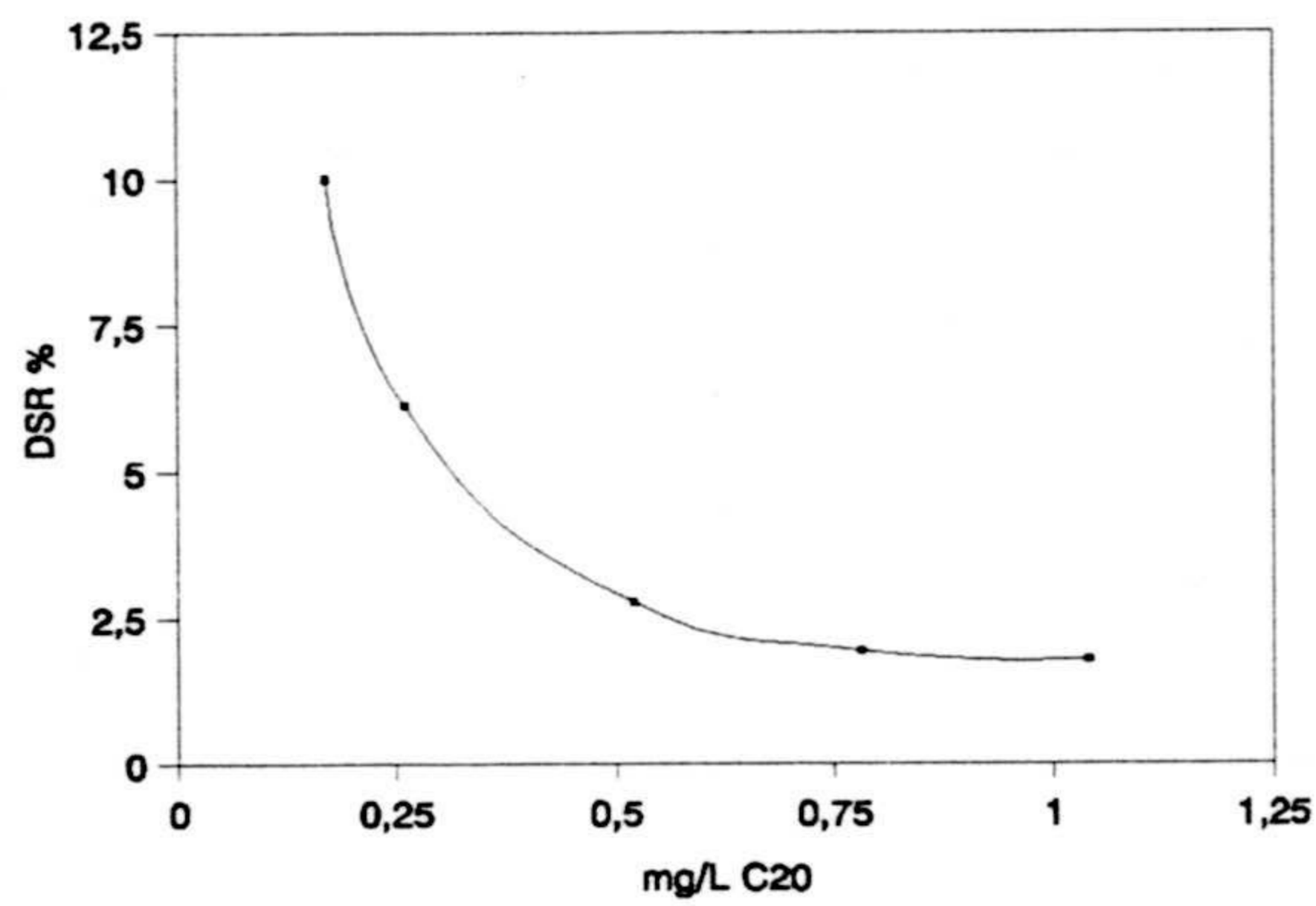
**Figura III.51.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el palmitato de metilo



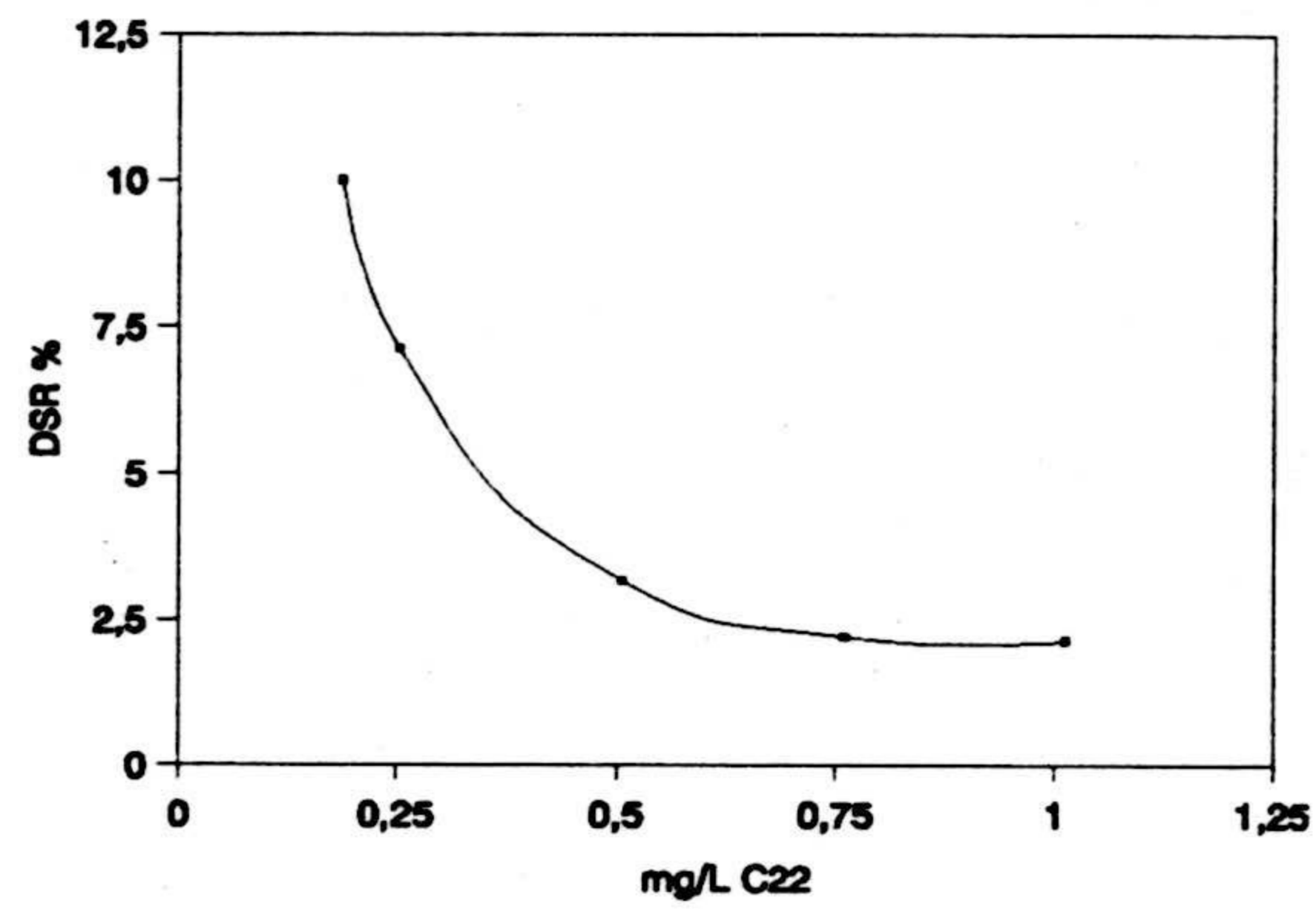
**Figura III.52.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el estearato de metilo



**Figura III.53.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el oleato de metilo



**Figura III.54.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el aracato de metilo.



**Figura III.55.-** Desviación estándar relativa en función de la concentración en modo SCAN para el behenato de metilo



### 3.2.- Análisis en modo SIM.

Ante el amplio rango lineal puesto de manifiesto en experiencias orientativas y la amplia gama de matrices a analizar, hemos optado por estudiar dos rangos de concentraciones 0 - 1 mg.L<sup>-1</sup> y 0 - 10 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 3.2.1.- Rango 0 - 1 mg.L<sup>-1</sup>.

##### 3.2.1.1.- Establecimiento de las rectas de calibrado.

Para establecer las rectas de calibrado se seguirá el mismo proceso descrito en el apartado anterior. En esta ocasión hemos partido de una disolución madre de ácidos grasos de 10 mg.L<sup>-1</sup>, y se han preparado disoluciones con una concentración final individual de 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 mg.L<sup>-1</sup>.

En las figuras III.56, III.57 y III.58 se observan las representaciones para calcular las correspondientes  $W_{0.5h}$  y en la tabla III.22 se indican los valores obtenidos. Las áreas del blanco cromatográfico correspondientes a cada intervalo calculado son las que se indican en la tabla III.23, correspondiente a los datos del calibrado.

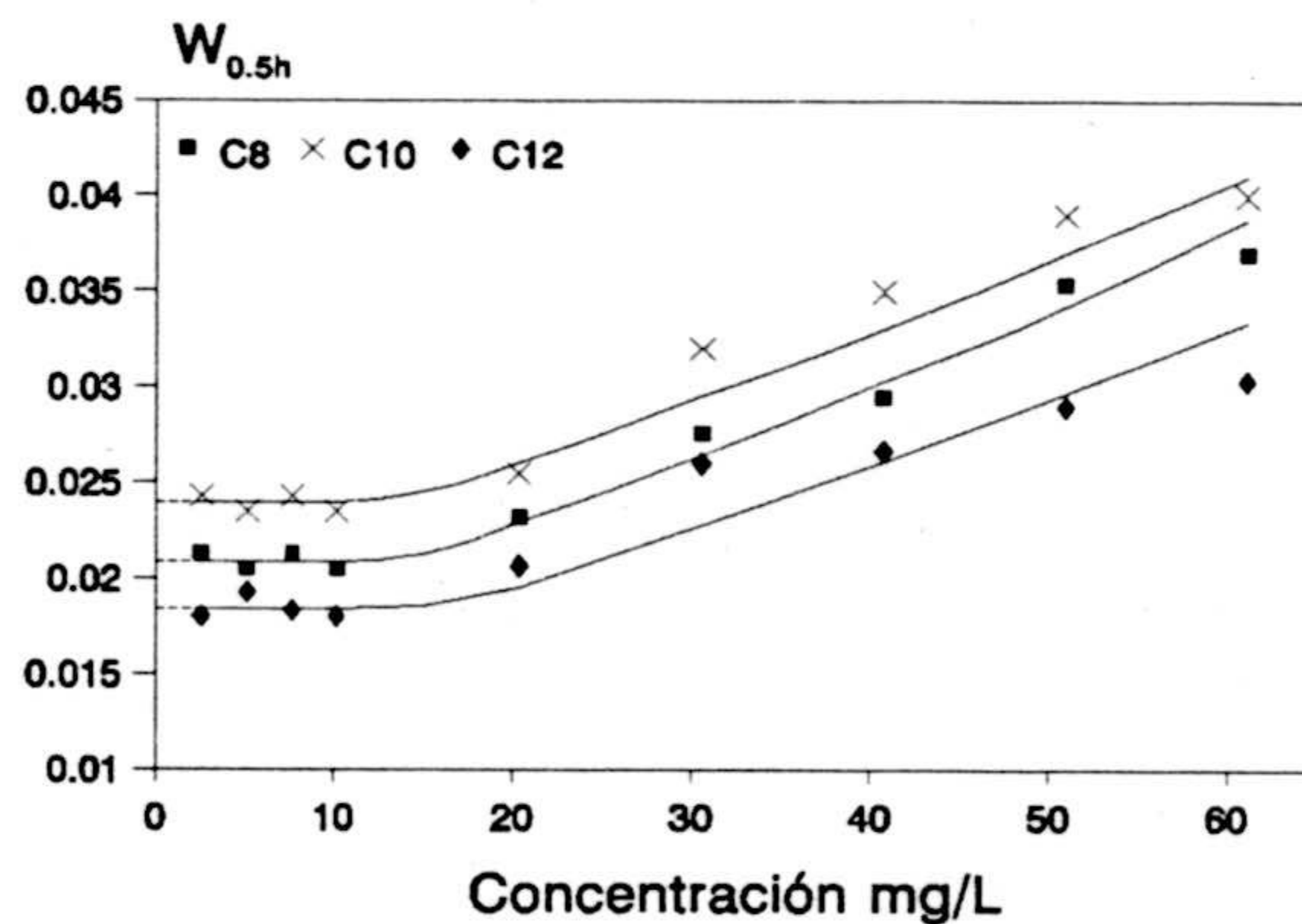


Figura III.56.- Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres  $C_8$ ,  $C_{10}$  y  $C_{12}$ .

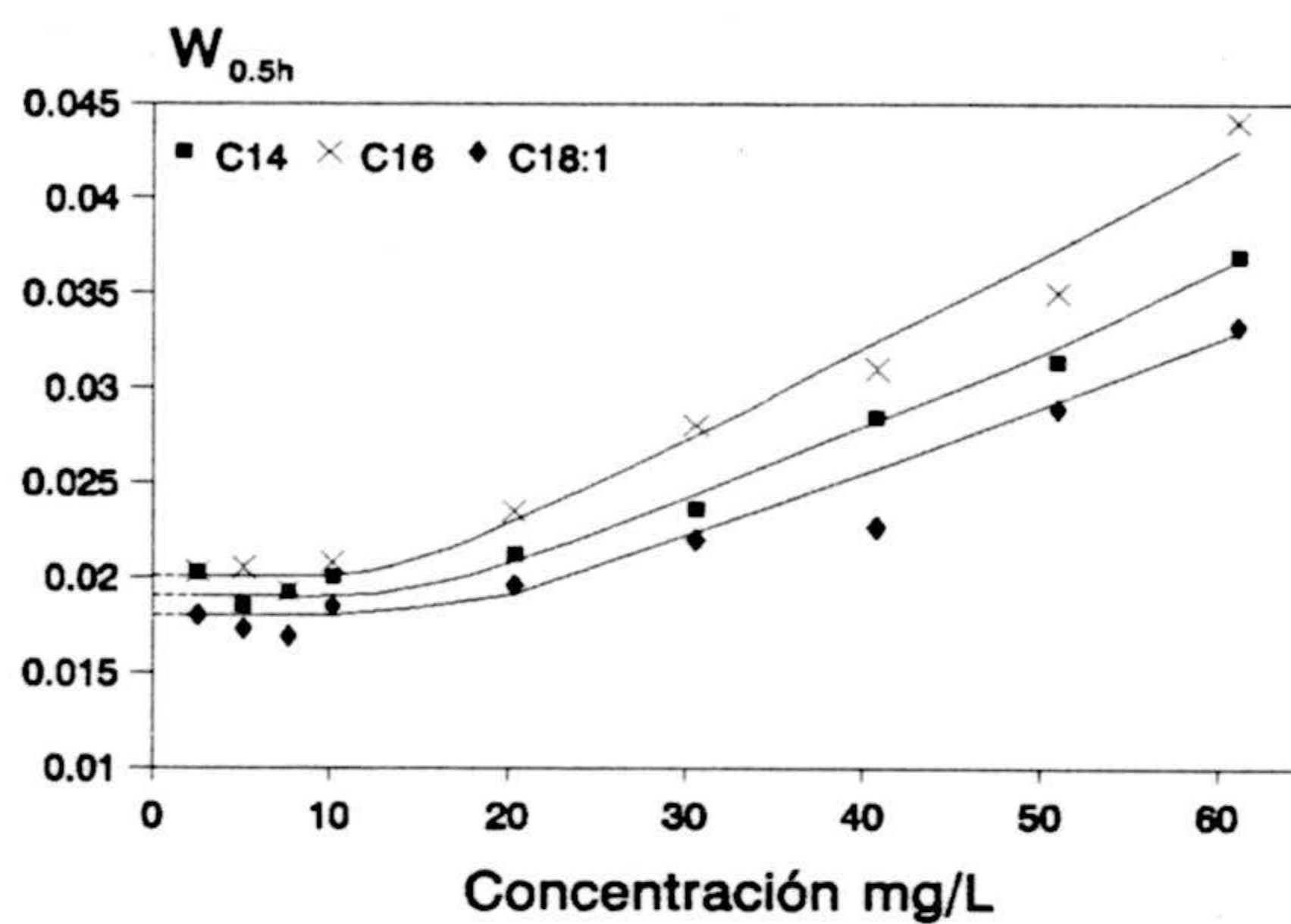
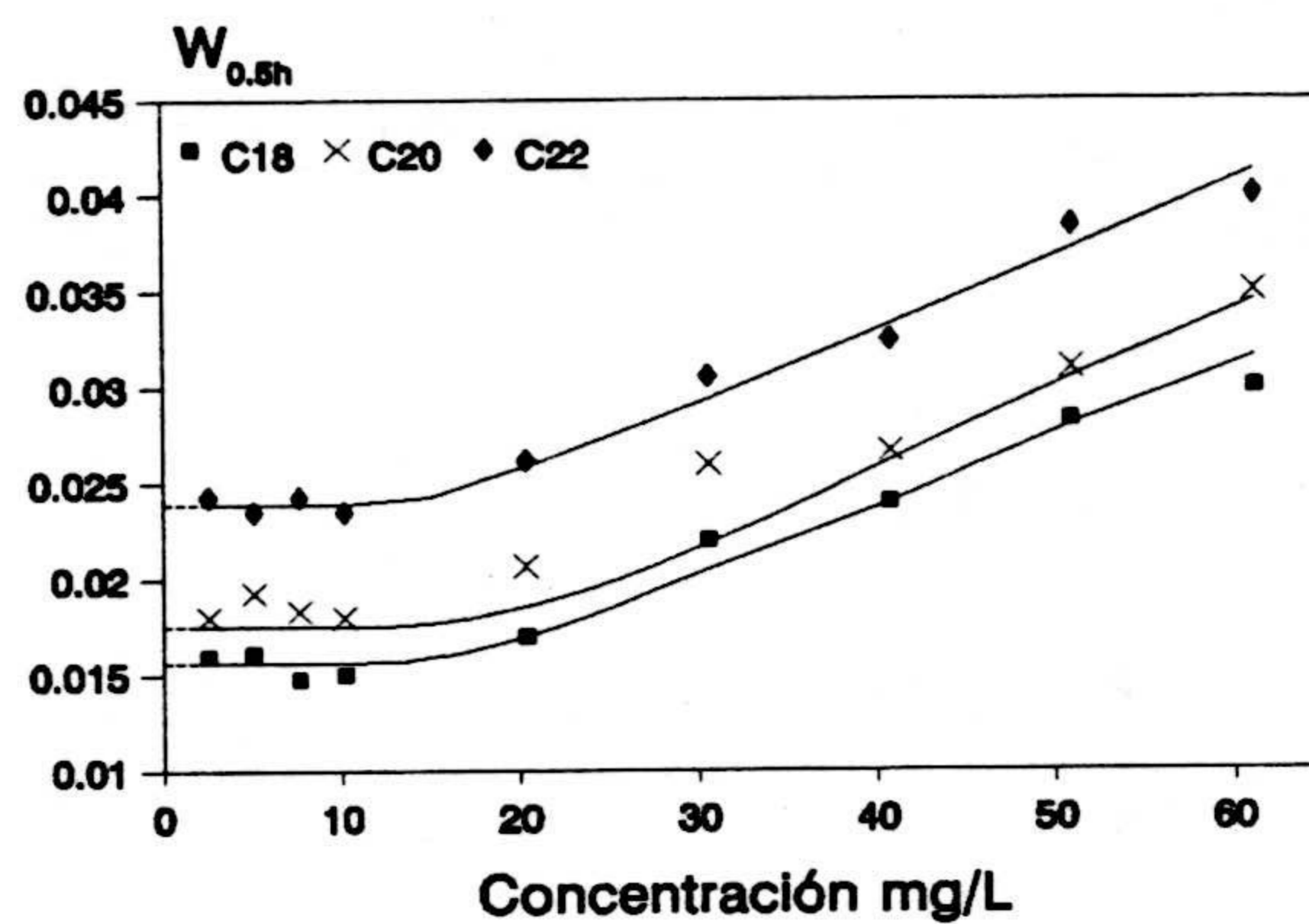


Figura III.57.- Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18:1}$ .



**Figura III.58.-** Anchura a mitad de altura en función de la concentración de los ésteres  $C_{18}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$

Tabla III.22.- Cálculo de la anchura de pico a concentración cero.

ÉSTERES METÍLICOS	$W_{0.5h}$ (min)	$W_{b0}$ (min)	$t_R \pm 0.5 W_{b0}$ (min)
Ácido Caprílico	0.0209	0.0533	$3.914 \pm 0.027$
Ácido Cáprico	0.0240	0.0612	$4.458 \pm 0.031$
Ácido Laurico	0.0194	0.0494	$5.481 \pm 0.025$
Ácido Mirístico	0.0190	0.0484	$5.871 \pm 0.024$
Ácido Palmítico	0.0201	0.0512	$6.313 \pm 0.026$
Ácido Oleico	0.0180	0.0459	$7.077 \pm 0.023$
Ácido Esteárico	0.0155	0.0395	$7.786 \pm 0.020$
Ácido Aráquico	0.0175	0.0446	$8.566 \pm 0.022$
Ácido Behénico	0.0240	0.0611	$9.503 \pm 0.031$

**Tabla III.23.-** Señales obtenidas para las diferentes concentraciones de ácidos grasos y para el patrón interno "surrogate".

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	0	0.00	491	0.38	972	0.76	1483	1.14	2005	1.54
	0	0.00	490	0.38	958	0.76	1523	1.15	1914	1.52
	0	0.00	503	0.38	986	0.77	1444	1.14	1971	1.53
	0	0.00	491	0.38	1039	0.76	1590	1.14	2038	1.54
	0	0.00	491	0.38	1033	0.77	1511	1.16	1889	1.53
	0	0.00	496	0.38	943	0.77	1542	1.15	1965	1.55
C <sub>10</sub>	0	0.00	319	0.25	646	0.50	990	0.76	1324	1.01
	0	0.00	320	0.25	625	0.50	1009	0.76	1280	1.02
	0	0.00	325	0.24	640	0.50	955	0.75	1288	1.00
	0	0.00	323	0.25	677	0.49	1020	0.73	1357	1.02
	0	0.00	322	0.25	666	0.49	982	0.75	1226	0.99
	0	0.00	322	0.25	604	0.49	1017	0.75	1289	1.01
C <sub>12</sub>	0	0.00	299	0.23	600	0.47	928	0.71	1239	0.95
	0	0.00	305	0.24	597	0.47	950	0.71	1190	0.95
	0	0.00	313	0.23	607	0.47	933	0.74	1247	0.97
	0	0.00	303	0.24	660	0.48	996	0.71	1281	0.97
	0	0.00	304	0.23	642	0.48	931	0.71	1181	0.96
	0	0.00	309	0.24	582	0.47	953	0.71	1213	0.95

A, área analito ( 10<sup>4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.23.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		2.5		5.0		7.5		10.0	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub>	0	0.00	287	0.22	580	0.45	868	0.67	1186	0.91
	0	0.00	284	0.22	570	0.45	935	0.70	1166	0.93
	0	0.00	298	0.22	581	0.45	876	0.69	1168	0.91
	0	0.00	285	0.22	622	0.45	932	0.67	1195	0.90
	0	0.00	296	0.23	615	0.46	879	0.67	1143	0.93
	0	0.00	291	0.22	559	0.45	906	0.67	1170	0.92
C <sub>16</sub>	0	0.00	315	0.24	626	0.49	963	0.74	1281	0.98
	0	0.00	320	0.25	622	0.49	974	0.73	1249	0.99
	0	0.00	329	0.25	627	0.49	945	0.75	1282	0.99
	0	0.00	314	0.24	665	0.48	1039	0.74	1301	0.98
	0	0.00	320	0.25	662	0.49	972	0.75	1201	0.97
	0	0.00	318	0.24	606	0.49	991	0.74	1253	0.99
C <sub>18</sub>	0	0.00	377	0.29	762	0.60	1185	0.91	1576	1.21
	0	0.00	385	0.30	754	0.60	1202	0.90	1499	1.19
	0	0.00	397	0.30	767	0.60	1133	0.90	1524	1.18
	0	0.00	379	0.30	819	0.60	1254	0.90	1601	1.21
	0	0.00	377	0.29	816	0.61	1144	0.88	1469	1.19
	0	0.00	383	0.29	743	0.60	1216	0.91	1516	1.19

A, área analito ( 10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.23.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		2.5		5.0		7.5		10.0	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	0	0.00	434	0.34	855	0.67	1321	1.02	1774	1.36
	0	0.00	425	0.33	861	0.68	1368	1.03	1697	1.35
	0	0.00	443	0.33	876	0.68	1284	1.01	1715	1.33
	0	0.00	431	0.34	923	0.67	1382	0.97	1780	1.34
	0	0.00	426	0.33	916	0.68	1328	1.02	1672	1.36
	0	0.00	438	0.34	843	0.68	1375	1.03	1697	1.34
C <sub>20</sub>	0	0.00	276	0.21	545	0.42	849	0.65	1114	0.85
	0	0.00	269	0.21	525	0.41	849	0.64	1089	0.87
	0	0.00	281	0.21	545	0.42	810	0.64	1101	0.85
	0	0.00	269	0.21	584	0.42	873	0.62	1129	0.85
	0	0.00	264	0.20	571	0.42	851	0.65	1063	0.86
	0	0.00	275	0.21	537	0.43	842	0.63	1101	0.87
C <sub>22</sub>	0	0.00	240	0.18	489	0.38	770	0.59	998	0.76
	0	0.00	239	0.18	481	0.38	763	0.57	949	0.75
	0	0.00	246	0.18	495	0.38	722	0.57	970	0.75
	0	0.00	242	0.19	528	0.38	803	0.57	1032	0.78
	0	0.00	243	0.19	518	0.38	738	0.56	941	0.76
	0	0.00	246	0.19	474	0.38	771	0.57	958	0.75

A, área analito (10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.23.- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-4</sup> )				
C <sub>13</sub>	130	139	129	132	129
	129	131	123	129	129
	128	125	132	124	136
	136	130	125	131	133
	132	120	126	133	133
	130	136	129	129	132



En la tabla III.24 se indican los principales parámetros estadísticos del calibrado correspondiente a cada ácido graso.

**Tabla III.24-** Parámetros estadísticos del calibrado.

	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
a	0.0004	-0.002	-0.001	-0.001	0.0012	0.0010	0.0023	-0.001	0.0006
s <sub>a</sub>	0.0018	0.0024	0.0019	0.0025	0.0015	0.0023	0.0028	0.0021	0.0020
P <sub>a</sub>	82	39	65	68	41	65	42	50	76
b	0.899	0.964	0.955	0.926	0.948	0.957	0.896	0.829	0.759
s <sub>b</sub>	0.0017	0.0037	0.0031	0.0042	0.0023	0.0029	0.0031	0.0032	0.0033
P <sub>b</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9997	0.9999	0.9999	0.9998	0.9998	0.9997
R <sup>2</sup>	99.99	99.96	99.97	99.94	99.98	99.97	99.97	99.96	99.95
S <sub>R,C</sub>	0.0056	0.0076	0.0060	0.0081	0.0047	0.0071	0.0090	0.0065	0.0064
P <sub>FA</sub>	62	31	87	63	29	58	15	70	16

En la figuras III.59 - III.67 se representa la recta de calibrado de cada ácido graso.

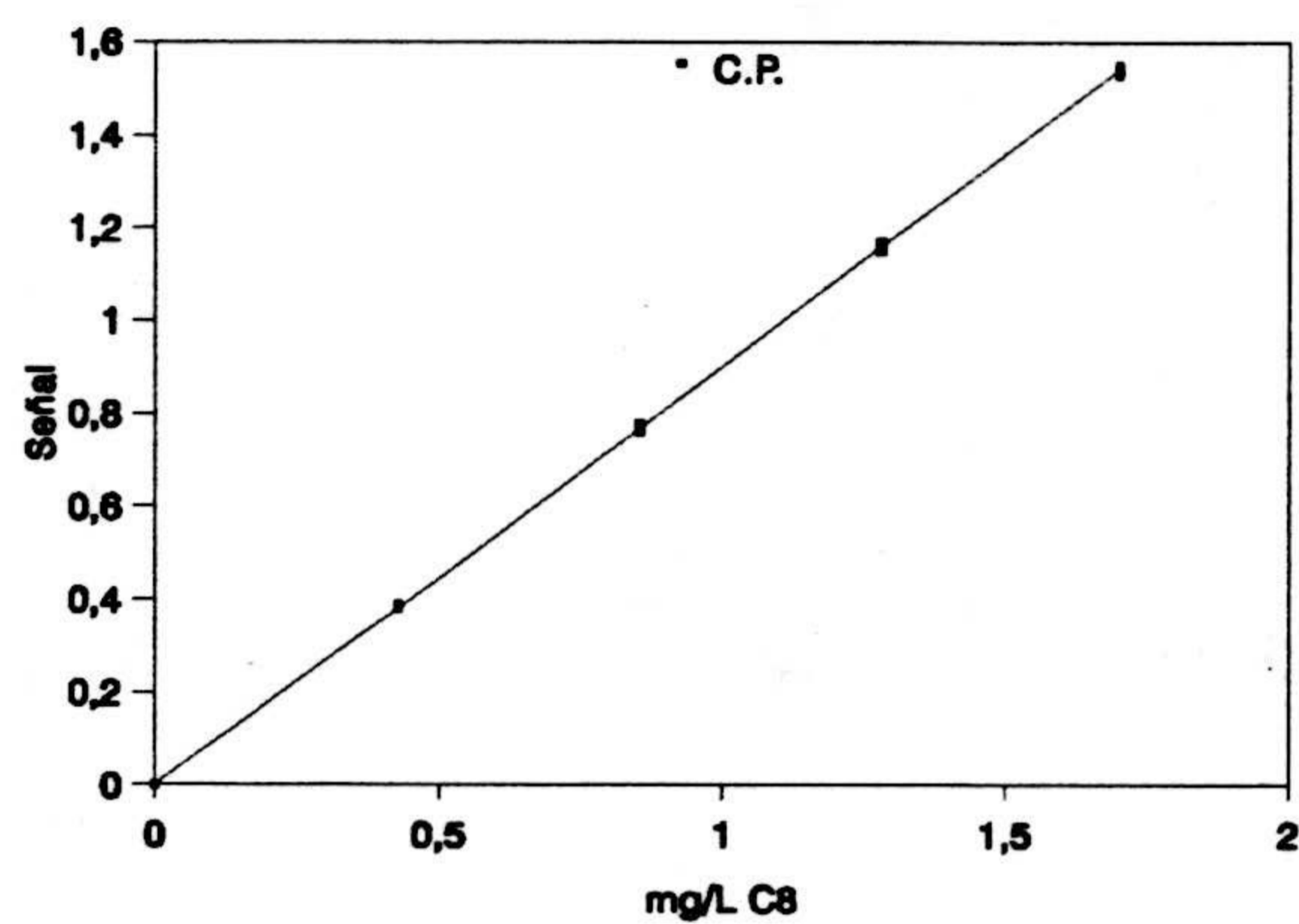


Figura III.59.- Recta de calibrado para el éster C<sub>8</sub>.

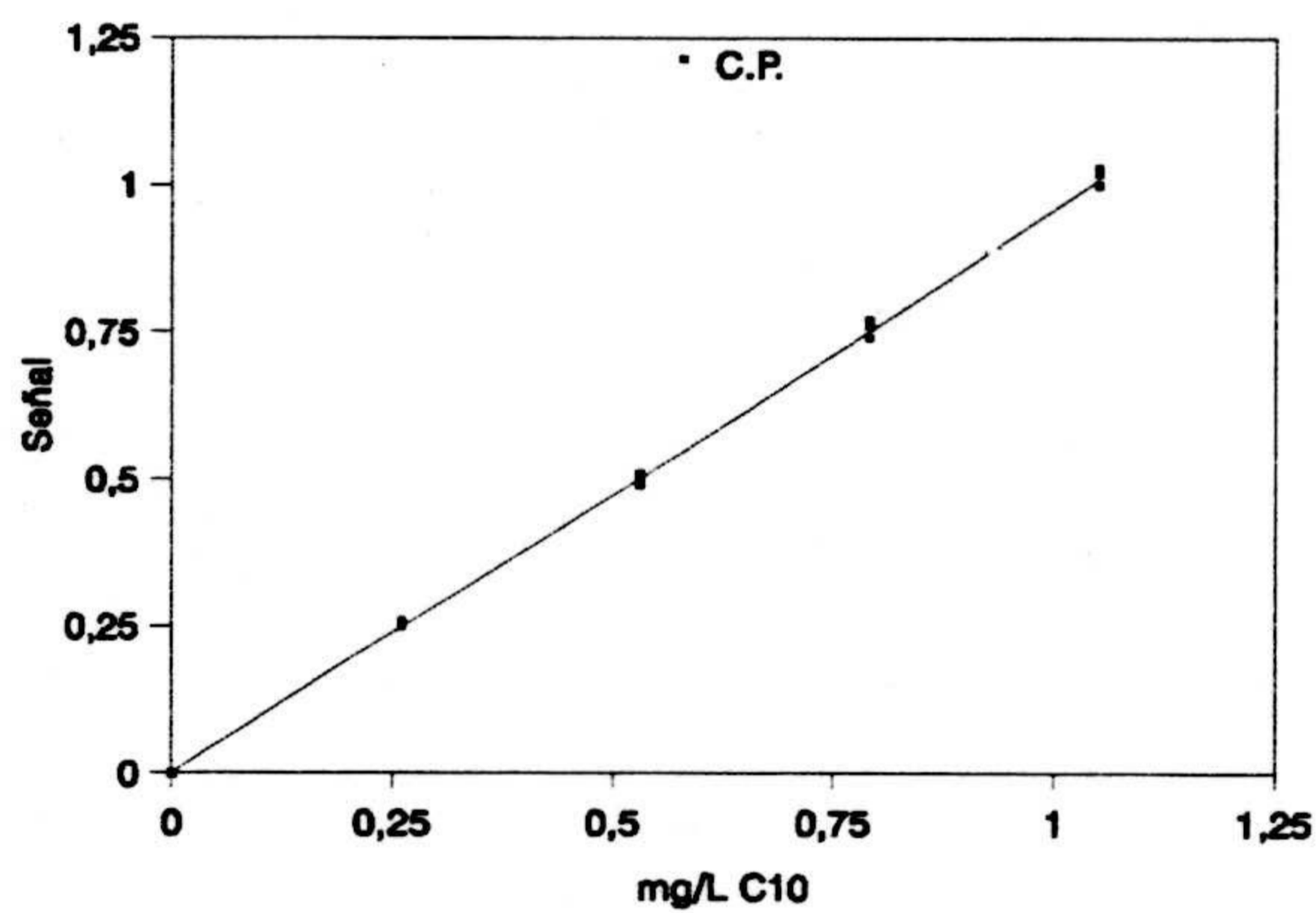


Figura III.60.- Recta de calibrado para el éster C<sub>10</sub>.

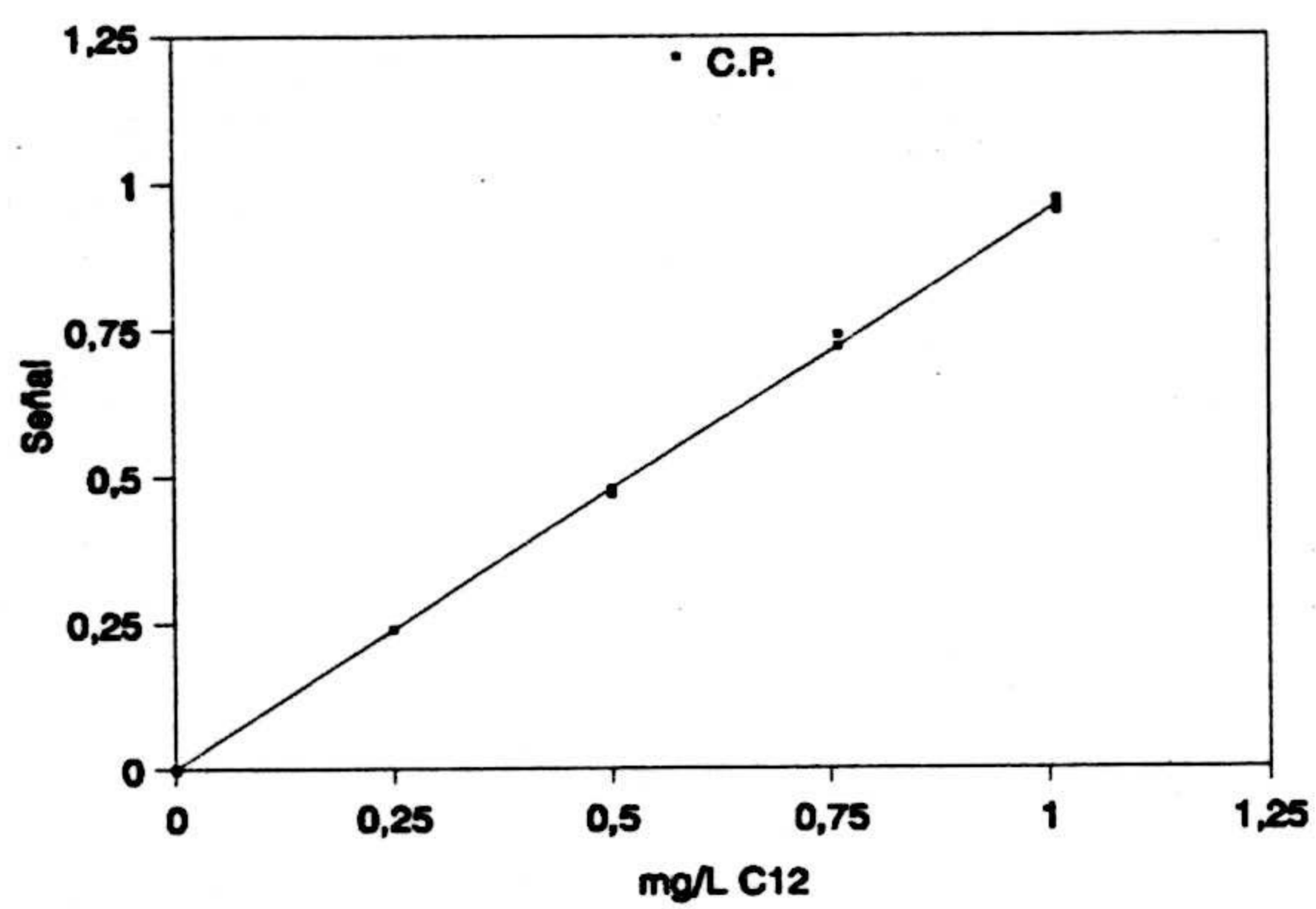


Figura III.61.- Recta de calibrado para el éster C<sub>12</sub>.

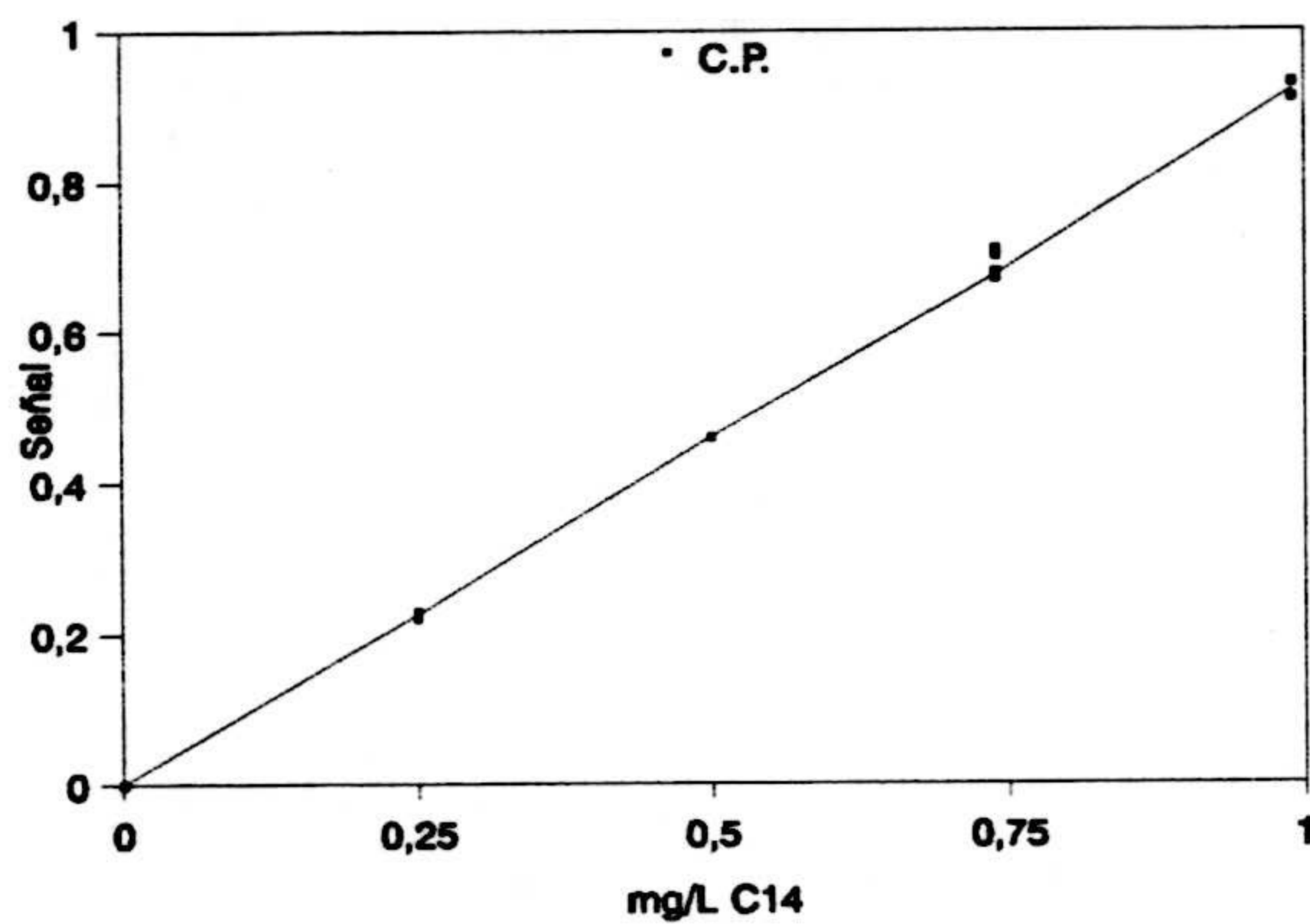


Figura III.62.- Recta de calibrado para el éster C<sub>14</sub>.

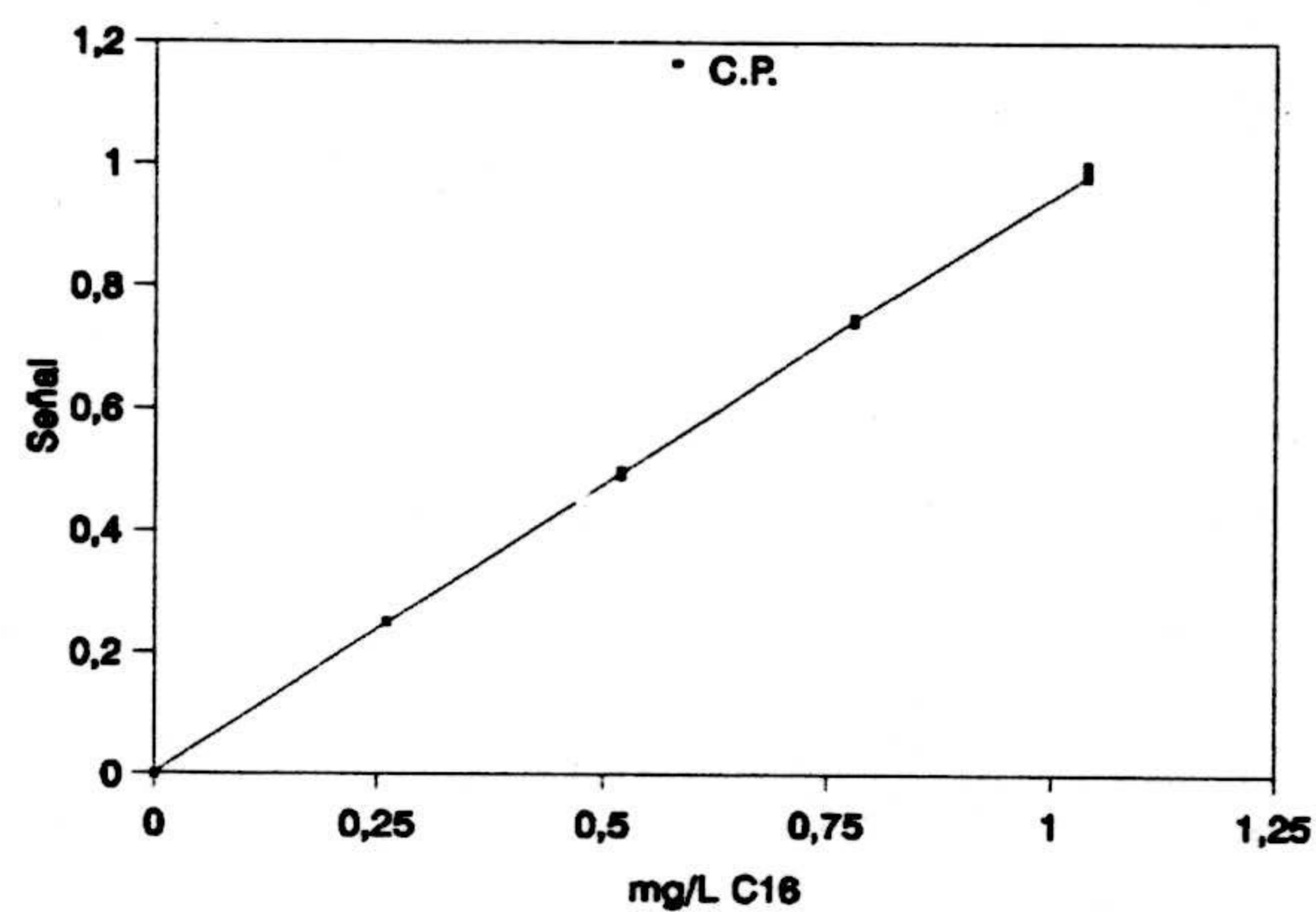


Figura III.63.- Recta de calibrado para el éster C<sub>16</sub>.

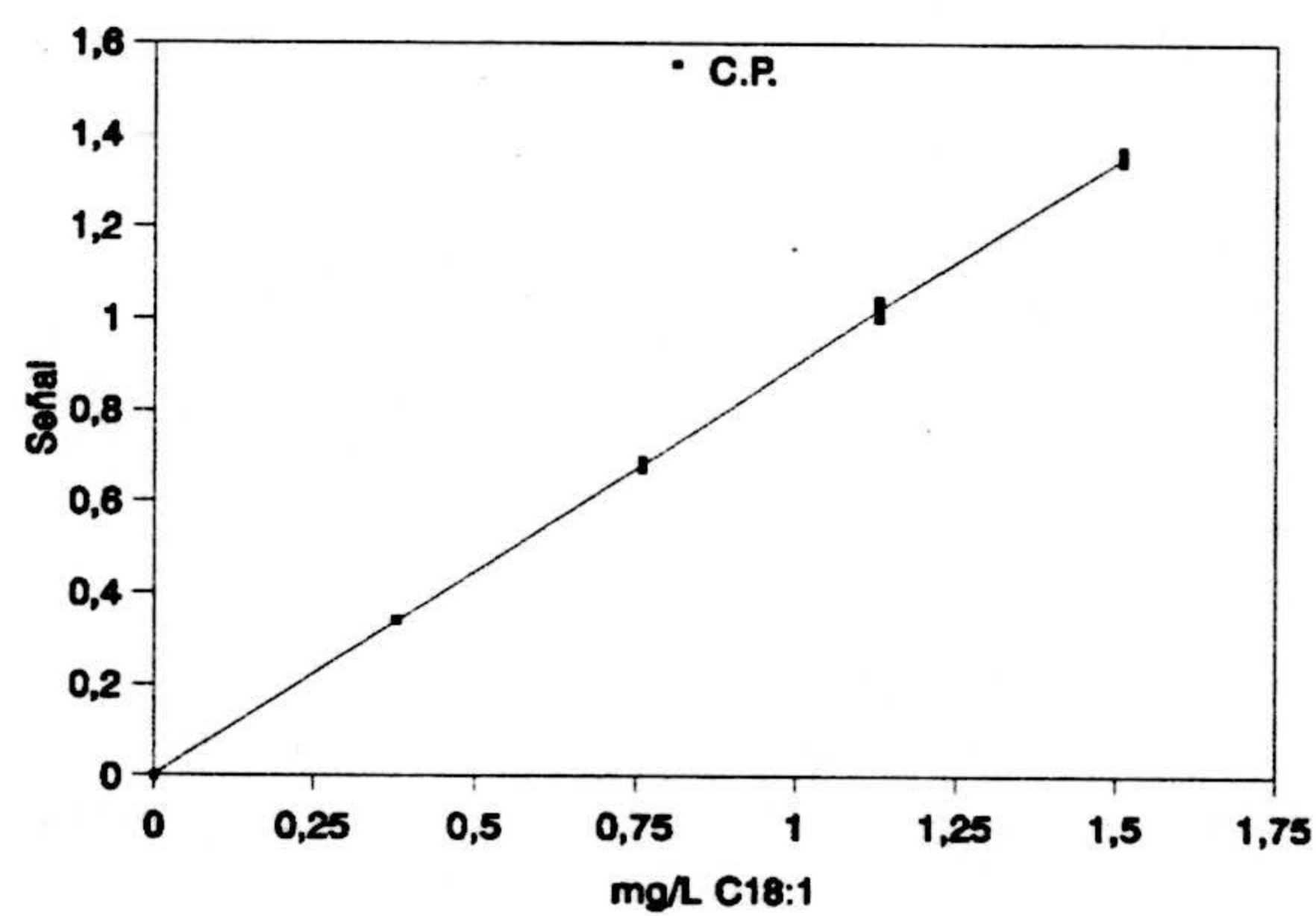


Figura III.64.- Recta de calibrado para el éster C<sub>18:1</sub>.

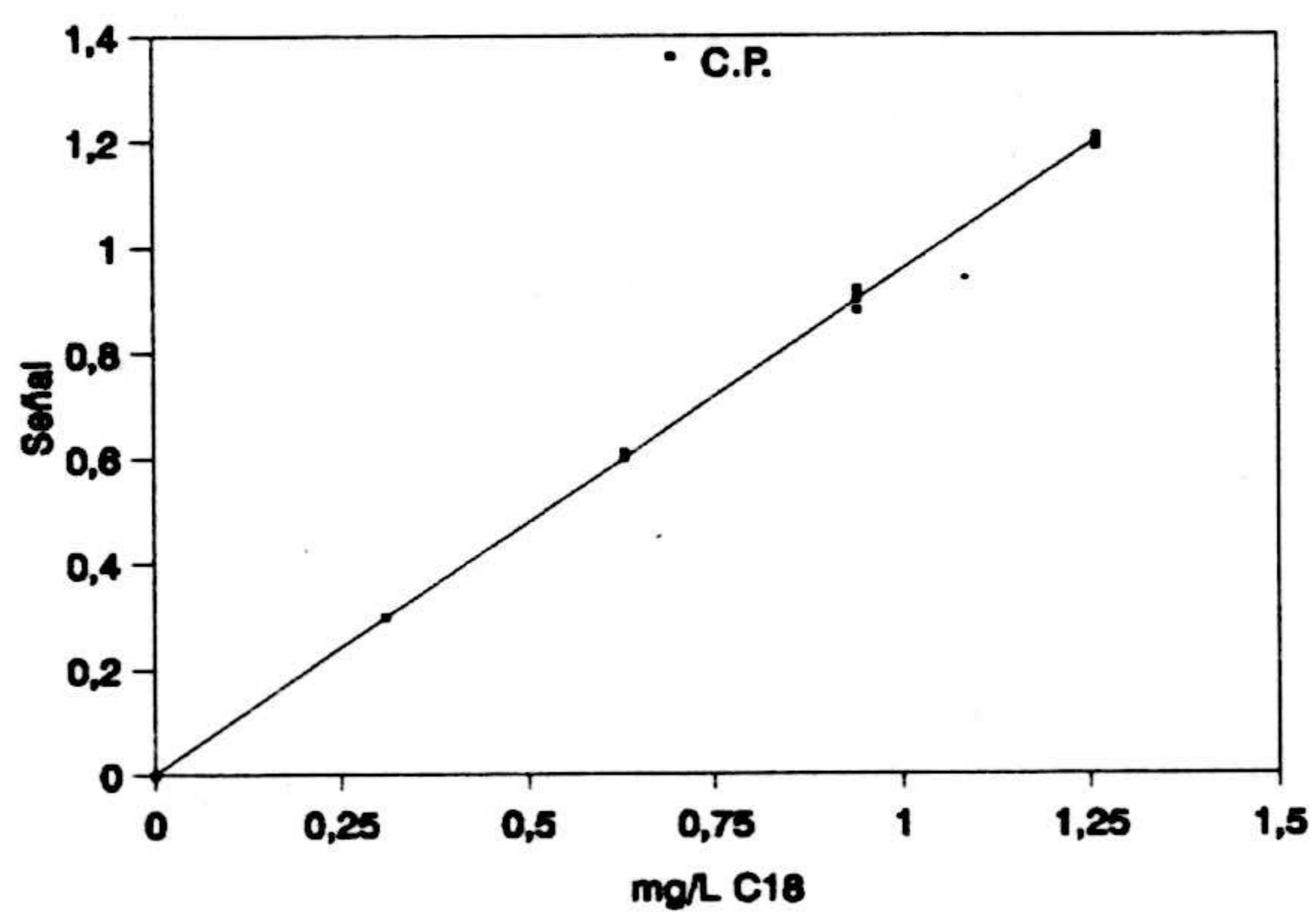


Figura III.65.- Recta de calibrado para el éster C<sub>18</sub>.

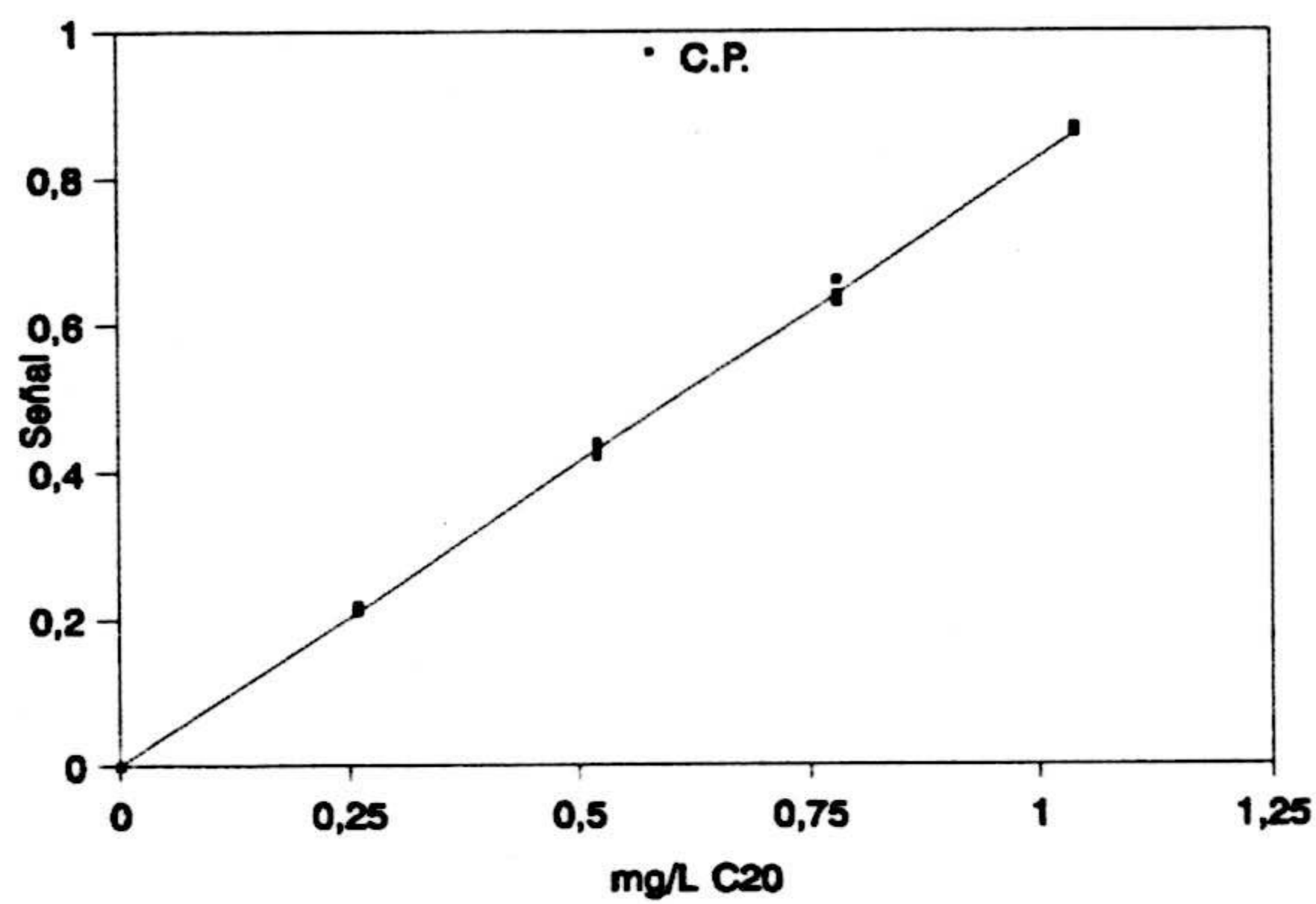


Figura III.66.- Recta de calibrado para el éster C<sub>20</sub>.

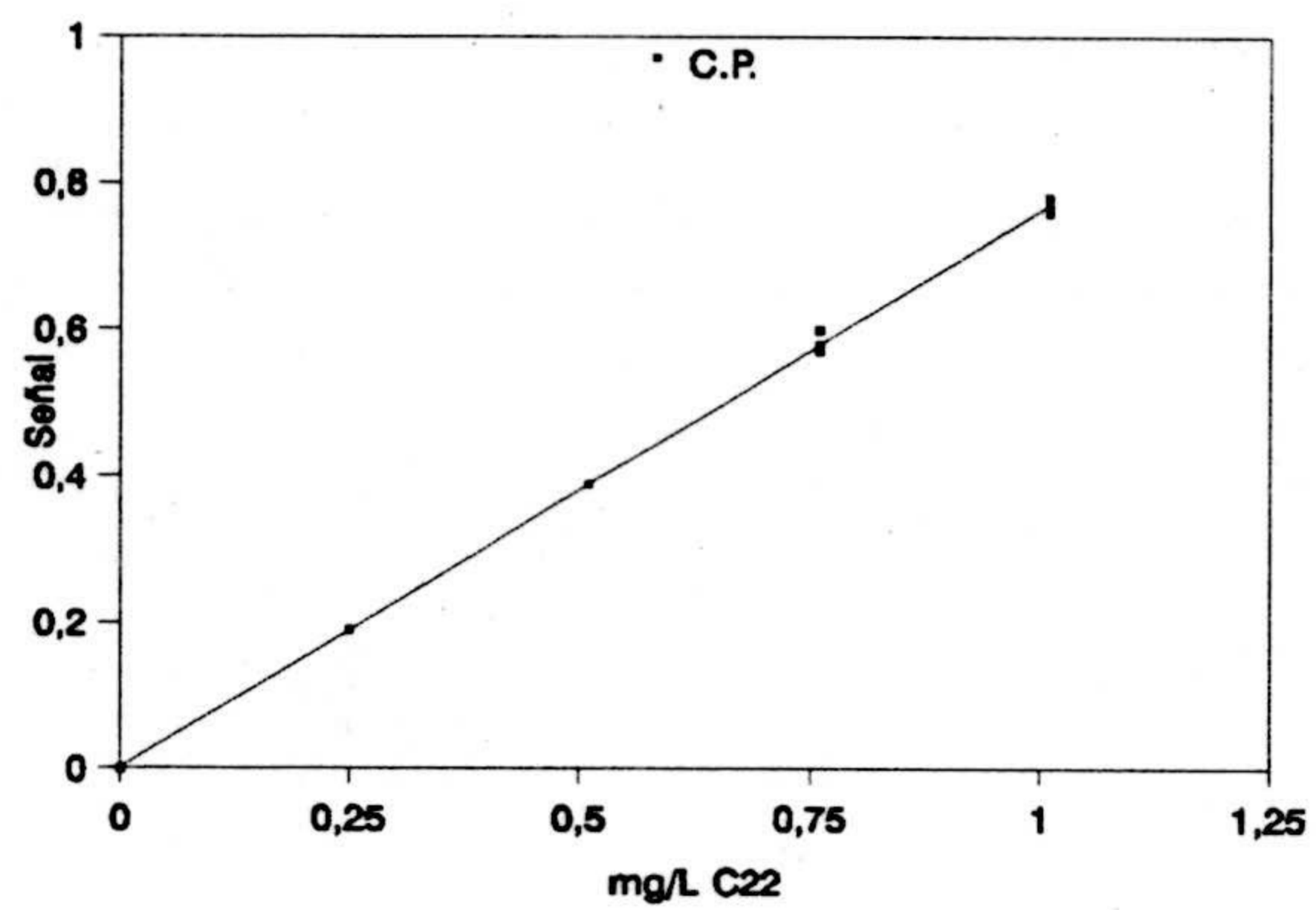


Figura III.67.- Recta de calibrado para el éster C<sub>22</sub>.

**Tabla III.25.-** Parámetros de calidad del método analítico a partir de los datos del calibrado.

<b>ÉSTERES METÍLICOS</b>	<b>Lin. %</b>	<b>RDL mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Sensi. mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LD mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LQ mgL<sup>-1</sup></b>
Ácido Caprílico	99.8	0.010-1.71	0.0065	0.010	0.034
Ácido Cáprico	99.6	0.012-1.05	0.0079	0.012	0.041
Ácido Laurico	99.7	0.010-1.01	0.0063	0.010	0.032
Ácido Mirístico	99.5	0.014-0.99	0.0088	0.014	0.043
Ácido Palmítico	99.8	0.008-1.04	0.0049	0.008	0.025
Ácido Estearico	99.7	0.012-1.26	0.0075	0.012	0.039
Ácido Oléico	99.7	0.016-1.51	0.0100	0.016	0.025
Ácido Aráquico	99.6	0.012-1.04	0.0078	0.012	0.039
Ácido Behénico	99.6	0.013-1.01	0.0084	0.013	0.052

En la figuras III.68 - III.76 se representa la variación de la precisión del método en función de la concentración de cada éster metílico.

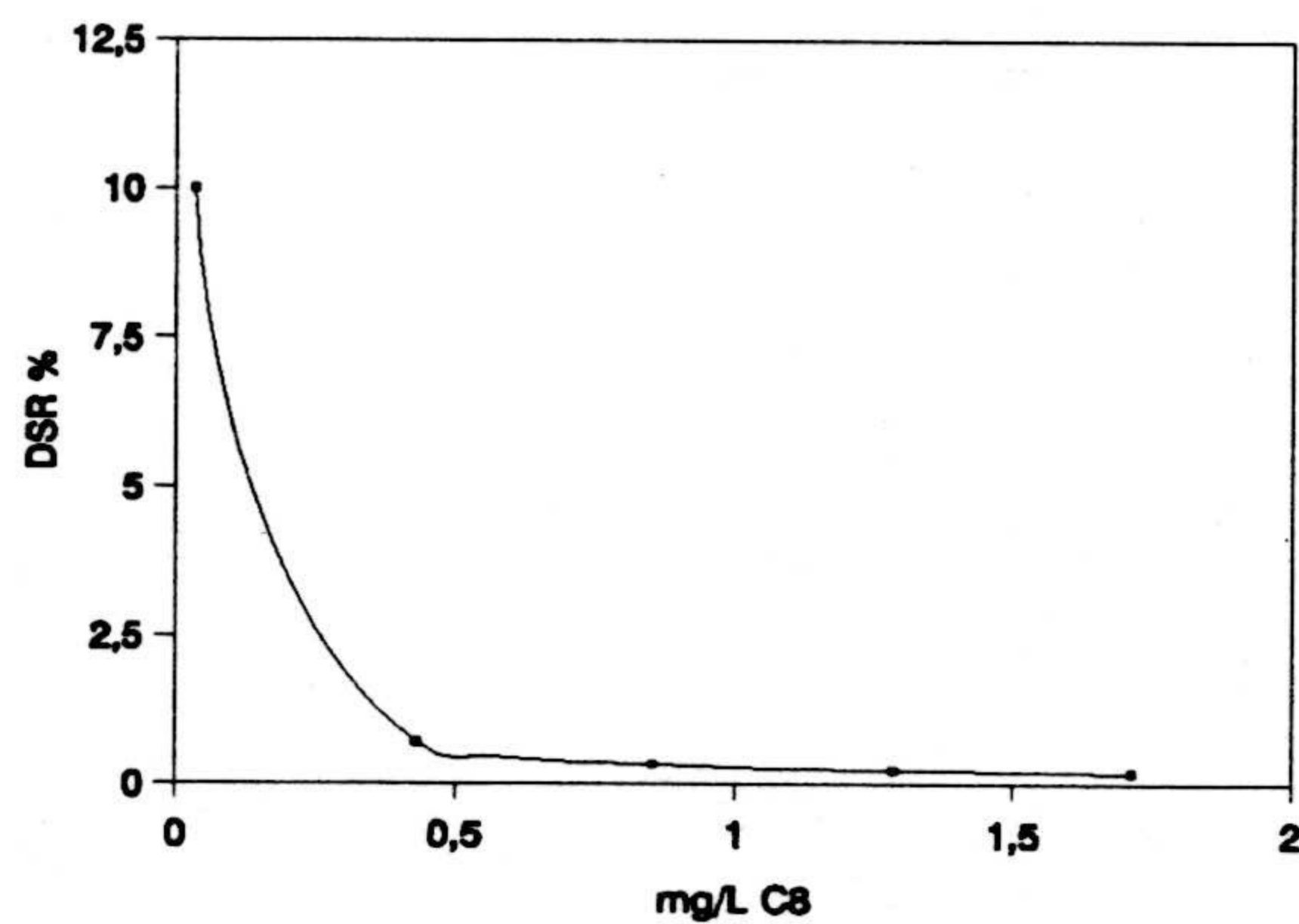


Figura III.68.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>8</sub>.

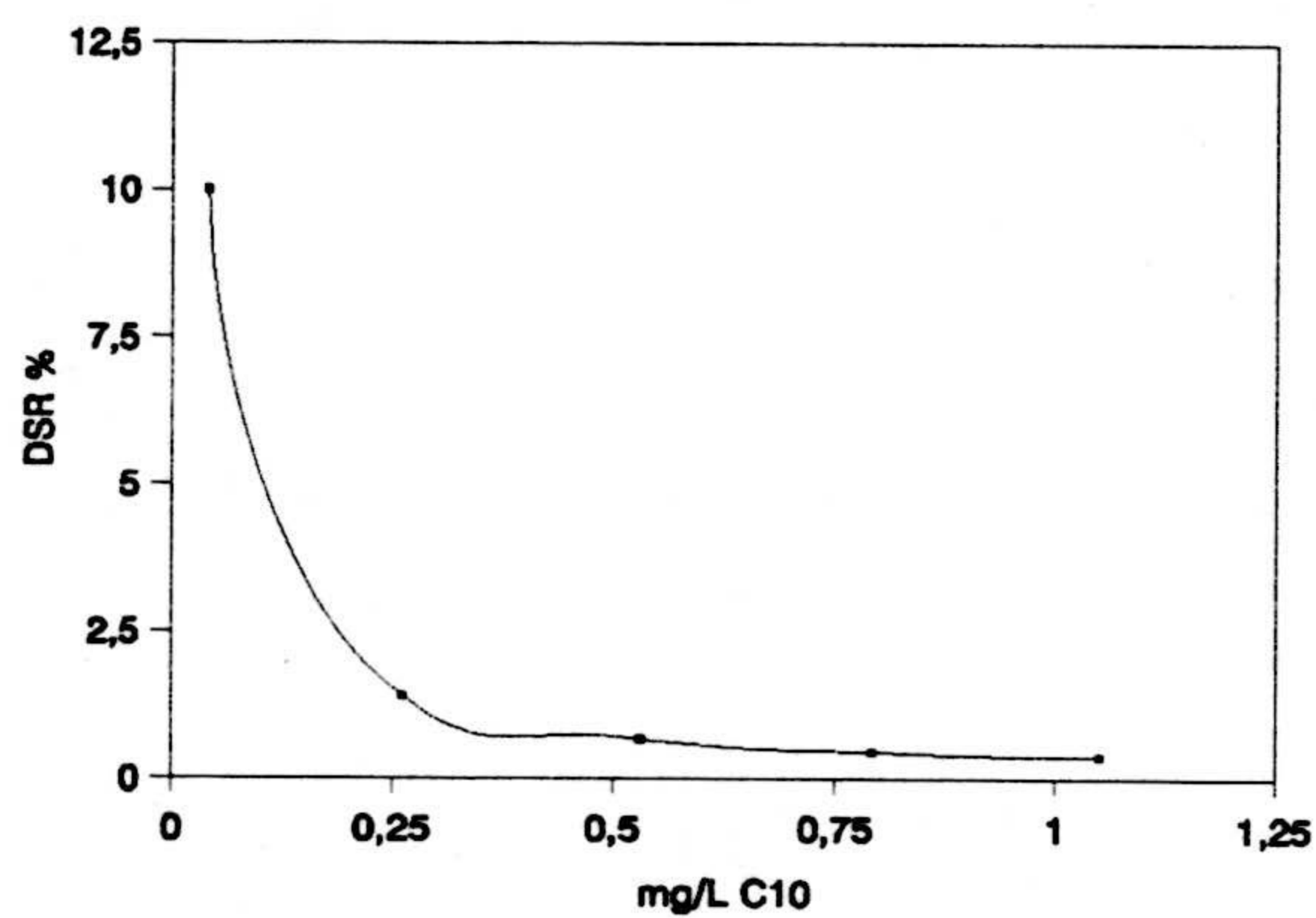


Figura III.69.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>10</sub>.



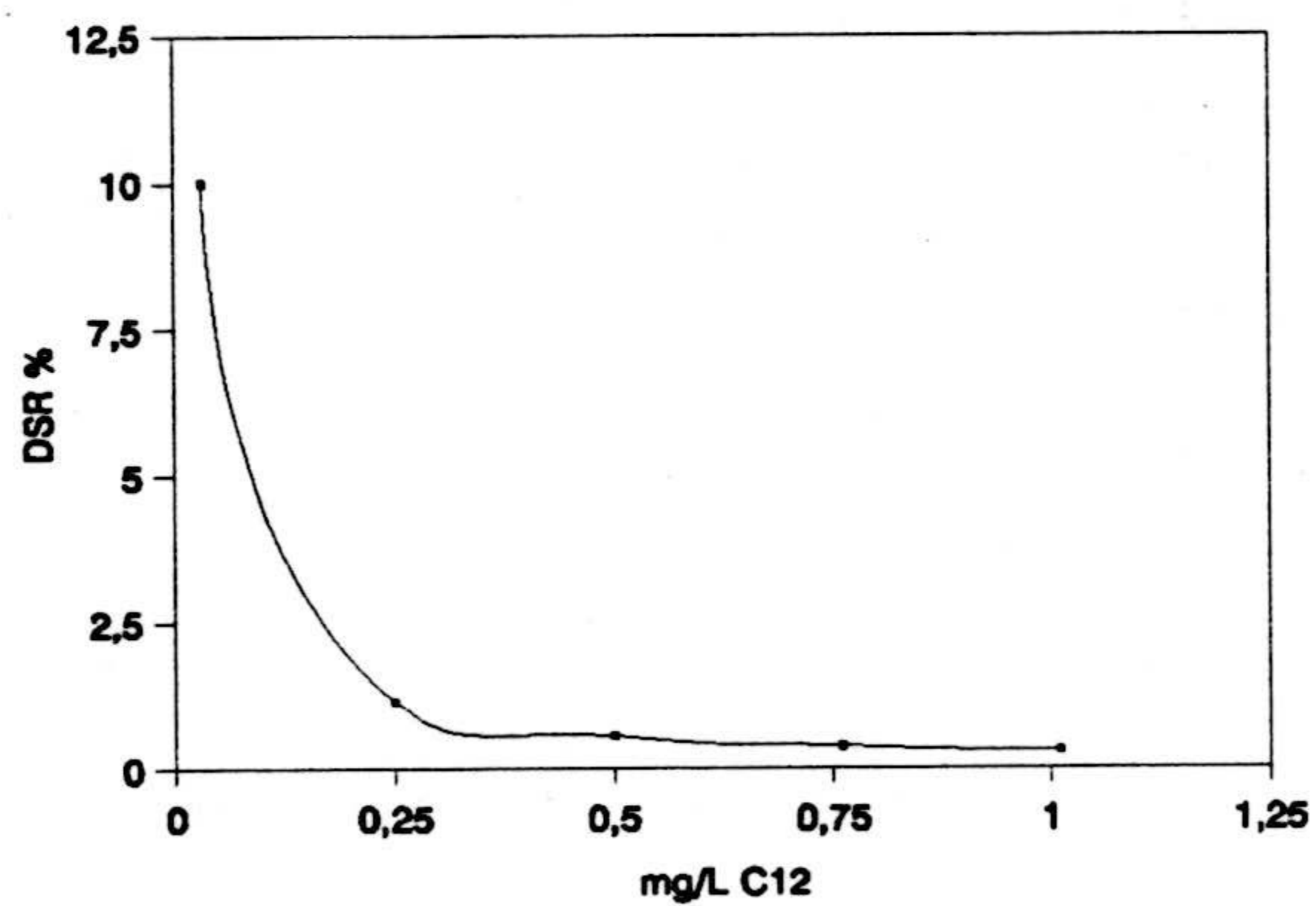


Figura III.70.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>12</sub>.

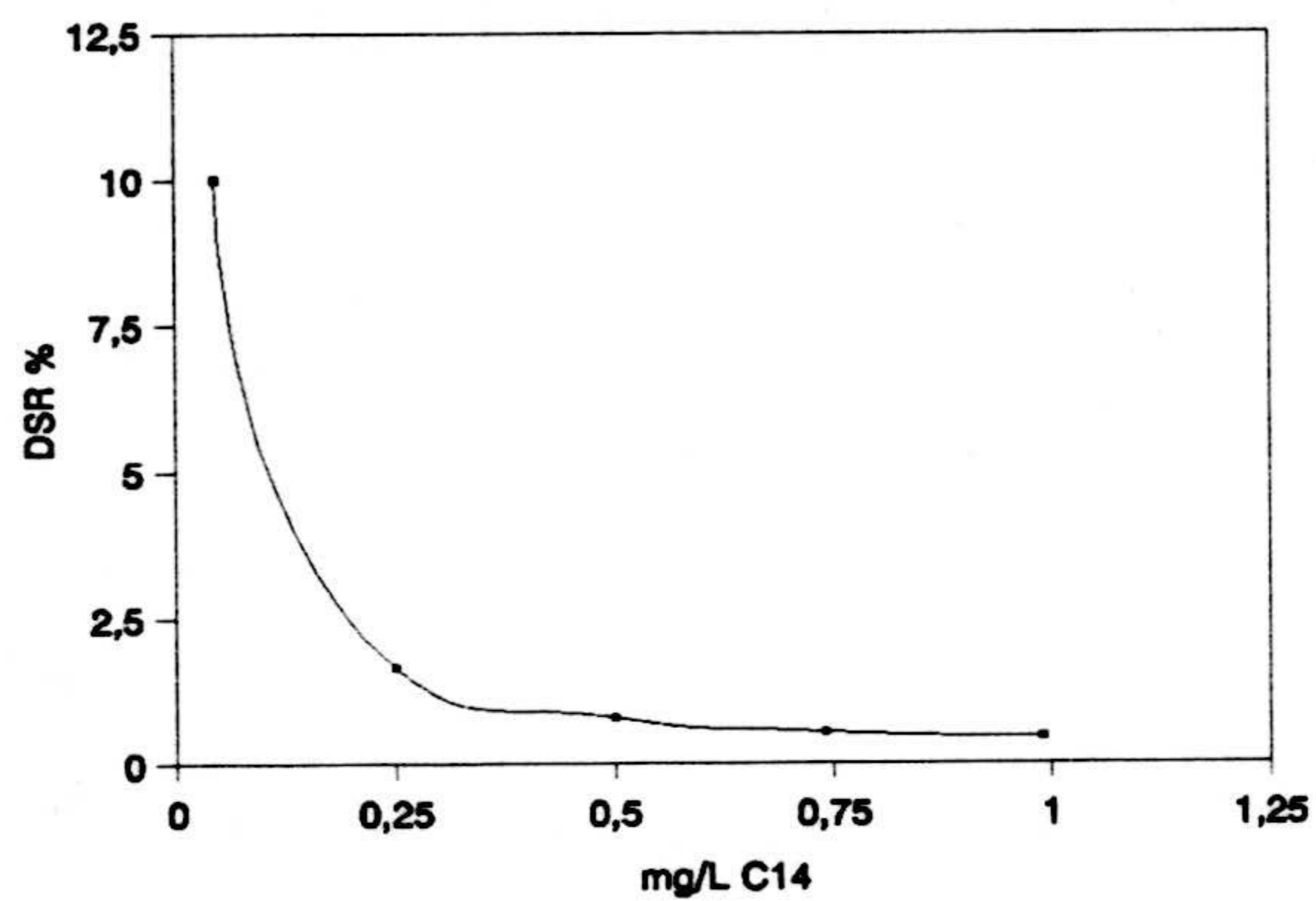


Figura III.71.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>14</sub>.

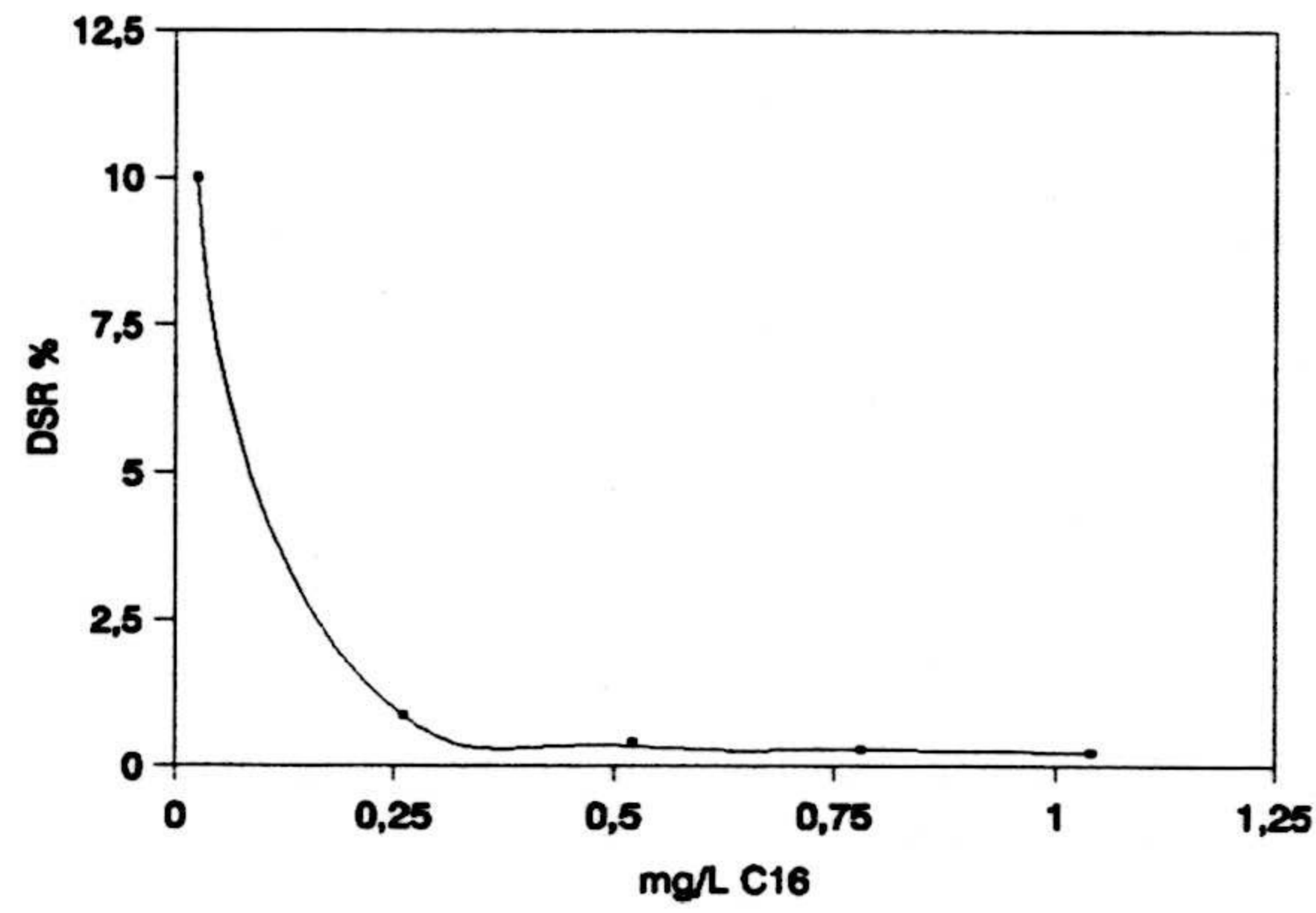


Figura III.72.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>16</sub>.

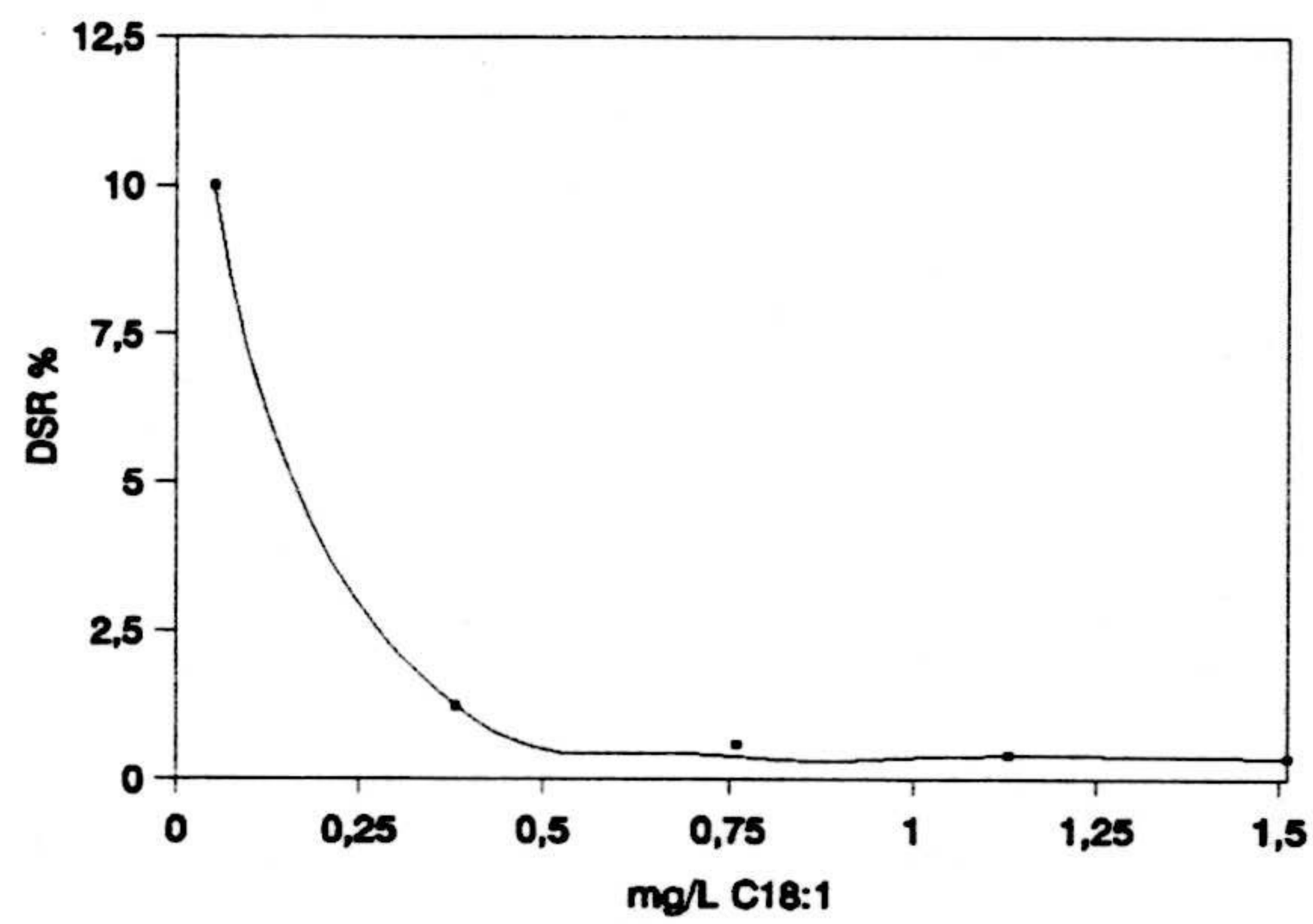


Figura III.73.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>18:1</sub>.

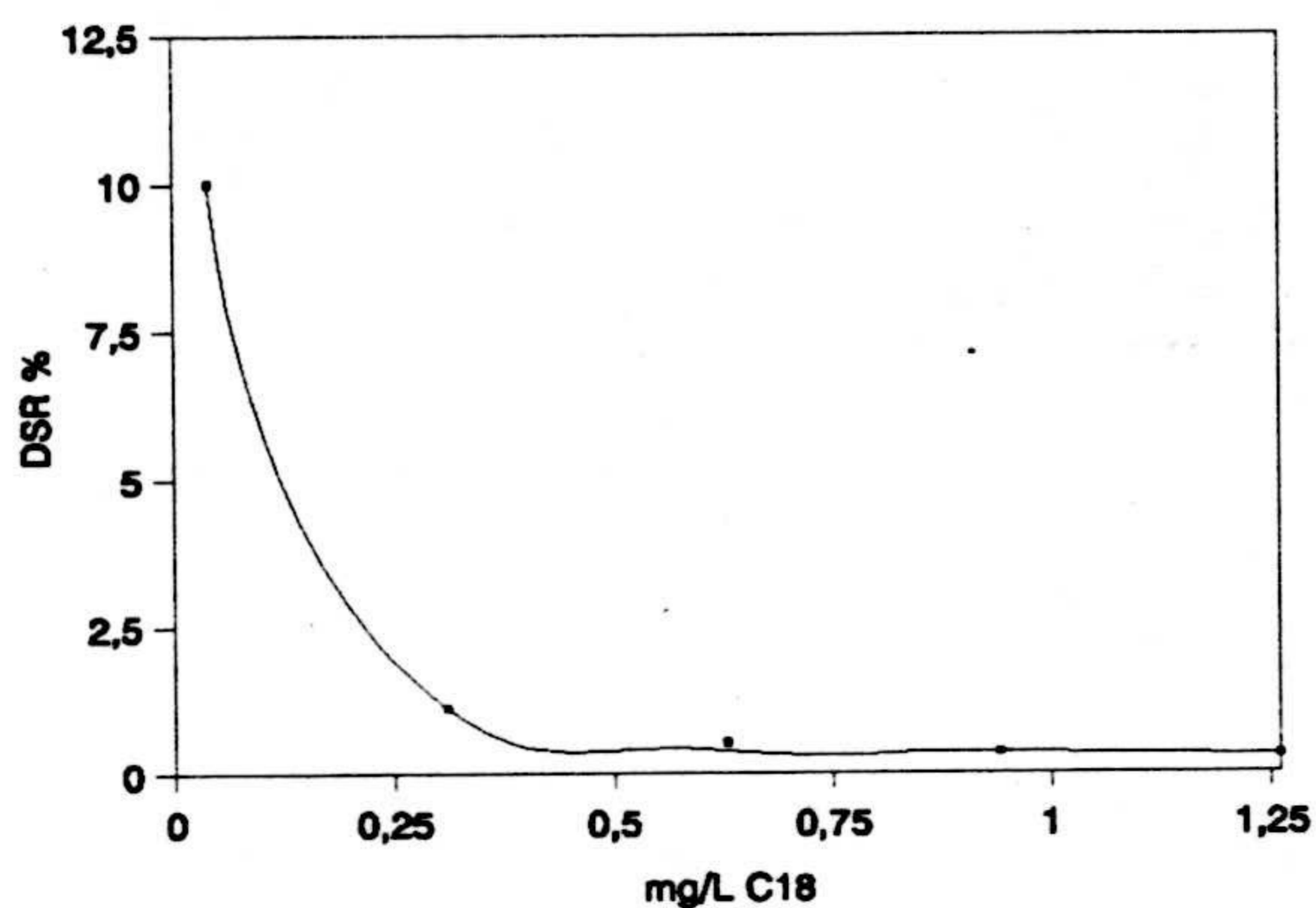


Figura III.74.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>18</sub>.

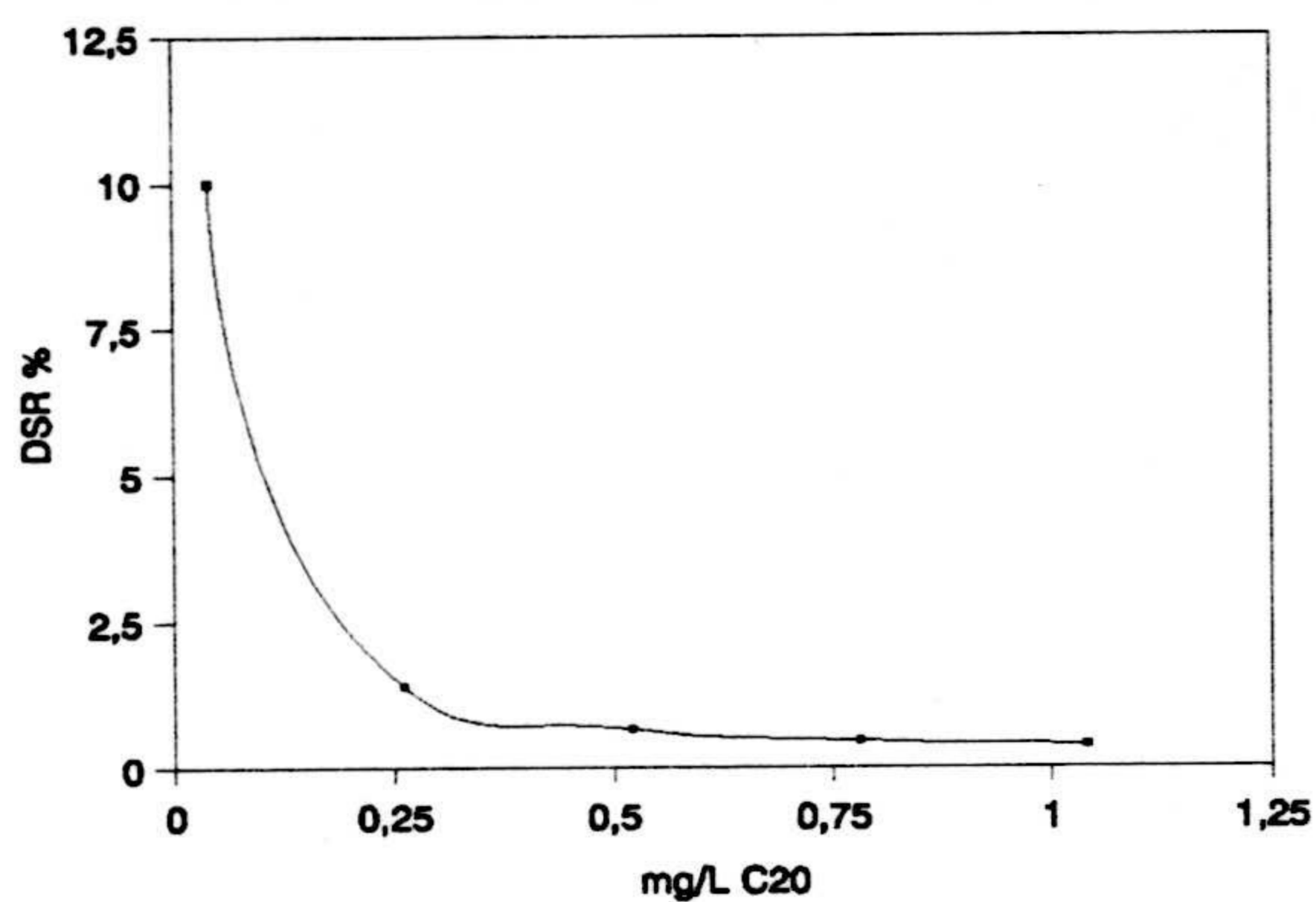
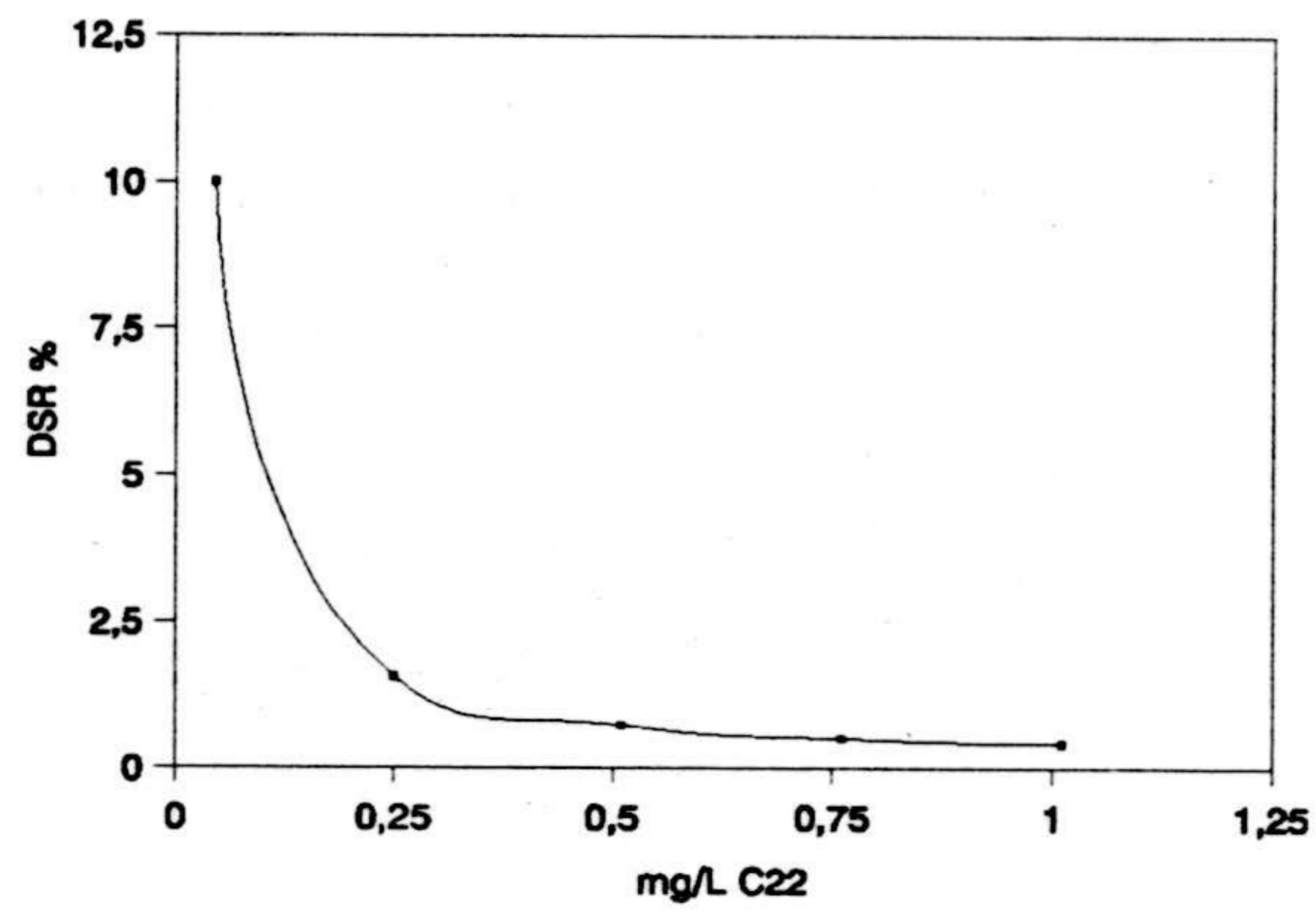


Figura III.75.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>20</sub>.



**Figura III.76.-** DSR % en función de la concentración del éster C<sub>22</sub>.

### 3.2.2- Rango 0 - 10 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 3.2.2.1.- Establecimiento de las rectas de calibrado.

Para establecer las rectas de calibrado se seguirá el mismo proceso descrito en el apartado anterior. En esta ocasión hemos partido de una disolución madre de ácidos grasos de 100 mgL<sup>-1</sup>, y se han preparado disoluciones con una concentración final individual de 0.00, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 mgL<sup>-1</sup>.

En la tabla III.26 se indican las áreas obtenidas para cada ácido graso así como para el patrón interno. Se observa que para cada analito tenemos seis señales, al tener dos réplicas y tres inyecciones de cada réplica.

**Tabla III.26.-** Señales obtenidas para las diferentes concentraciones de ácidos grasos y para el patrón interno "surrogate".

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		2.5		5.0		7.5		10.0	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	0	0.00	319	2.30	604	4.67	926	7.01	1195	9.29
	0	0.00	309	2.35	574	4.64	899	6.98	1198	9.30
	0	0.00	291	2.32	609	4.62	869	7.01	1264	9.28
	0	0.00	300	2.31	581	4.64	914	6.98	1230	9.28
	0	0.00	279	2.33	587	4.68	937	7.03	1251	9.41
	0	0.00	316	2.32	602	4.66	907	7.00	1227	9.29
C <sub>10</sub>	1	0.01	335	2.41	623	4.82	961	7.28	1249	9.70
	1	0.01	318	2.43	601	4.86	935	7.25	1245	9.67
	1	0.01	304	2.43	643	4.88	901	7.28	1319	9.69
	1	0.01	317	2.44	608	4.86	954	7.28	1292	9.75
	1	0.01	292	2.43	611	4.87	970	7.27	1294	9.74
	1	0.01	330	2.43	629	4.87	941	7.27	1280	9.70
C <sub>12</sub>	1	0.00	420	3.03	777	6.01	1188	9.01	1554	12.1
	1	0.01	390	2.97	744	6.02	1162	9.01	1546	12.0
	1	0.00	379	3.02	799	6.06	1118	9.03	1636	12.0
	1	0.00	391	3.01	757	6.04	1176	8.97	1584	11.9
	1	0.00	364	3.03	748	5.96	1209	9.06	1602	12.1
	1	0.00	412	3.03	779	6.04	1168	9.03	1594	12.1

A, área analito ( 10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.26.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		2.5		5.0		7.5		10.0	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub>	0	0.00	321	2.31	605	4.69	922	6.99	1202	9.33
	0	0.00	307	2.34	577	4.68	915	7.09	1206	9.37
	0	0.00	292	2.34	615	4.66	869	7.02	1270	9.33
	0	0.00	301	2.32	586	4.68	920	7.02	1240	9.36
	0	0.00	282	2.35	588	4.69	936	7.02	1239	9.33
	0	0.00	316	2.32	606	4.69	908	7.02	1238	9.38
C <sub>16</sub>	0	0.00	313	2.26	584	4.52	897	6.80	1165	9.05
	0	0.00	297	2.27	557	4.51	873	6.77	1168	9.06
	0	0.00	280	2.24	600	4.55	841	6.79	1227	9.01
	0	0.00	292	2.25	563	4.49	888	6.77	1201	9.06
	0	0.00	271	2.26	566	4.51	901	6.76	1208	9.09
	0	0.00	310	2.28	584	4.52	876	6.77	1183	8.96
C <sub>18</sub>	1	0.01	331	2.39	613	4.74	951	7.20	1222	9.49
	1	0.01	316	2.41	589	4.77	926	7.18	1240	9.63
	1	0.01	301	2.40	627	4.75	892	7.21	1301	9.56
	1	0.01	309	2.38	601	4.80	941	7.18	1266	9.55
	1	0.01	286	2.38	602	4.80	954	7.16	1277	9.61
	1	0.01	324	2.38	614	4.76	923	7.13	1262	9.56

A, área analito ( 10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla III.26.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		2.5		5.0		7.5		10.0	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	0	0.00	332	2.39	614	4.76	949	7.19	1234	9.59
	0	0.00	316	2.41	592	4.80	919	7.13	1229	9.54
	0	0.00	302	2.41	628	4.77	883	7.14	1299	9.54
	0	0.00	313	2.41	598	4.78	928	7.08	1274	9.61
	0	0.00	289	2.41	599	4.77	958	7.18	1283	9.65
	0	0.00	328	2.41	623	7.82	941	7.27	1272	9.64
C <sub>20</sub>	0	0.00	285	2.06	530	4.11	803	6.09	1045	8.12
	0	0.00	268	2.04	509	4.12	789	6.12	1050	8.16
	0	0.00	256	2.05	536	4.07	759	6.13	1115	8.19
	0	0.00	265	2.04	513	4.10	807	6.15	1086	8.19
	0	0.00	244	2.04	512	4.08	820	6.15	1083	8.15
	0	0.00	279	2.05	526	4.07	791	6.11	1071	8.12
C <sub>22</sub>	1	0.01	270	1.95	502	3.89	771	5.85	999	7.75
	1	0.01	254	1.94	481	3.90	756	5.87	1002	7.78
	1	0.01	245	1.96	513	3.89	718	5.80	1060	7.79
	1	0.01	253	1.95	485	3.87	763	5.82	1037	7.82
	1	0.01	234	1.95	489	3.90	777	5.82	1027	7.73
	1	0.01	262	1.93	504	3.91	755	5.84	1023	7.75

A, área analito ( 10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.



Tabla III.26.- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-4</sup> )				
C <sub>13</sub>	130	139	129	132	129
	129	131	123	129	129
	128	125	132	124	136
	136	130	125	131	133
	132	120	126	133	133
	130	136	129	129	132

En la tabla III.27 se indican los principales parámetros estadísticos del calibrado correspondiente a cada ácido graso.

**Tabla III.27-** Parámetros estadísticos del calibrado.

	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
a	-0.288	5.814	8.215	-5.946	0.905	-0.109	2.146	7.593	6.866
s <sub>a</sub>	8.891	5.512	9.390	6.633	7.367	8.711	1.213	6.303	5.726
P <sub>a</sub>	97	30	39	93	90	94	86	24	24
b	0.896	0.951	1.113	0.932	0.942	0.964	0.917	0.815	0.752
s <sub>b</sub>	0.0014	0.0009	0.0011	0.0011	0.0013	0.0014	0.0019	0.0010	0.0009
P <sub>b</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
R <sup>2</sup>	99.99	99.98	99.97	99.96	99.97	99.99	99.98	99.94	99.92
S <sub>R,C</sub>	0.028	0.017	0.029	0.021	0.023	0.028	0.038	0.020	0.018
P <sub>FA</sub>	45	59	94	45	95	63	34	71	79

En la figuras III.77 - III.85 se representa la recta de calibrado de cada ácido graso.

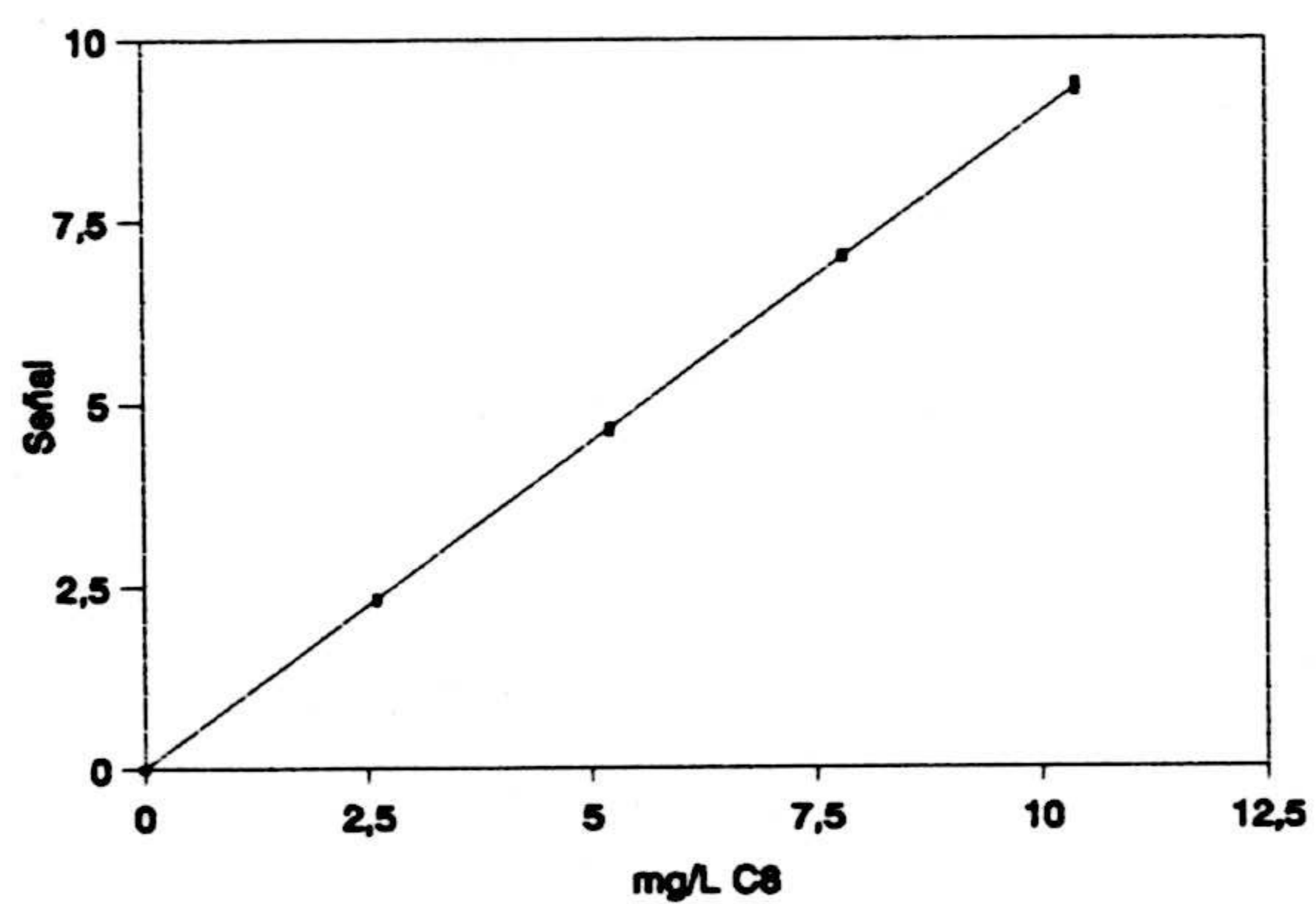


Figura III.77.- Recta de calibrado para el éster C<sub>8</sub>.

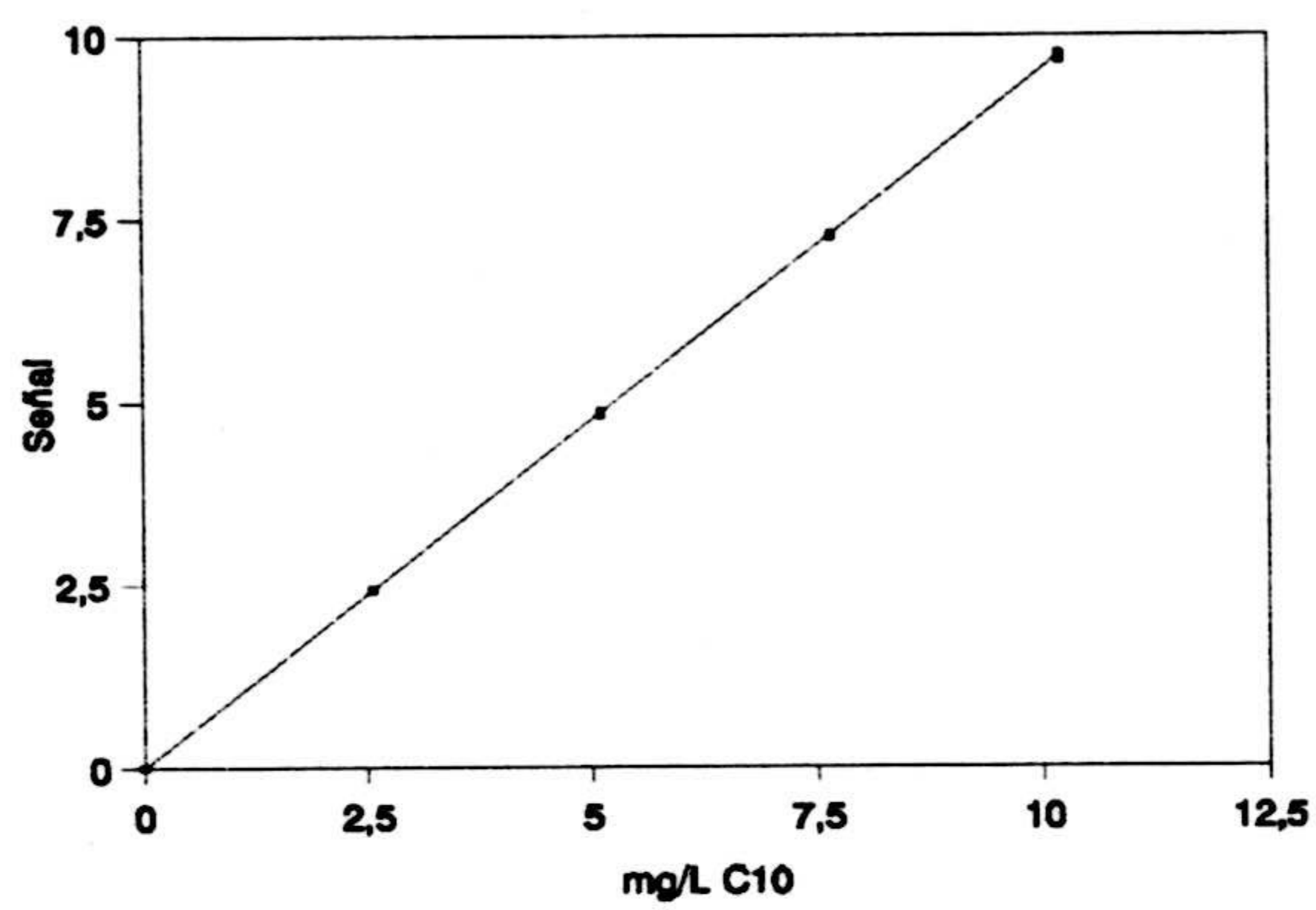


Figura III.78.- Recta de calibrado para el éster C<sub>10</sub>.

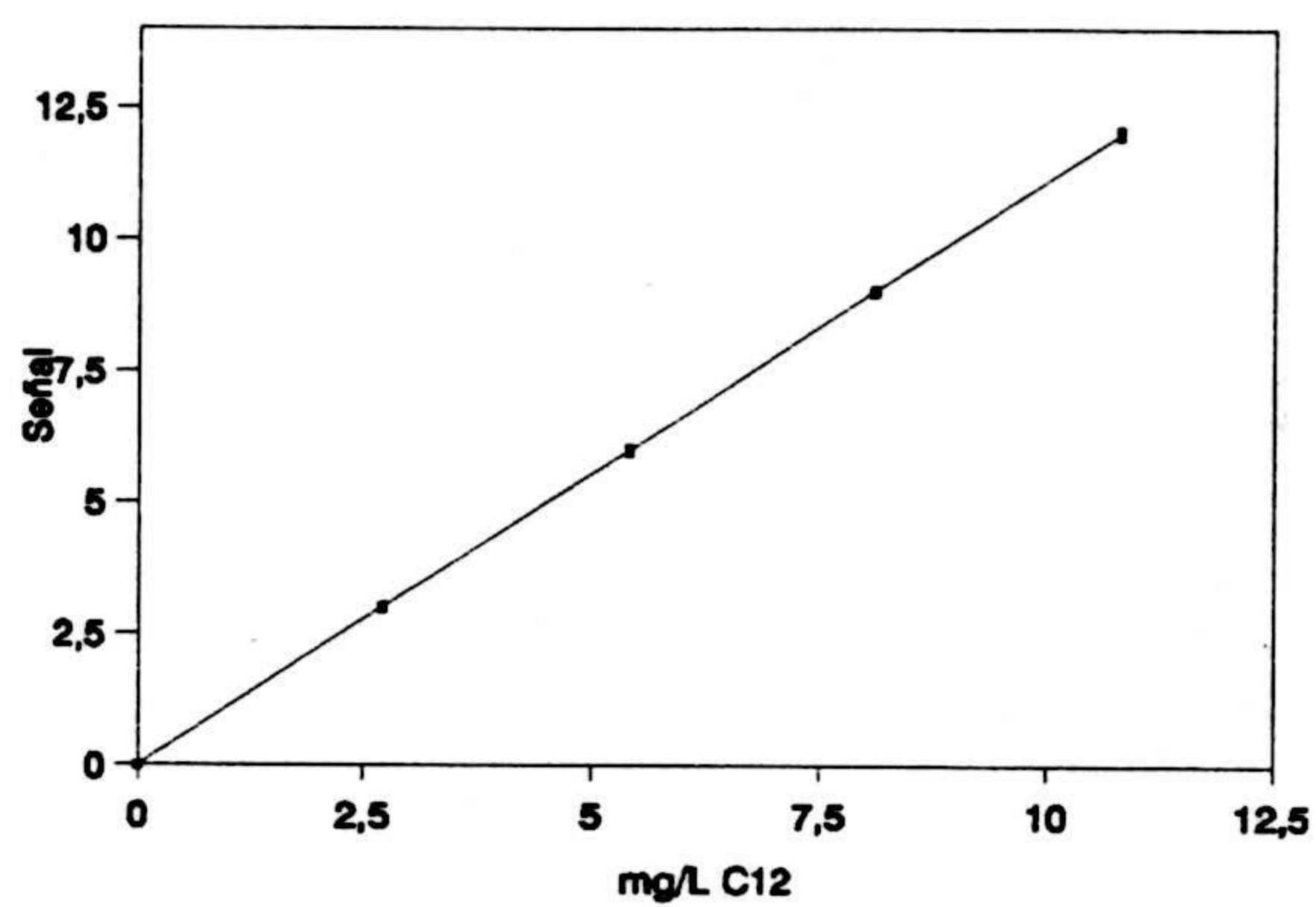


Figura III.79.- Recta de calibrado para el éster C<sub>12</sub>.

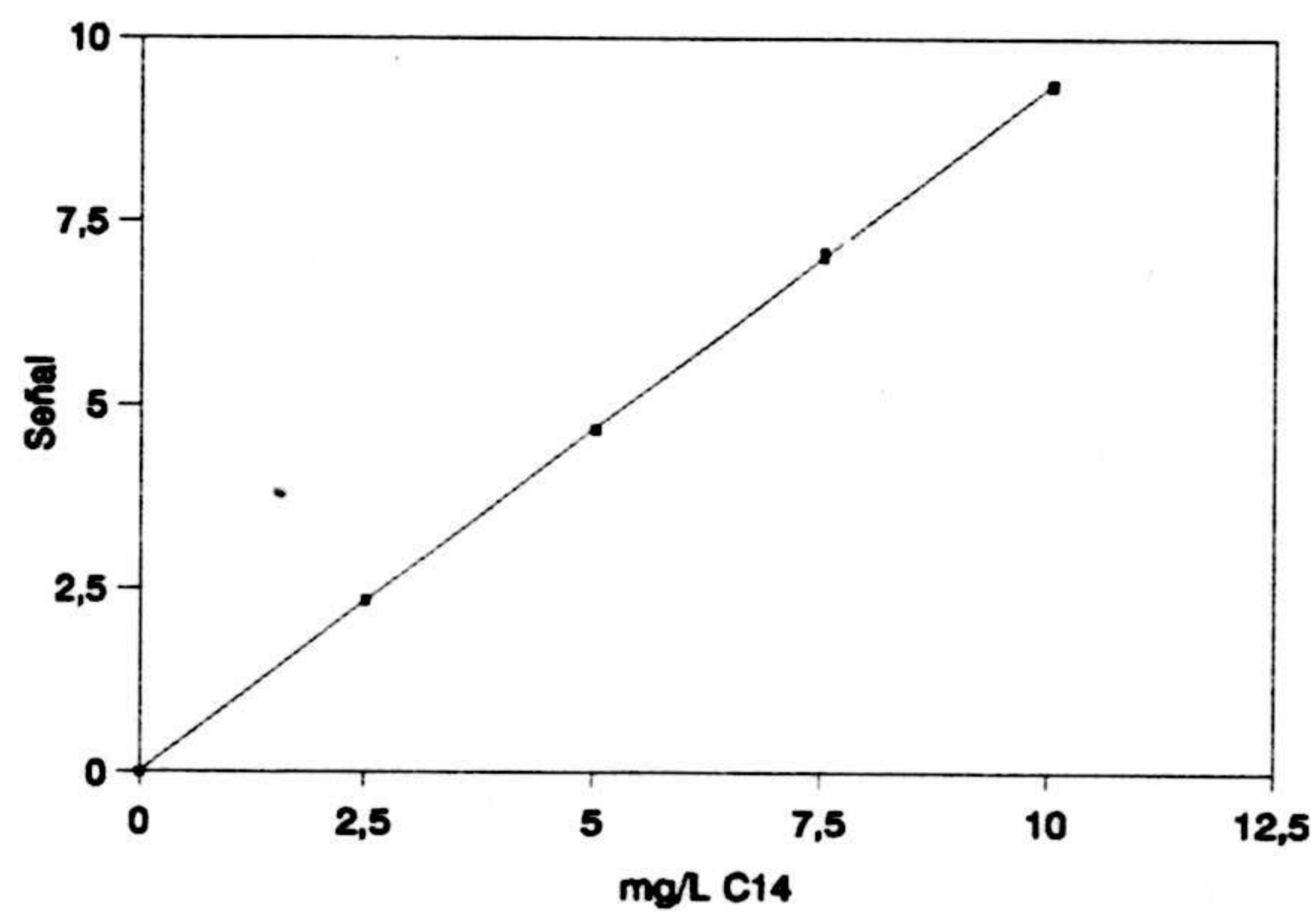


Figura III.80.- Recta de calibrado para el éster C<sub>14</sub>.

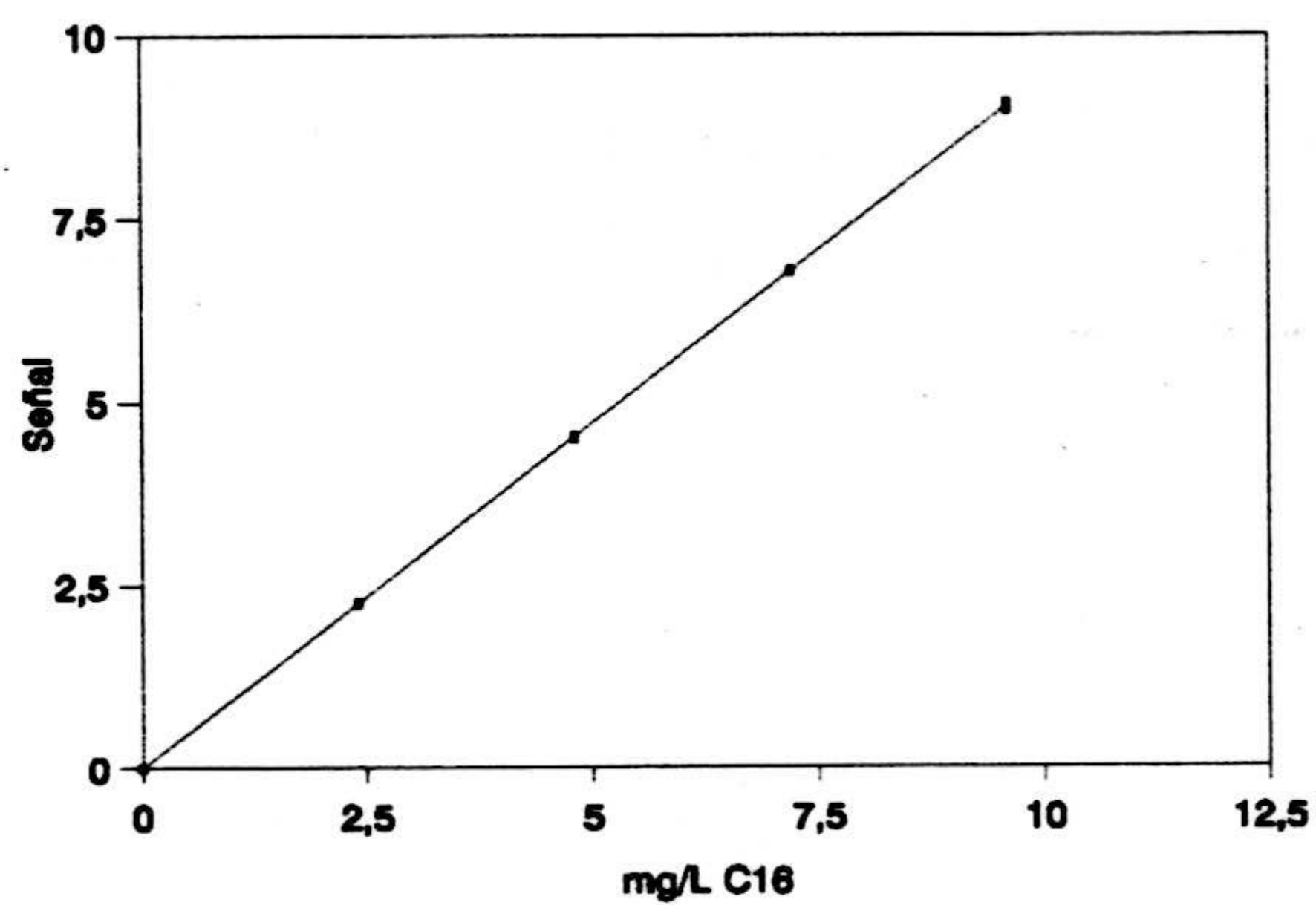


Figura III.81.- Recta de calibrado para el éster C<sub>16</sub>

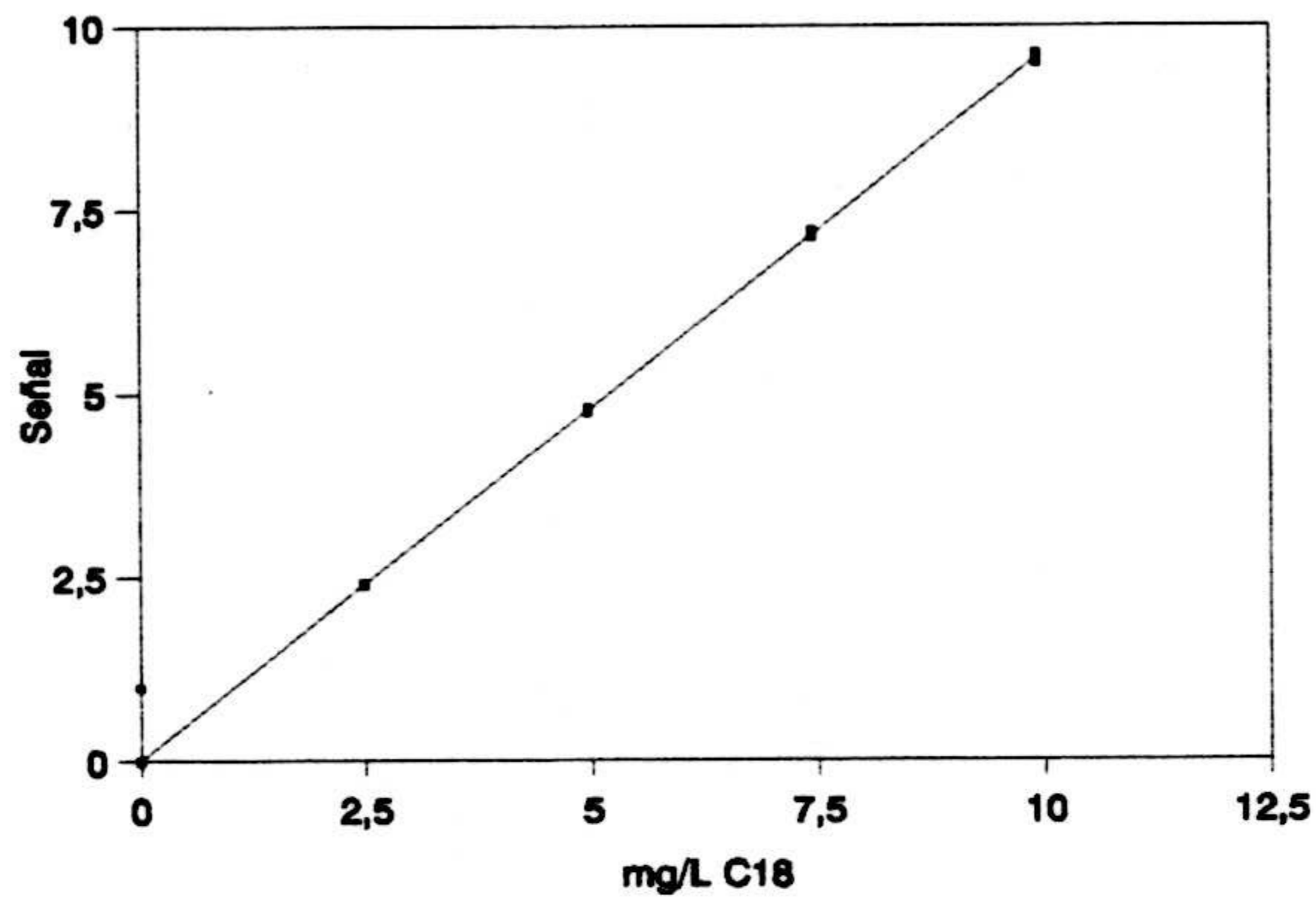


Figura III.82.- Recta de calibrado para el éster C<sub>19</sub>.

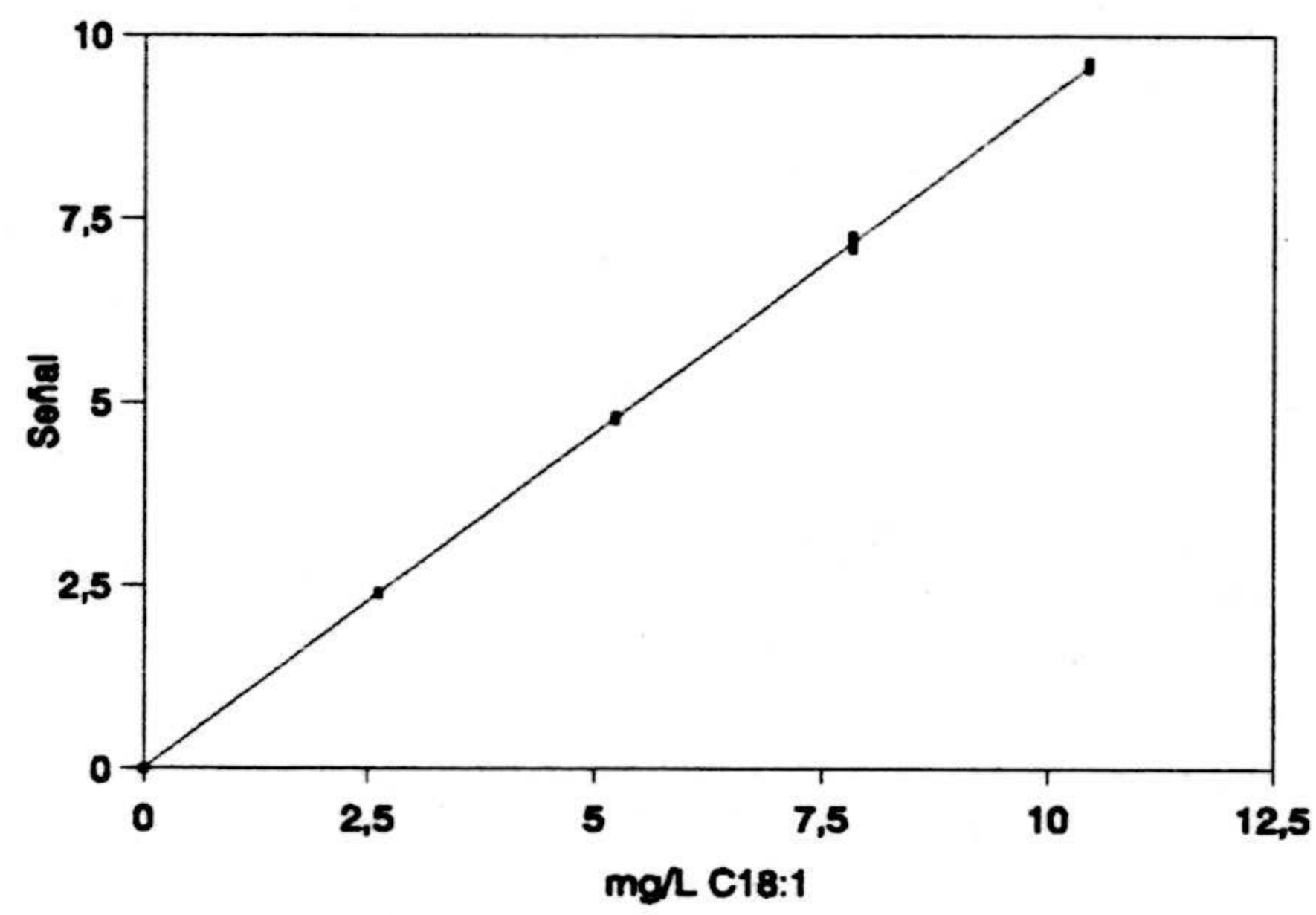


Figura III.83.- Recta de calibrado para el éster C<sub>18:1</sub>.

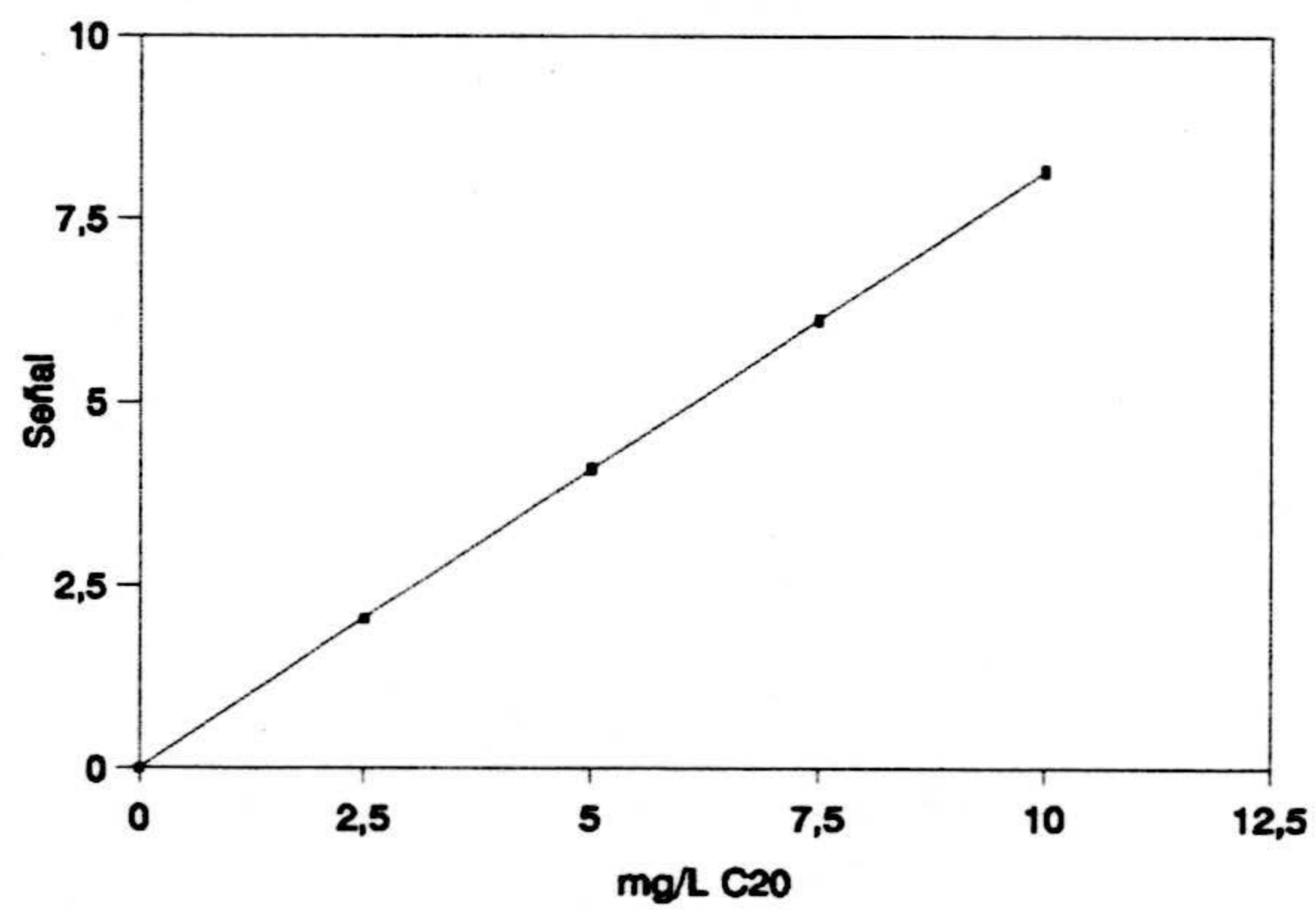


Figura III.84.- Recta de calibrado para el éster C<sub>20</sub>.

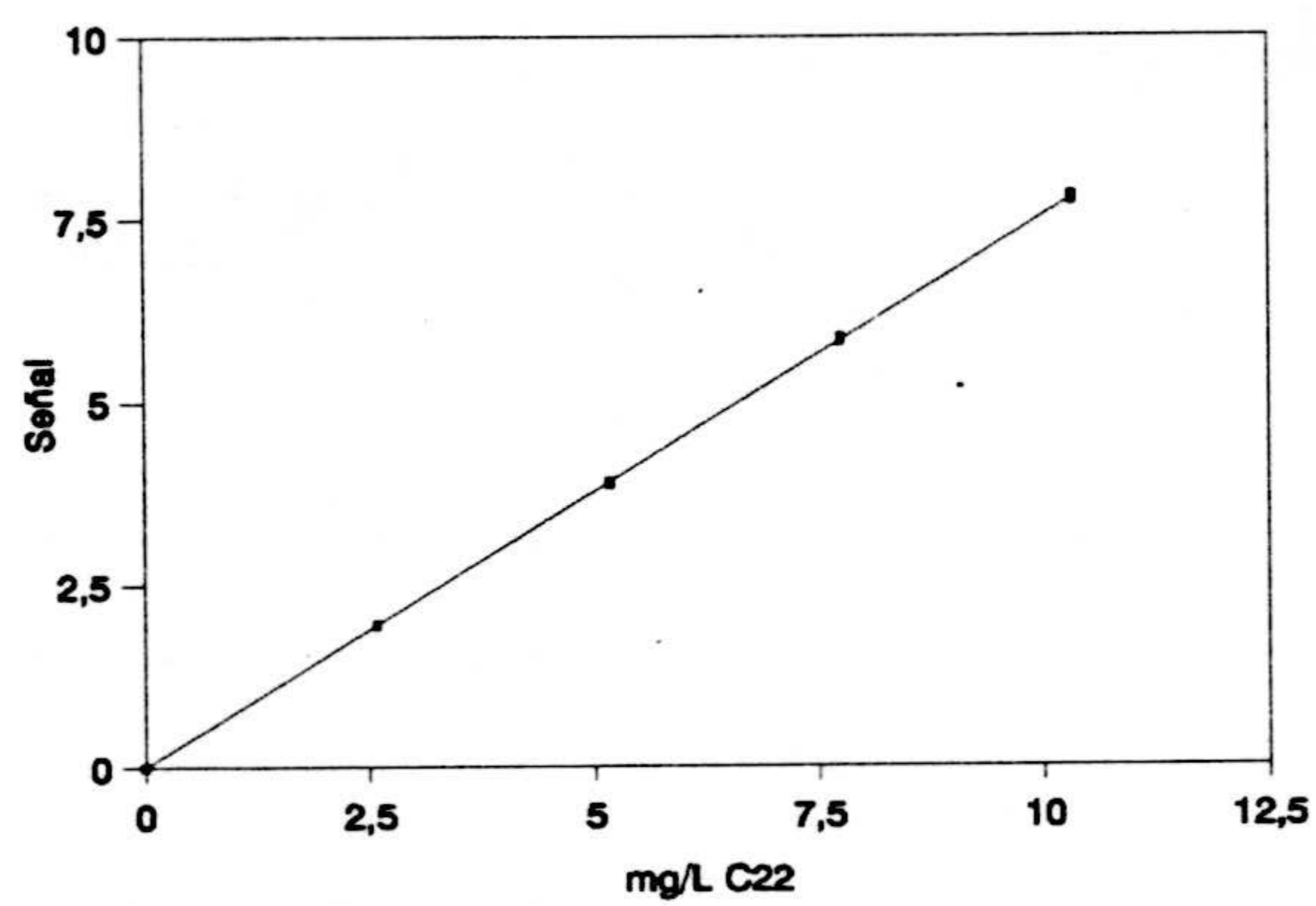


Figura III.85.- Recta de calibrado para el éster C<sub>22</sub>

### **3.2.2.- Cálculo de los parámetros de calidad del método analítico a partir de los datos del calibrado.**

De nuevo se aplicará la metodología descrita anteriormente para determinar los parámetros de calidad del método a partir de la experiencia del calibrado. Los parámetros de calidad calculados serán los siguientes: Linealidad, Sensibilidad, Precisión, Límite de detección, Límite de determinación y el Rango dinámico lineal.

En la tabla III. 28 se muestran los parámetros de calidad del método analítico para cada ácido graso.



**Tabla III.28.-** Parámetros de calidad del método analítico a partir de los datos del calibrado.

<b>ÉSTERES METÍLICOS</b>	<b>Lin. %</b>	<b>RDL mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Sensi. mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LD mgL<sup>-1</sup></b>	<b>LQ mgL<sup>-1</sup></b>
Ácido Caprílico	99.85	0.05-10.40	.031	0.048	0.159
Ácido Cáprico	99.91	0.02-10.20	0.018	0.019	0.096
Ácido Laurico	99.87	0.04-10.80	0.027	0.042	0.140
Ácido Mirístico	99.89	0.04-10.04	0.022	0.035	0.116
Ácido Palmítico	99.87	0.04-9.60	0.025	0.039	0.128
Ácido Estearico	99.85	0.05-9.92	0.029	0.045	0.152
Ácido Oléico	99.80	0.06-10.44	0.041	0.064	0.213
Ácido Aráquico	99.87	0.04-10.00	0.025	0.039	0.130
Ácido Behénico	99.88	0.03-10.32	0.025	0.025	0.128

En la figuras III.86 - III.94 se representa la variación de la precisión del método en función de la concentración de cada éster metílico.

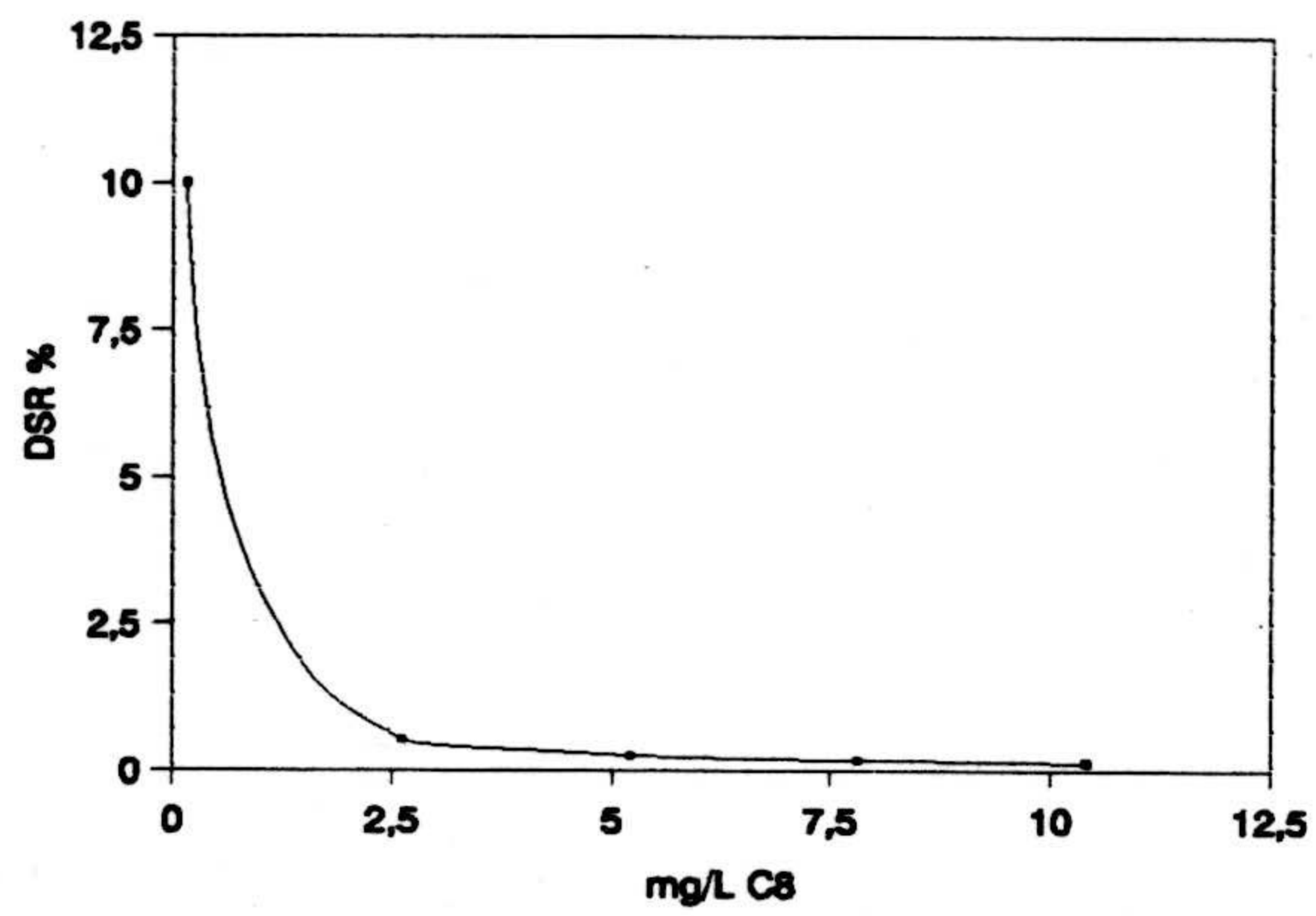


Figura III.86.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>8</sub>.

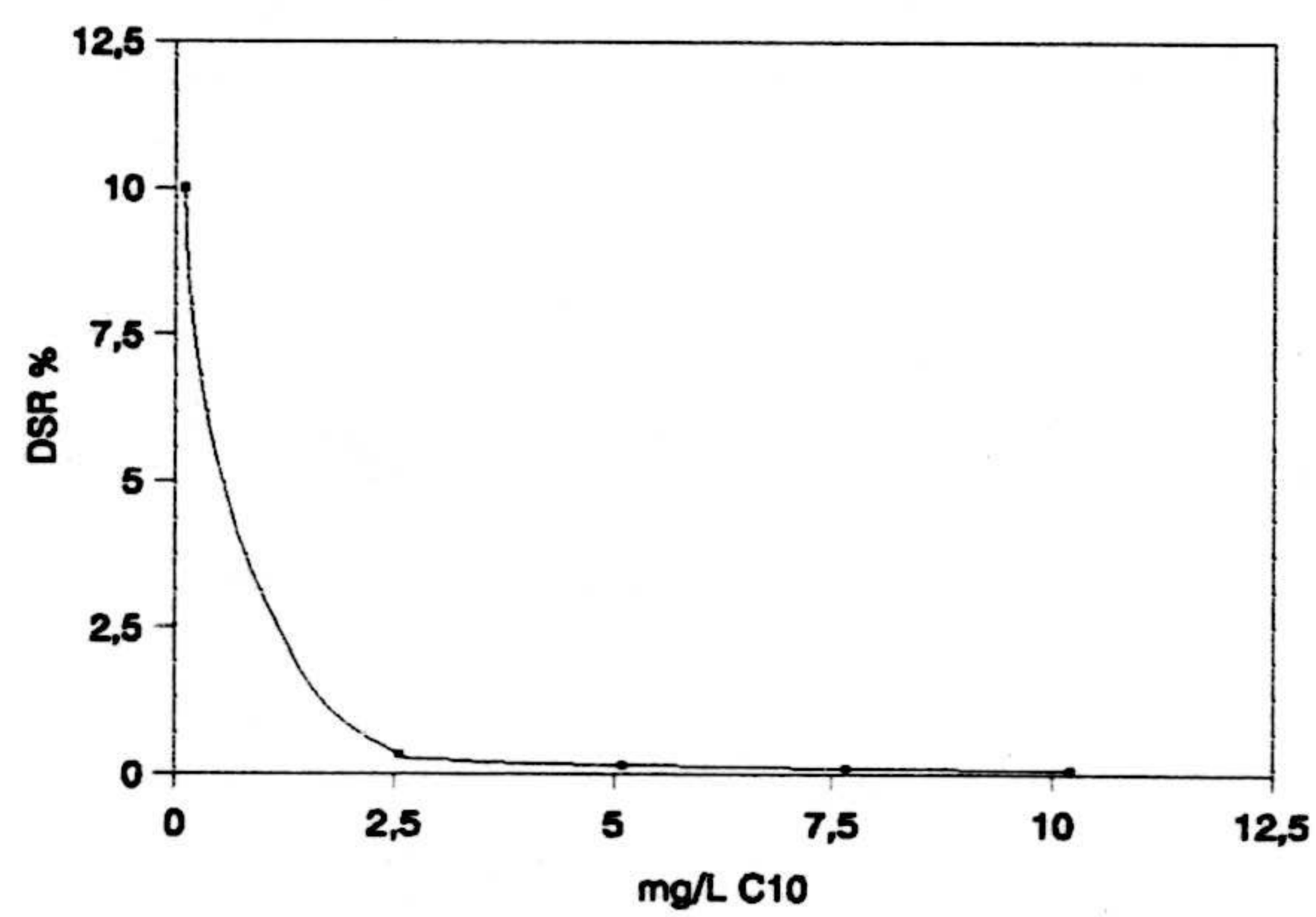


Figura III.87.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>10</sub>.

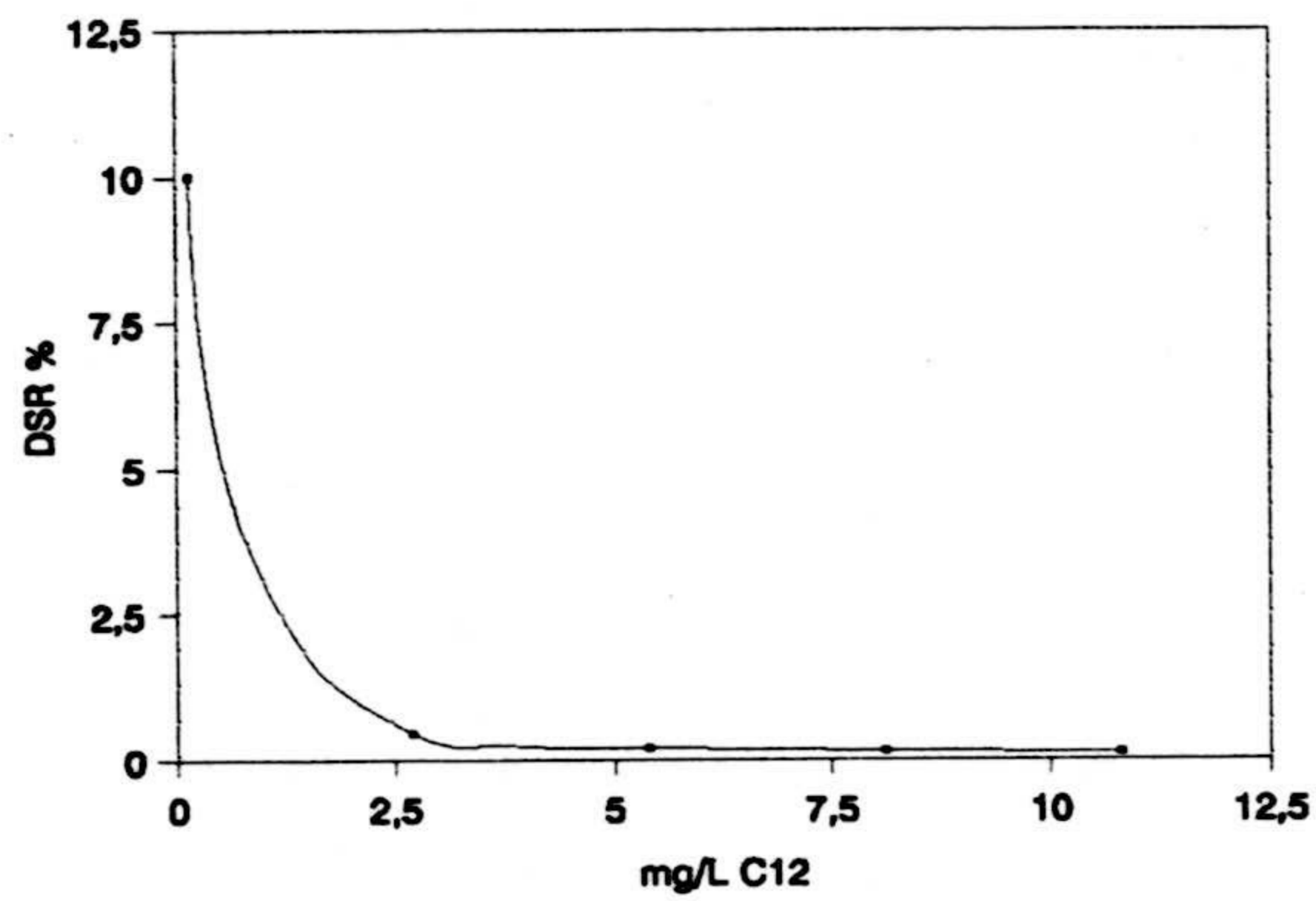


Figura III.88.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>12</sub>.

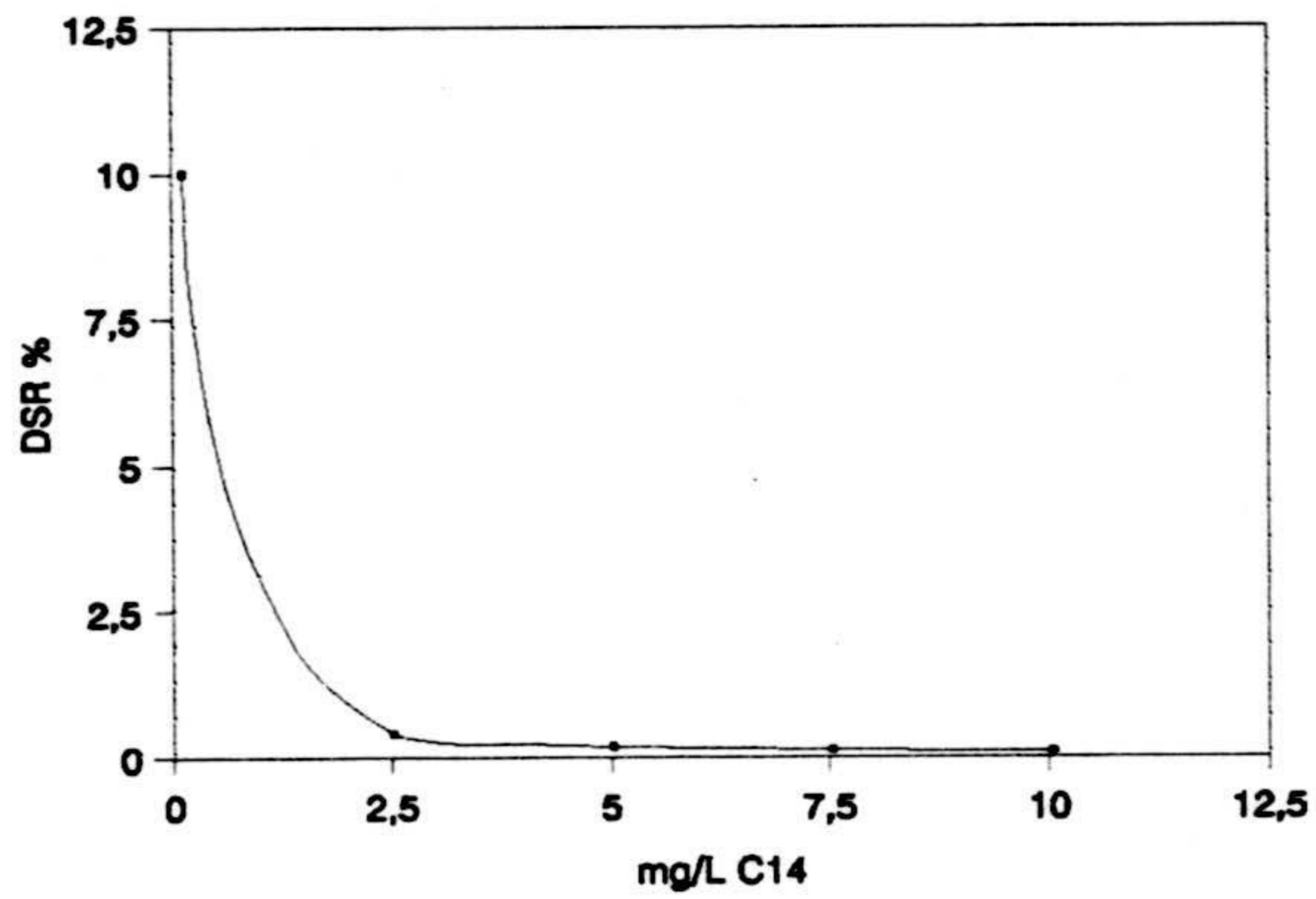


Figura III.89.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>14</sub>.

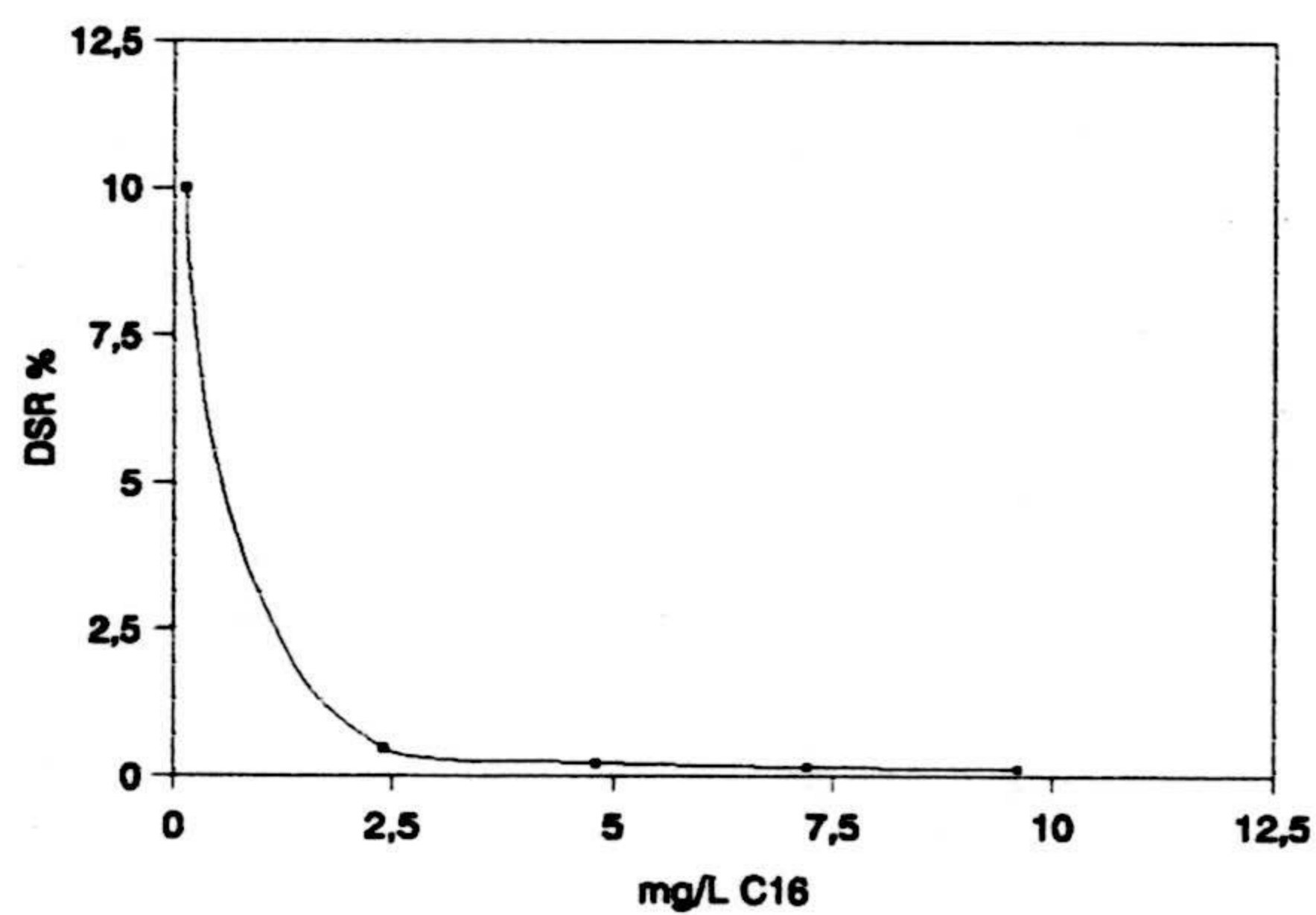


Figura III.90.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>16</sub>.

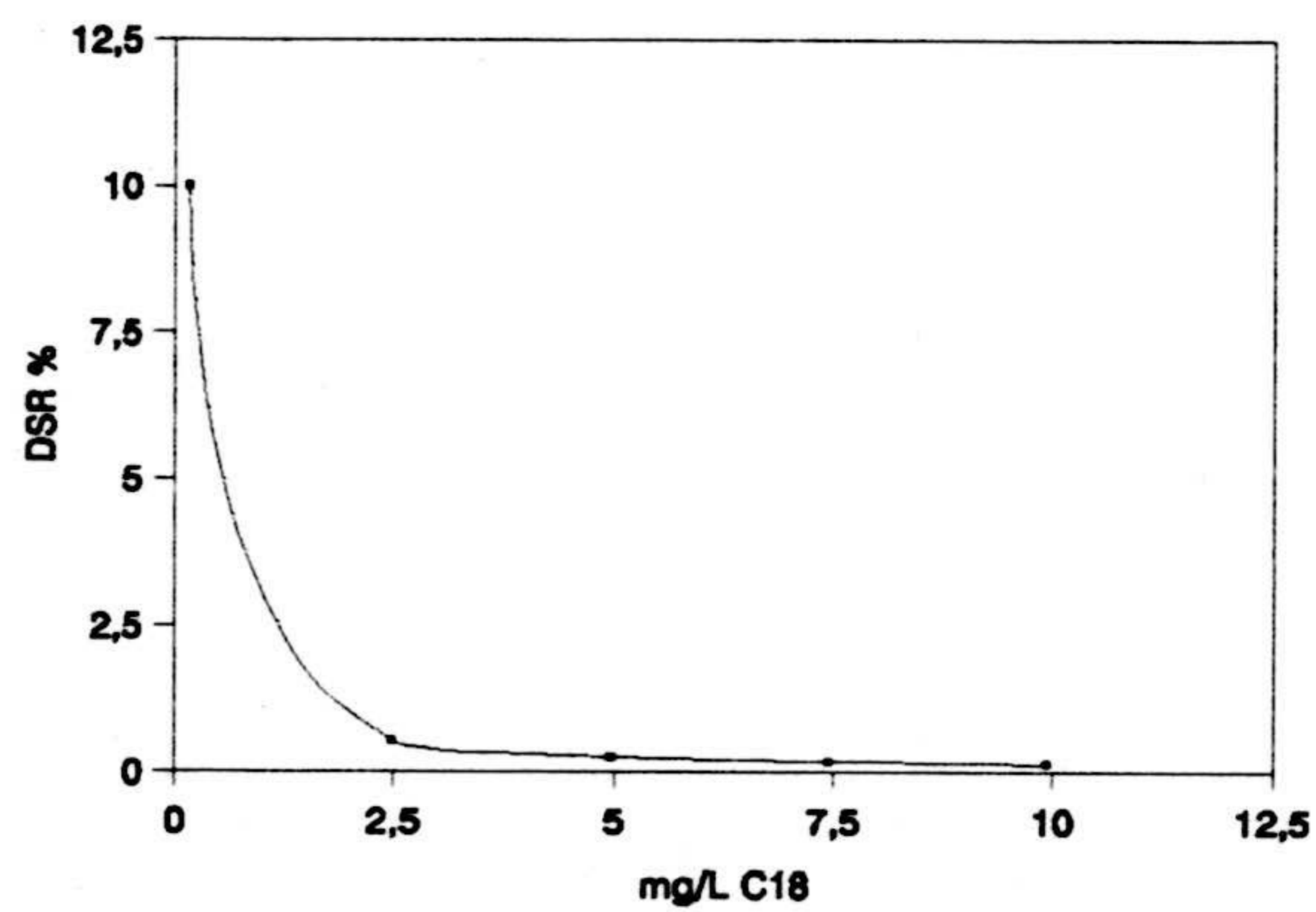


Figura III.91.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>18</sub>.

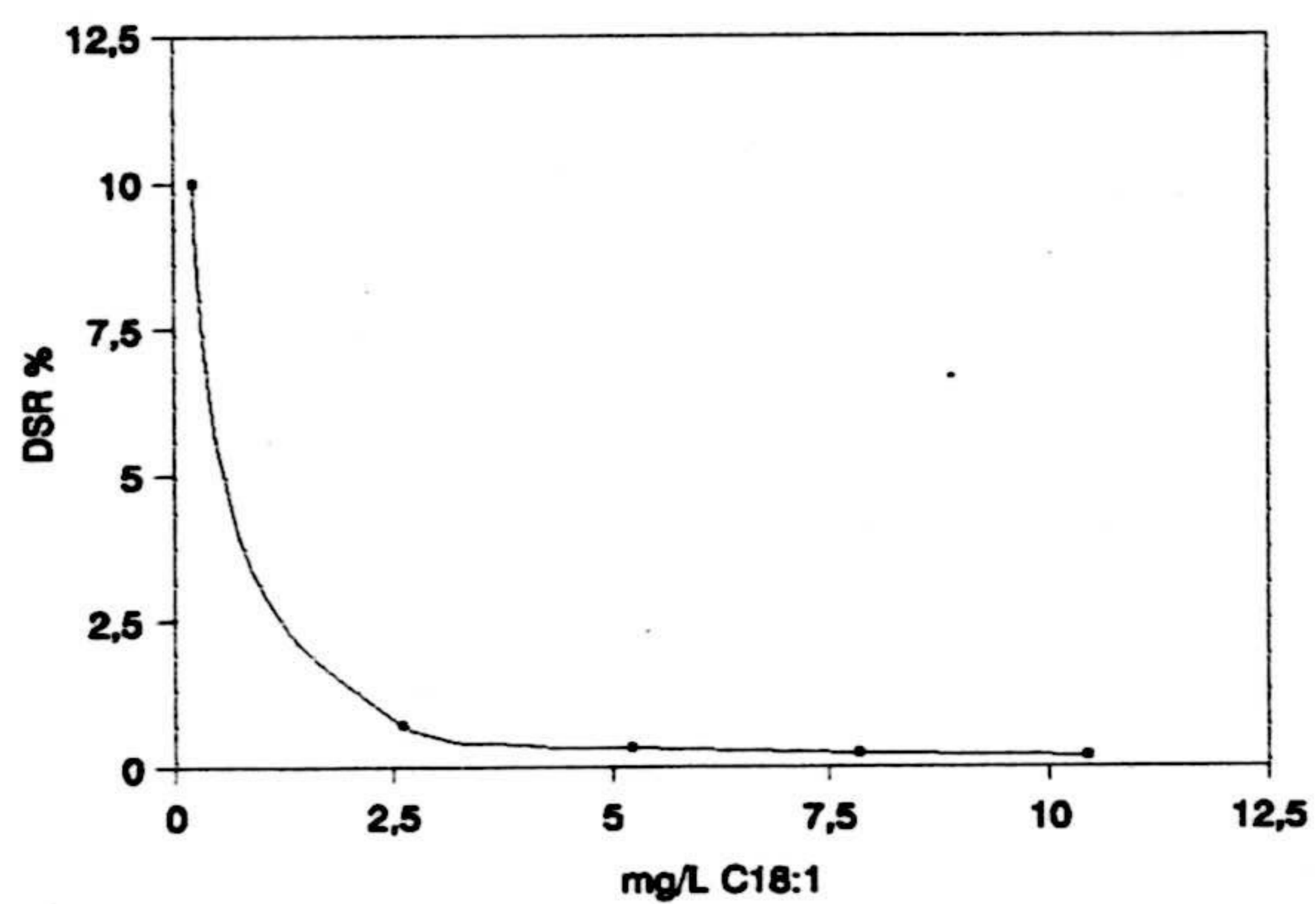


Figura III.92.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>18:1</sub>.

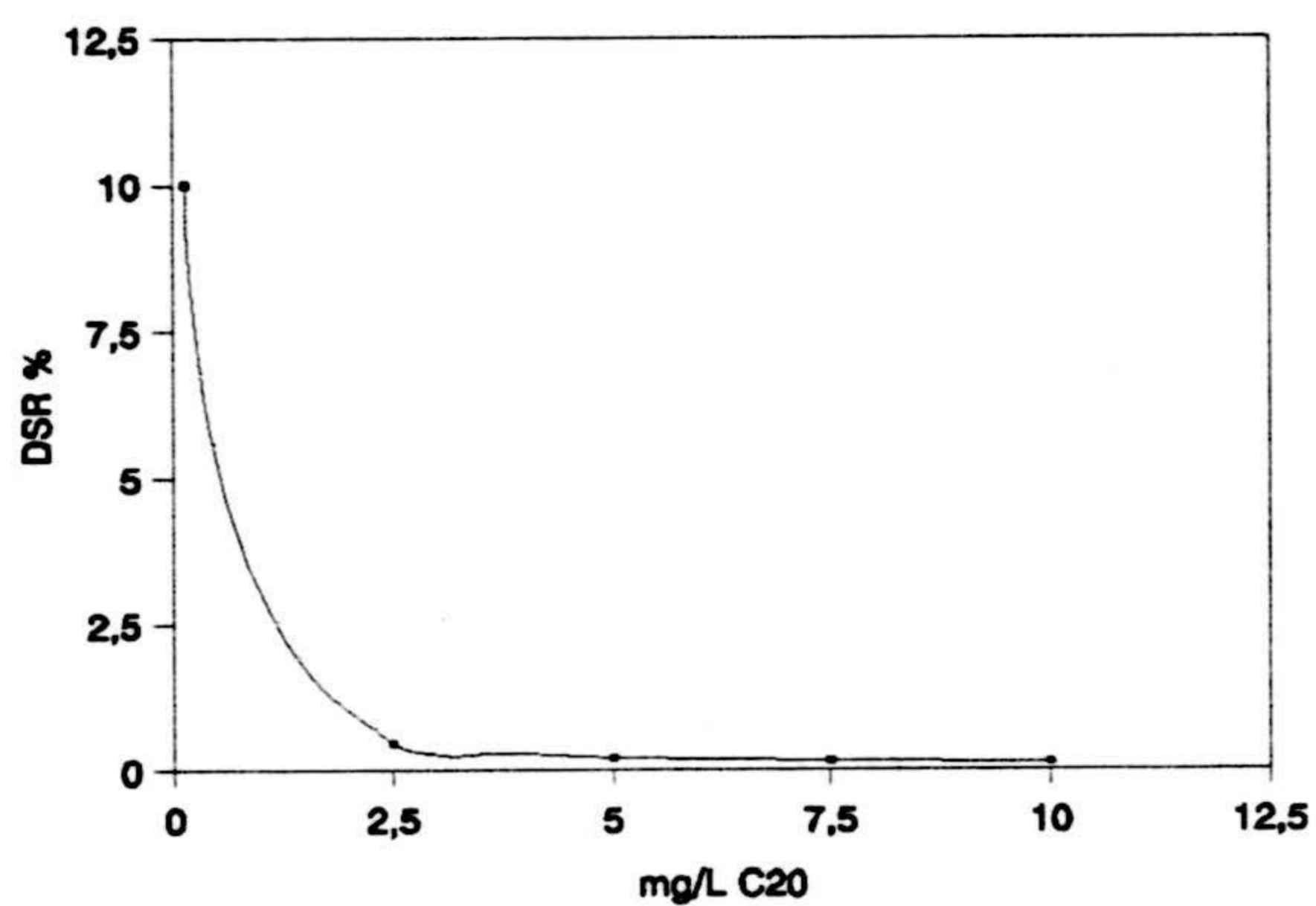
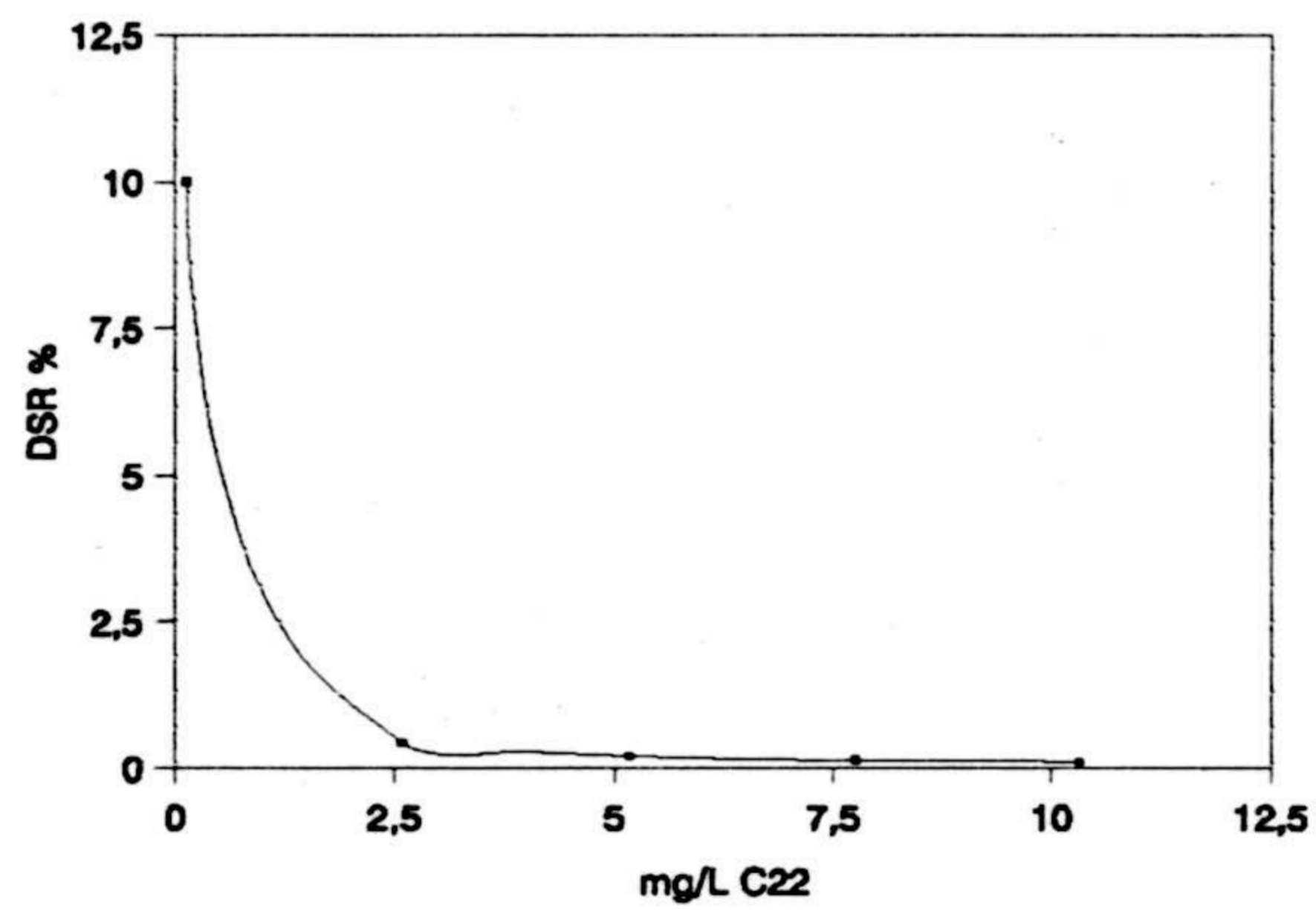


Figura III.93.- DSR % en función de la concentración del éster C<sub>20</sub>.



**Figura III.94.-** DSR % en función de la concentración del éster C<sub>22</sub>.

## **CAPÍTULO IV**

### **DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN DIVERSAS**

### **MATRICES**





El método propuesto para el análisis de ácidos grasos ha sido aplicado a su determinación en las siguientes matrices:

- Agua potable.
- Formulaciones comerciales.
- Aguas residuales.
- Fangos procedentes de una estación depuradora de aguas residuales.



## **1.- APLICACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS A AGUA POTABLE.**

### **1.1.- Introducción.**

El vehículo que utilizan los jabones para su introducción en el medio ambiente es normalmente el agua y en nuestro caso el agua de abastecimiento a la ciudad de Granada. Es por ello que como primera aplicación hemos elegido esta matriz para poner a punto el método de extracción. Al mismo tiempo se realizó un estudio de validación del mismo mediante adición de patrón. En la tabla IV.1 se muestra la composición del agua potable de Granada, determinada previamente por nosotros.

**Tabla IV.1.-** Composición agua potable de la ciudad de Granada.

<b>Ión</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>Técnica aplicada</b>
Na <sup>+</sup>	2.60	Emisión Atómica <sup>1</sup>
Cu <sup>2+</sup>	0.02	Absorsión Atómica <sup>2</sup>
Al <sup>3+</sup>	0.56	Absorsión Atómica <sup>2</sup>
Fe <sup>3+</sup>	0.02	Absorsión Atómica <sup>2</sup>
K <sup>+</sup>	1.70	Emisión Atómica <sup>1</sup>
Zn <sup>2+</sup>	0.07	Absorsión Atómica <sup>2</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	29.70	Turbidimetría <sup>1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.40	Polarografía <sup>3</sup>
Sílice	4.60	Espectrofotometría <sup>1</sup>
Cl <sub>2</sub>	0.60	Valoración <sup>1</sup>
Ca <sup>2+</sup>	25.60	Absorsión Atómica <sup>2</sup>
Mg <sup>2+</sup>	6.0	Absorsión Atómica <sup>2</sup>

A continuación se resumen los resultados obtenidos en el estudio de optimización de las distintas variables.

<sup>1</sup> RODIER, J. *Análisis de aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar*, Ed. Omega, 1981.

<sup>2</sup> *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 15th Edition, APHA-AWWA-WPCF, 1980.

<sup>3</sup> VILCHEZ QUERO, J. L., *Comunicación personal*.

**1.2.- Estudio del proceso de extracción.**

1.2.1.- Disolvente orgánico.

1.2.2.- Razón de fases.

1.2.3.- Efecto salino.

1.2.4.- Tiempo de agitación.

1.2.5.- Estudio del pH.

**1.3.- Validación del método.**

1.3.1.- Calibrado con patrones.

1.3.2.- Calibrado con adición de patrón.

1.3.3.- Calibrado de Youden.

1.3.4.- Comprobación de la exactitud del método.

1.3.5.- Análisis de una muestra.

## 1.2.- Estudio de las variables que afectan al procedimiento de extracción líquido-líquido.

### 1.2.1.- *Disolvente orgánico.*

Los ácidos grasos son poco solubles en agua (ref). La elección de un disolvente orgánico apropiado para su extracción vendrá determinada por el valor de la constante de distribución. Por otra parte hemos de tener la precaución de que el disolvente orgánico utilizado no forme emulsiones con la fase acuosa.

Para relizar esta experiencia se han ensayado los siguientes disolventes n-hexano, iso-octano, eter etílico, eter de petróleo, cloruro de metileno, triclorometano, tetracloruro de carbono y 1,1,2-triclorotrifluoroetano siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

Se toman 100 mL de fase acuosa que contenía  $250 \mu\text{gL}^{-1}$  de cada ácido graso, se fija el pH en un valor de 2, agregándole a continuación 25 mL de agente extractante. La mezcla se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro. A

continuación se esterifica el extracto según el procedimiento descrito en la página 126, y lo inyectamos en el cromatógrafo de gases. A la misma fase acuosa se le repite la operación con el objeto de comprobar la cuantitividad de la extracción.

En la tabla IV.2 se muestran los porcentajes de extracción para cada disolvente ensayado:

**Tabla IV.2-** Estudio del poder extractante de los diferentes disolventes orgánicos.

Disolvente orgánico	Poder extractante %								
	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
n-Hexano	0	0	0	0	0	0	0	0	0
iso-Octano	90	85	91	87	92	90	88	89	83
Eter etílico	98	97	99	98	96	99	95	97	98
Eter de petróleo	96	94	93	94	95	92	93	95	97
Cl <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	95	96	94	98	93	90	95	97	94
Cl <sub>3</sub> CH	90	85	87	84	88	89	91	85	91
Cl <sub>4</sub> C	75	80	82	76	75	79	80	79	75
Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

De los resultados expresados en la tabla se pueden obtener las siguientes conclusiones.

- 1.- El n-Hexano y el 1,1,2-Triclorotrifluoroetano no extraen nada.

2.- El resto de los disolventes presentan una extracción superior al 70%.

3.- El que da mejores resultados es el eter etílico, pero no lo vamos a emplear por ser el más volátil pudiendo dar problemas al intentar cuantificar, ya que sería difícil tomar volúmenes reproducibles.

4.- El eter de petróleo da buenos resultados pero ha sido descartado por no ser un compuesto puro, ya que se trata de una mezcla de compuestos con puntos de ebullición comprendidos entre 40 y 60°C.

5.- El diclorometano es el que se ha elegido, por sus propiedades y buenos resultados obtenidos.

### *1.2.2.- Razón de fases.*

El límite de determinación de un método analítico precedido de una etapa de extracción, es tanto menor cuanto mayor sea la razón de fases "r" ( $V_a/V_o$ ), por esta razón interesa que la relación de fases sea lo más elevada posible. Hemos de tener en cuenta que la eficacia de la extracción "E" (tanto por uno de compuesto extraído), decrece al aumentar la razón de fases lo que limita el valor máximo de "r" que puede ser utilizado.



En efecto, la eficacia de la extracción de un compuesto "A" viene dada por la expresión:

$$E = \frac{q_{A(o)}}{q_{A(a)} + q_{A(o)}} = \frac{V_o [A]_o}{V_a [A]_a + V_o [A]_o} = \frac{D_A}{r + D_A}$$

en donde,

$q_{A(o)}$  = cantidad de A en fase orgánica.

$q_{A(a)}$  = cantidad de A en fase acuosa.

$[A]_o$  y  $[A]_a$  = concentraciones de A en fase orgánica y fase acuosa, respectivamente.

$D_A$  = razón de distribución de A entre las dos fases.

Se observa que E decrece al aumentar r pero si  $D_A$  tiene un valor elevado ( $\geq 1000$ ) entonces E será prácticamente la unidad aunque r varíe entre los límites 1:1 y 50:1. De no ser así, se produciría una disminución ostensible del grado de extracción y por tanto en la cuantitividad del proceso.

Para comprobar el efecto de la relación de fases en nuestro caso concreto hemos operado de la siguiente forma. Se toman 100 mL de fase acuosa que contenía  $250 \mu\text{gL}^{-1}$  de cada ácido graso, se fija el pH a un valor de 2, agregándole a continuación 10 mL de diclorometano. La mezcla se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un

minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro y se esterifica, procediendo posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. A continuación se repite el proceso pero en esta ocasión añadimos 20 mL de diclorometano.

En la tabla IV.3 se muestran los resultados obtenidos en ambas relaciones de fases.

**Tabla IV.3.-** Eficacia de la extracción en función de la relación de fases.

ÉSTERES METÍLICOS	r = 10		r = 5	
	A x 10 <sup>-3</sup>	E (%)	A x 10 <sup>-3</sup>	E (%)
Ácido Caprílico	2750	95	2721	94
Ácido Cáprico	3150	97	3053	94
Ácido Laurico	3251	94	3286	95
Ácido Mirístico	2893	96	2803	93
Ácido Palmítico	2732	94	2760	95
Ácido Estearico	2639	97	2612	96
Ácido Oleico	2953	94	2890	92
Ácido Aráquico	2453	96	2479	97
Ácido Behénico	2338	95	2313	94

Se observa que la extracción se puede considerar cuantitativa en las relaciones de fases ensayadas, por lo que fijamos una relación de fases  $r = 10$  para experiencias posteriores.

### *1.2.3.- Efecto salino.*

En ocasiones un contenido en sales elevado en la fase acuosa aumenta la insolubilidad de los compuestos orgánicos disueltos y por tanto su extractabilidad.

Este hecho se debe a que las sales disminuyen la actividad del agua con respecto a los compuestos orgánicos, favoreciendo de manera indirecta la capacidad de solvatación con el disolvente orgánico <sup>4</sup>.

Para comprobar el efecto de la fuerza iónica del medio se ha operado de la siguiente forma. Se toman 100 mL de fase acuosa que contenía  $250 \mu\text{gL}^{-1}$  de cada ácido graso, se le agregan 5 mL de disolución saturada de NaCl. A continuación se fija el pH a un valor de 2 y se le agregan 10 mL de diclorometano. La mezcla se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se

---

<sup>4</sup> VALCÁRCEL CASES M. y GÓMEZ HENS A., *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial Reverté 1988.

toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro y se esterifica, procediendo posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. Los resultados se muestran en la tabla IV.4.

**Tabla IV.4.-** Influencia del efecto salino.

ÁCIDOS GRASOS	A x 10 <sup>-3</sup>	E (%)
Ácido Caprílico	2807	97
Ácido Cáprico	3085	95
Ácido Laurico	3216	93
Ácido Mirístico	2863	95
Ácido Palmítico	2790	96
Ácido Esteárico	2530	93
Ácido Oleico	3079	98
Ácido Aráquico	2402	94
Ácido Behénico	2387	97

Se observa que a la E (%) de nuestros analitos no le afecta el hecho de aumentar el contenido en sales de la fase acuosa. Por tanto en las condiciones operatorias empleadas la fuerza iónica no influye en la eficacia de la extracción.

#### *1.2.4.- Tiempo de agitación.*

Para la optimización del tiempo de agitación de la mezcla se operará de la siguiente manera. Se toman 100 mL de fase acuosa que contenía 250  $\mu\text{gL}^{-1}$  de cada ácido graso, se fija el pH a un valor de 2, agregándole a continuación 10 mL de diclorometano. La mezcla se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro y se esterifica, procediendo posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. Repetimos el proceso completo dos veces más, variando únicamente el tiempo de agitación que será de dos y tres minutos respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.5.

**Tabla IV.5.-** Estudio de la eficacia de la extracción en función del tiempo de agitación.-

ÁCIDOS GRASOS	Tiempo de agitación (min)		
	1	2	3
Ácido Caprílico	96	93	92
Ácido Cáprico	92	94	93
Ácido Laurico	97	96	95
Ácido Mirístico	93	94	93
Ácido Palmítico	95	97	95
Ácido Esteárico	92	92	92
Ácido Oleico	94	93	94
Ácido Aráquico	93	95	92
Ácido Behénico	96	92	93

Al analizar la E(%) de la extracción a diferentes tiempos, observamos que para los tiempos de agitación estudiados es la misma y además cuantitativa. Con objeto de no prolongar el tiempo de análisis, seleccionamos un tiempo de agitación de un minuto.

#### ***1.2.5.- Estudio del pH.***

Debido a su carácter ácido débil ( $pK_a \approx 5$ ) los ácidos grasos presentan una solubilidad moderada dependiendo del pH del medio, así el ácido dodecanóico a pH ácido presenta una solubilidad de  $0.055 \text{ g.L}^{-1}$

---

mientras que a pH básico ésta alcanza un valor de  $12 \text{ g.L}^{-1}$ . Por esta razón la optimización de esta variable es esencial en el proceso de extracción.

Para establecer la influencia de esta variable se operó de la siguiente manera. Se preparan una serie de cuatro vasos de precipitado de 250 mL. Se introducen 100 mL de disolución de ácidos grasos que contenía  $250 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cada ácido. Tras fijar el pH a los valores de 1-4, se transfieren a los correspondientes embudos de decantación de 250 mL, agregándole a continuación 10 mL de diclorometano a cada una. Las mezclas se agitaron durante un minuto. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico anhidro y se sometió al procedimiento de esterificación descrito en la página 126, procediéndose posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. Los resultados se muestran en la tabla IV.6.

**Tabla IV.6.-** Estudio de la influencia del pH sobre la eficacia de la extracción.

ÉSTERES METÍLICOS	pH			
	1	2	3	4
Ácido Caprílico	96	93	87	85
Ácido Cáprico	92	90	88	83
Ácido Laurico	97	91	85	84
Ácido Mirístico	93	89	87	86
Ácido Palmítico	95	87	86	83
Ácido Estearico	92	92	88	84
Ácido Oléico	94	91	89	85
Ácido Aráquico	93	89	85	83
Ácido Behénico	96	90	82	80

De la observación de la tabla IV.6 , puede concluirse al disminuir el pH aumenta la eficacia E (%) de la extracción. A pH superior a 4 la formación de espumas en la etapa de agitación imposibilita una buena separación de ambas fases por lo que no podían ser separadas.

Para posteriores experiencias fue seleccionado el valor de pH = 1.



### 1.3.- Validación del método de extracción. Aplicación al agua potable de la ciudad de Granada.

Para la validación de la extracción de ácidos grasos en agua potable de la ciudad de Granada se aplicó el protocolo estadístico basado en la metodología del método de adición de patrón<sup>5</sup>. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, una adición de patrón y otra con porciones crecientes de muestra.

La metodología de adición de patron se puede aplicar para resolver diferentes problemas:

1.- Determinación de analitos en muestras en las que las interacciones analito-matriz conducen a resultados inexactos al emplear la calibración con patrones.

2.- Determinación de analitos, cuyo contenido en muestra es inferior al límite de cuantificación del método, pero superior a su sensibilidad analítica.

3.- Comprobación de la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia.

---

<sup>5</sup> CUADROS RODRÍGUEZ L., GARCÍA CAMPAÑA A., ALÉS BARRERO F., JIMÉNEZ LINARES C. Y ROMÁN CEBA M., *Journal of AOAC*, 78 (1995).

En nuestro caso utilizaremos la metodología de adición de patrón por la tercera razón descrita anteriormente, ya que no disponemos de ningún material de referencia adecuado.

Para desarrollar esta metodología se relizaron las experiencias que se describen a continuación:

### ***1.3.1.- Calibrado con patrones.***

En el anterior capítulo se desarrolló este calibrado para todos los ácidos grasos, obteniéndose sus correspondientes parámetros estadísticos, así como sus parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón se empleó la ordenada en el origen (**a**), la pendiente (**b**) y la desviación estandar de la regresión ( $S_{R,C}$ ), del calibrado en modo SIM realizado en el capítulo III. Estos valores quedan indicados en la tabla IV.6.

### ***1.3.2.- Calibrado con adición de patrón.***

Para establecer este calibrado se realizó la siguiente experiencia. Se tomaron cinco alícuotas de 100 mL de agua potable de la ciudad de Granada dopada (  $25 \mu\text{gL}^{-1}$  de cada ácido graso), a las cuales se les añadieron volúmenes crecientes de disolución patrón de los ácidos grasos, para obtener unas concentraciones finales de 25, 35, 45, 55 y  $65 \mu\text{gL}^{-1}$  de ácidos grasos individuales en la muestra. A todas se les fijó el pH a un valor de 1 , se les

agregaron 10 mL de diclorometano y se introdujeron en un embudo de decantación de 250 mL. Las mezclas se agitaron durante un minuto. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico anhidro y se sometió al procedimiento de esterificación descrito en la página 126, procediéndose posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. No son necesarias las réplicas del método, pero se realizaron tres inyecciones para cada punto ensayado. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.7.

### *1.3.3.- Calibrado de Youden.*

Se tomaron volúmenes crecientes de agua potable de la ciudad de Granada dopada 25, 50, 75 y 100mL, y se llevaron a un volumen final de 100mL con agua desionizada. Para la realización de este calibrado no se incluyó el volumen cero de muestra y además tampoco se hicieron réplicas experimentales, pero si se realizaron tres inyecciones de cada punto experimental ensayado. A todas se les fijó el pH a un valor de 1 , se les agregaron 10 mL de diclorometano y se introdujeron en un embudo de decantación de 250 mL. Las mezclas se agitaron durante un minuto. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico anhidro y se sometió al procedimiento de esterificación descrito en la página 126, procediéndose posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.8.

### *1.3.4.- Comprobación de la exactitud del método.*

Para verificar la exactitud del método hay que desarrollar el cálculo estadístico propuesto por CUADROS y col., (REF). Éste se esquematiza a continuación:

*1.3.4.1.-* Se realizó un ajuste por mínimos cuadrados de los tres calibrados (CP, CA, CY). De todos los parámetros estadísticos derivados de este ajuste seleccionamos  $n$  (número de parejas de datos),  $a$  (ordenada en el origen),  $b$  (pendiente) y  $s_{R,c}$  (desviación estándar del calibrado).

*1.3.4.2.-* Se calculó la desviación estándar ponderada de regresión ( $s_p$ ) a partir de las correspondientes  $s_{R,C}$  del calibrado con patrones y del calibrado con adición de patrón. Este cálculo es necesario para realizar el test de comparación de pendientes.

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_S - 2) s_S^2 + (n_A - 2) s_A^2}{n_S + n_A - 4}}$$

*1.3.4.3.-* Se realizó el test de comparación de pendientes para comprobar que la adición de patrón provoca un error sistemático constante, o sea que la recta de adición de patrón está desplazada paralelamente respecto a la recta de patrones. Para comprobar si existe o no error sistemático

constante se realiza un test de la *t* de Student. Se calcula  $t_{\text{cal}}$  con  $(n_S+n_A-4)$  grados de libertad. Aceptaremos la hipótesis nula para un nivel de significación mayor del 10%.

$$t(b) = \frac{|b_S - b_A|}{s_P \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}}$$

**1.3.4.4.-** Una vez se comprobó que la pendiente del calibrado con patrones es igual a la pendiente del calibrado con adición de patrón, se calculó la pendiente promedio de ambas.

$$b_P = \frac{\sum (c_i - \bar{c})_S (R_i - \bar{R})_S + \sum (c_i - \bar{c})_A (R_i - \bar{R})_A}{\sum (c_i - \bar{c})_S^2 + \sum (c_i - \bar{c})_A^2}$$

**1.3.4.5.-** Se calcularon las nuevas alturas en el origen ( $a'$ ) a partir del valor de pendiente promedio. Se calcularon para el calibrado con patrones ( $a_S$ ) y para el calibrado con adición de patrón ( $a_A$ ). A continuación se comparó la nueva altura en el origen del calibrado con patrones con la altura en el origen del calibrado de youden ( $a_Y$ ), si hay diferencia entre ambas será debida a la existencia de error sistemático por efecto matriz de la muestra. No se puede realizar un test de comparación de  $a_S$  y  $a_Y$  porque ambas están obtenidas a partir de variables independientes distintas. Para compararlas se comprobó que  $a_Y$  estaba incluida en el intervalo de confianza

de  $a_s$ . Se utilizó una  $t$  de Student con  $(n_s - 2)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5 %. Si  $a_Y$  no está incluido en el intervalo calculado, se obtiene el verdadero blanco de la muestra, Blanco de Youden.

$$a_{A'} = R_A - b_p \bar{c}_A ; \quad a_{S'} = R_S - b_p \bar{c}_S$$

**BY** : blanco de youden.

$$BY = a_Y - a_{S'}$$

Intervalo de confianza sobre la altura,  $a_s$

$$a_Y \in a_{S'} \pm t_{\alpha} s_p \sqrt{\frac{\sum c_{i,S}^2}{n \sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2}}$$

1.3.4.6.- Finalmente se comprobó la exactitud del método analítico. Para esto se comparó el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ). Ambos valores  $c_{x,S}$  y  $c_{x,A}$  se compararon mediante un test de Student de comparación de dos medias con  $(n_S + n_A - 3)$  grados de libertad. Si concluimos por la hipótesis nula con un nivel de significación mayor del 5%, ambos resultados son iguales y por tanto el método es exacto.

$c_{x,S}$  : Concentración de analito calculada a partir del calibrado con patrones.

$$c_{x,S} = \frac{R_x - a_Y}{b_S}$$

$c_{x,A}$  : Concentración de analito calculada a partir del calibrado con adición de patrón.

$$c_{x,A} = \frac{a_A' - a_Y}{b_P}$$

$t(c)$  : Estadístico de control de las concentraciones.

$$t(c) = \frac{|c_{x,S} - c_{x,A}|}{\frac{s_P}{b_P} \sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_A} + \frac{(R_S - R_A)^2}{b_P^2 [\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2 + \sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2]}}$$

A continuación se presentan las señales obtenidas, así como los resultados tabulados obtenidos al aplicar este desarrollo a cada ácido graso.

**Tabla IV.7.-** Señales obtenidas en el calibrado por adición de patrón (CA).

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.1		0.2		0.3		0.4	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	28	0.224	41	0.315	52	0.398	66	0.488	77	0.583
	30	0.223	40	0.312	51	0.402	65	0.496	77	0.580
	27	0.222	40	0.311	54	0.402	68	0.495	76	0.581
C <sub>10</sub>	29	0.240	44	0.335	56	0.432	71	0.521	82	0.624
	33	0.239	43	0.336	55	0.430	69	0.529	84	0.629
	30	0.238	43	0.334	57	0.428	73	0.528	81	0.625
C <sub>12</sub>	29	0.237	43	0.330	56	0.430	71	0.522	81	0.612
	32	0.238	42	0.331	54	0.427	68	0.524	82	0.619
	29	0.236	43	0.332	57	0.426	72	0.525	81	0.620

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.



Tabla IV.7.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.00		0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub>	28	0.230	42	0.320	53	0.411	69	0.506	80	0.605
	31	0.230	41	0.321	52	0.415	66	0.509	79	0.592
	29	0.229	41	0.320	55	0.412	69	0.506	77	0.593
C <sub>16</sub>	29	0.238	43	0.333	55	0.428	71	0.525	80	0.607
	32	0.237	42	0.333	54	0.426	68	0.524	82	0.614
	29	0.237	43	0.332	57	0.426	72	0.523	80	0.617
C <sub>18</sub>	29	0.240	43	0.334	56	0.429	70	0.524	82	0.621
	33	0.239	43	0.335	55	0.433	69	0.523	83	0.620
	30	0.238	43	0.334	57	0.427	71	0.525	81	0.624
C <sub>18:1</sub>	29	0.226	41	0.316	52	0.404	67	0.495	77	0.584
	31	0.225	40	0.315	51	0.403	64	0.496	78	0.588
	28	0.225	40	0.314	54	0.402	68	0.498	77	0.591
C <sub>20</sub>	26	0.208	38	0.292	49	0.376	62	0.454	72	0.543
	28	0.207	38	0.293	48	0.375	59	0.456	72	0.541
	26	0.207	37	0.290	50	0.379	62	0.452	69	0.533
C <sub>22</sub>	24	0.193	35	0.271	44	0.341	57	0.419	66	0.500
	26	0.192	35	0.269	44	0.343	55	0.421	66	0.497
	24	0.192	34	0.268	46	0.344	58	0.422	65	0.499

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.7- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-4</sup> )				
C <sub>13</sub>	123	130	130	136	132
	136	129	127	130	134
	124	129	134	137	130

Tabla IV.8.- Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	8	0.059	15	0.113	24	0.180	30	0.237
	7	0.055	14	0.105	21	0.161	30	0.229
	7	0.057	15	0.116	22	0.172	27	0.217
C <sub>10</sub>	8	0.061	16	0.121	23	0.179	30	0.241
	8	0.060	16	0.122	24	0.180	31	0.242
	8	0.059	15	0.119	23	0.180	30	0.244
C <sub>12</sub>	8	0.060	15	0.119	23	0.178	30	0.237
	8	0.059	16	0.120	24	0.183	30	0.234
	8	0.060	15	0.118	23	0.178	29	0.239
C <sub>14</sub>	8	0.057	15	0.114	22	0.169	28	0.226
	8	0.058	15	0.114	22	0.171	29	0.227
	7	0.057	14	0.113	21	0.171	28	0.230
C <sub>16</sub>	8	0.060	15	0.119	23	0.180	30	0.238
	8	0.059	16	0.121	23	0.179	31	0.239
	8	0.059	15	0.119	22	0.177	29	0.237
C <sub>18</sub>	8	0.059	16	0.121	23	0.177	30	0.238
	8	0.061	16	0.119	24	0.183	30	0.239
	8	0.059	15	0.121	23	0.180	29	0.238

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

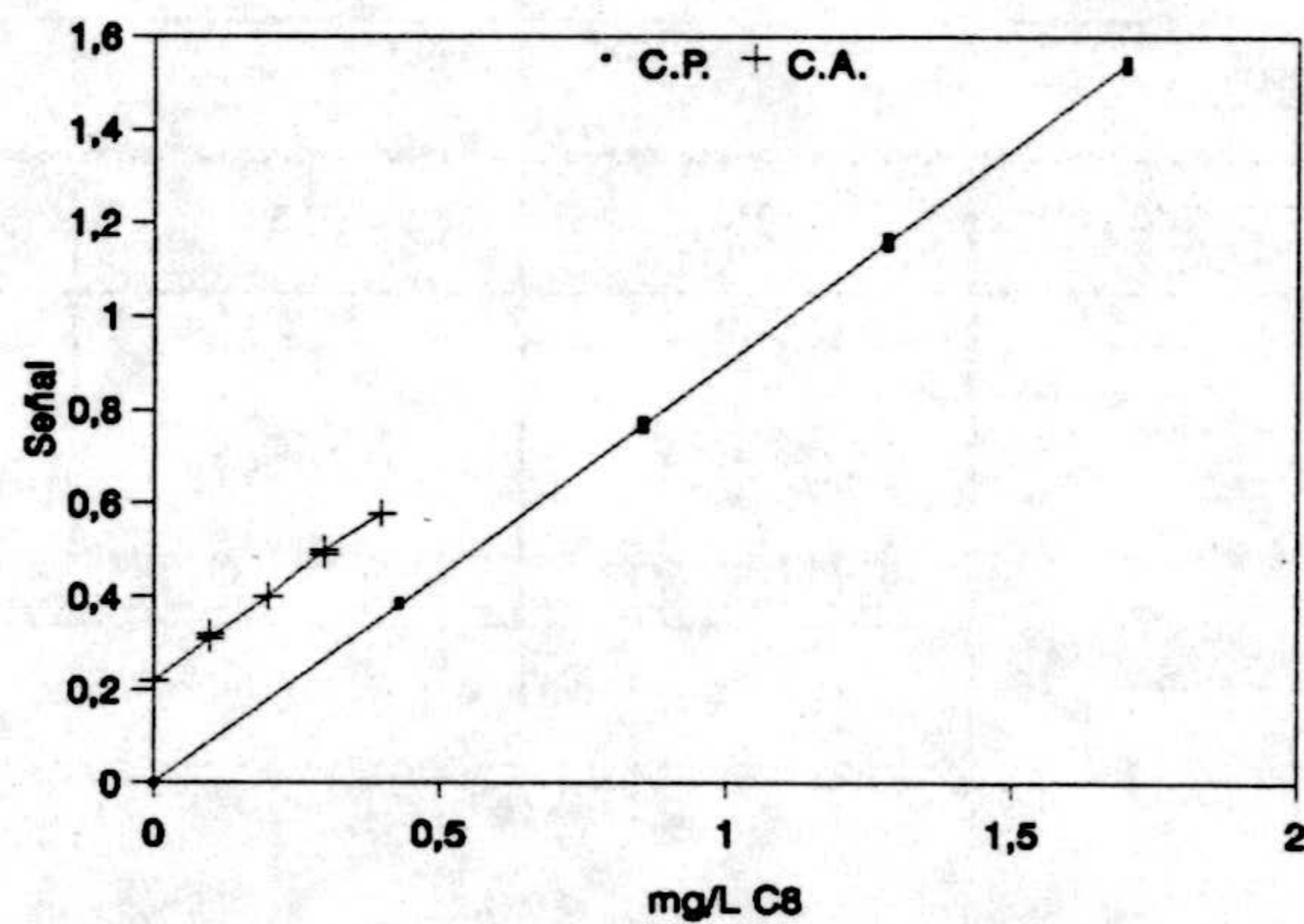
Tabla IV.8.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	7	0.056	14	0.110	22	0.167	28	0.225
	7	0.056	15	0.111	22	0.170	29	0.224
	7	0.055	14	0.113	22	0.171	27	0.220
C <sub>20</sub>	7	0.052	14	0.104	20	0.153	26	0.208
	8	0.053	13	0.101	20	0.154	26	0.206
	7	0.051	13	0.103	20	0.157	25	0.206
C <sub>22</sub>	6	0.049	12	0.096	18	0.140	24	0.195
	6	0.048	13	0.096	19	0.143	25	0.190
	6	0.048	12	0.097	18	0.143	24	0.190
C <sub>13</sub>	131		130		131		125	
	130		132		131		129	
	128		128		127		122	

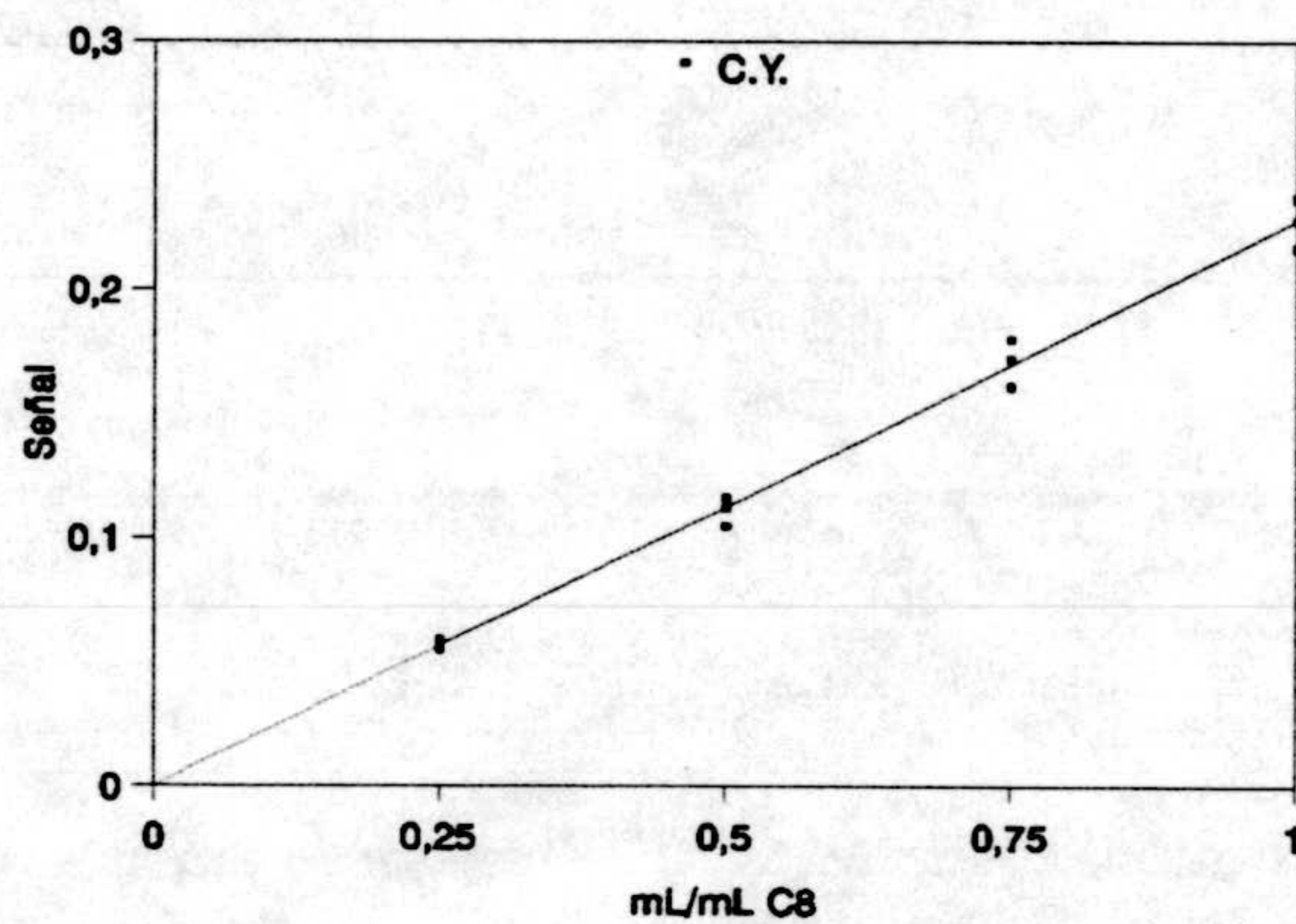
A, área analito (10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

**Tabla IV.9.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido caprílico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0004	0.2230	-0.0009
<b>b</b>	0.8991	0.8966	0.2281
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0056	0.0024	0.0068
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0054		
<b>t(b)</b>	0.3786 ( P = 70 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8996		
<b>a'</b>	0.0009	0.2221	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0026
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2464	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2487	-----
<b>t(c)</b>	1.1274 ( P = 26 %)		



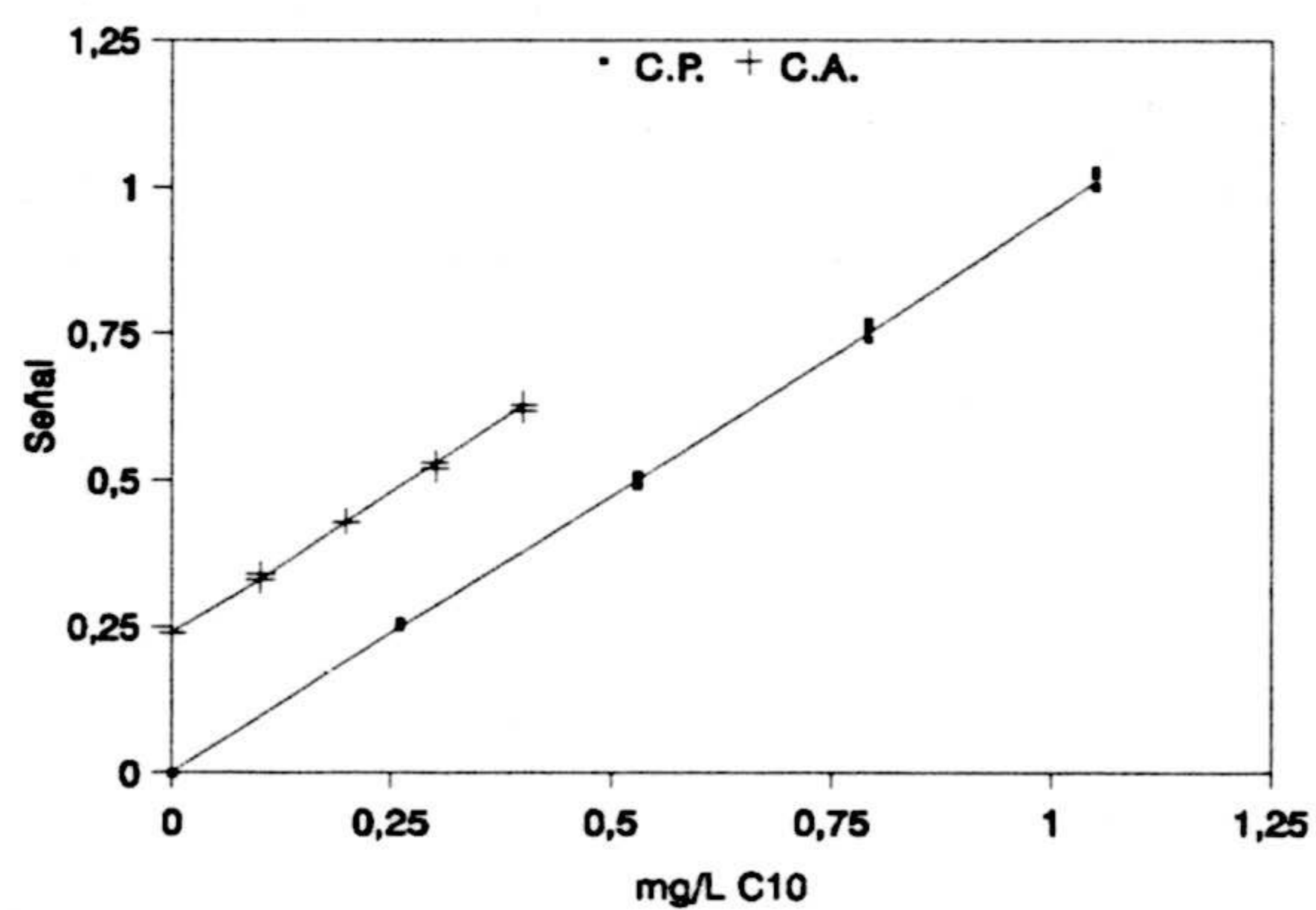
**Figura IV.1.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>8</sub>.



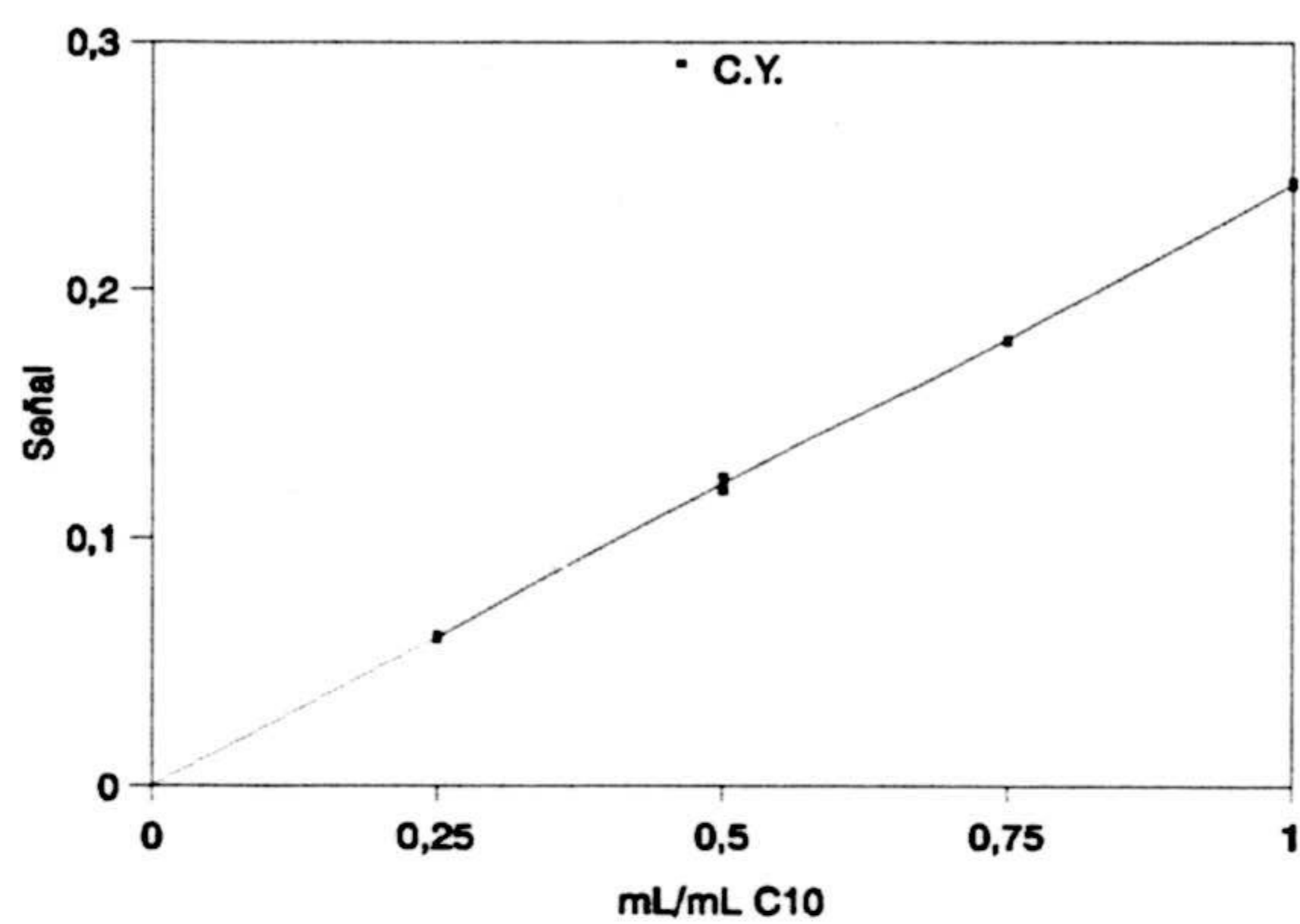
**Figura IV.2.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>8</sub>.

**Tabla IV.10.** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido cáprico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	0.2383	-0.0008
<b>b</b>	0.9646	0.9649	0.2426
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0076	0.0026	0.0012
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0065		
<b>t(b)</b>	0.0474 ( P = 95 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9644		
<b>a'</b>	-0.0020	0.2385	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0012
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2492	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2481	-----
<b>t(c)</b>	0.4962 ( P = 62 %)		



**Figura IV.3.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>10</sub>.



**Figura IV.4.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>10</sub>.



**Tabla IV.11.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido láurico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0009	0.2371	0.0011
<b>b</b>	0.9548	0.9516	0.2366
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0060	0.0022	0.0020
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0051		
<b>t(b)</b>	0.3246 ( P = 73 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9545		
<b>a'</b>	-0.0007	0.2365	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0018
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2477	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2467	-----
<b>t(c)</b>	0.6070 ( P = 54 %)		

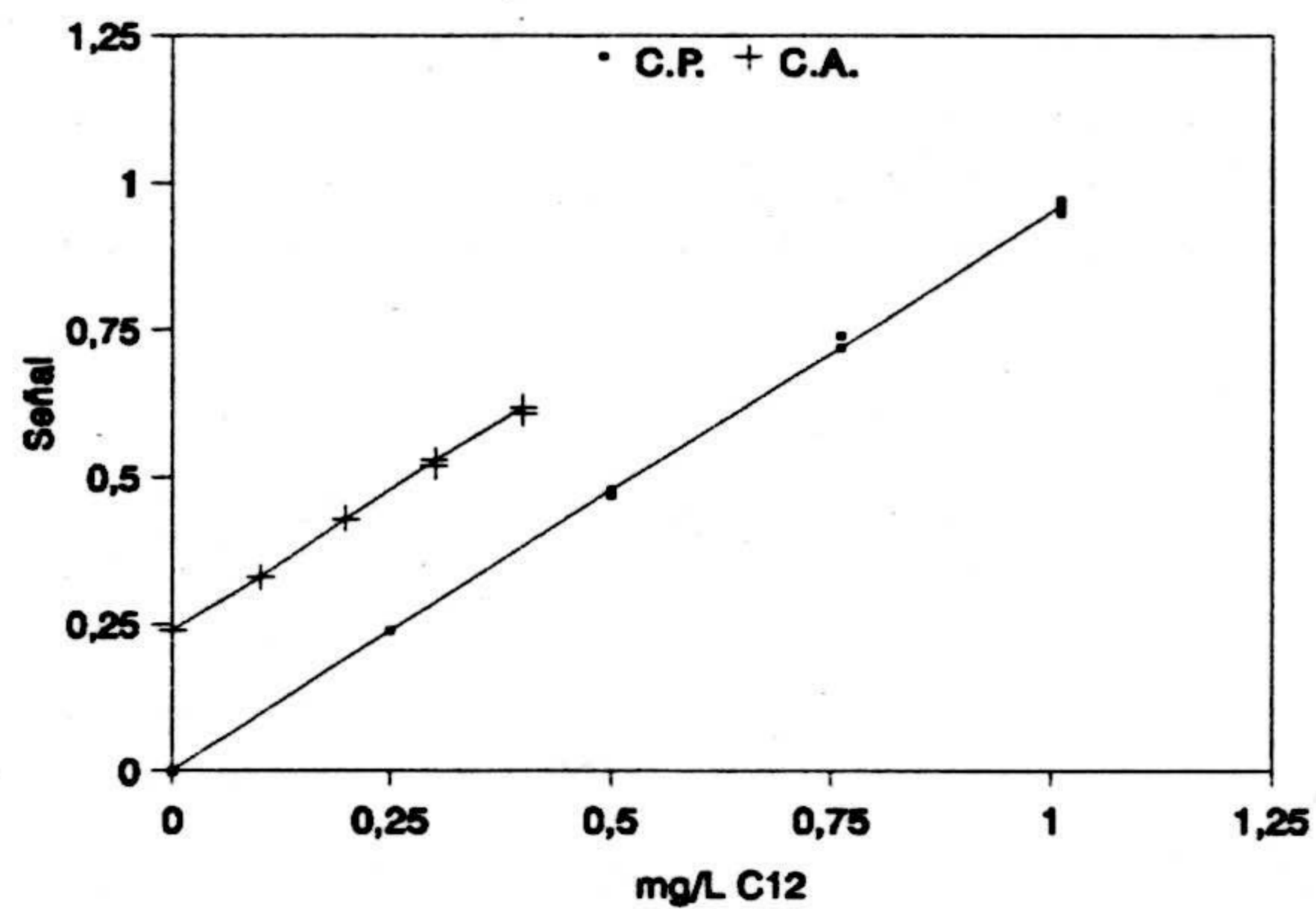


Figura IV.5.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>12</sub>.

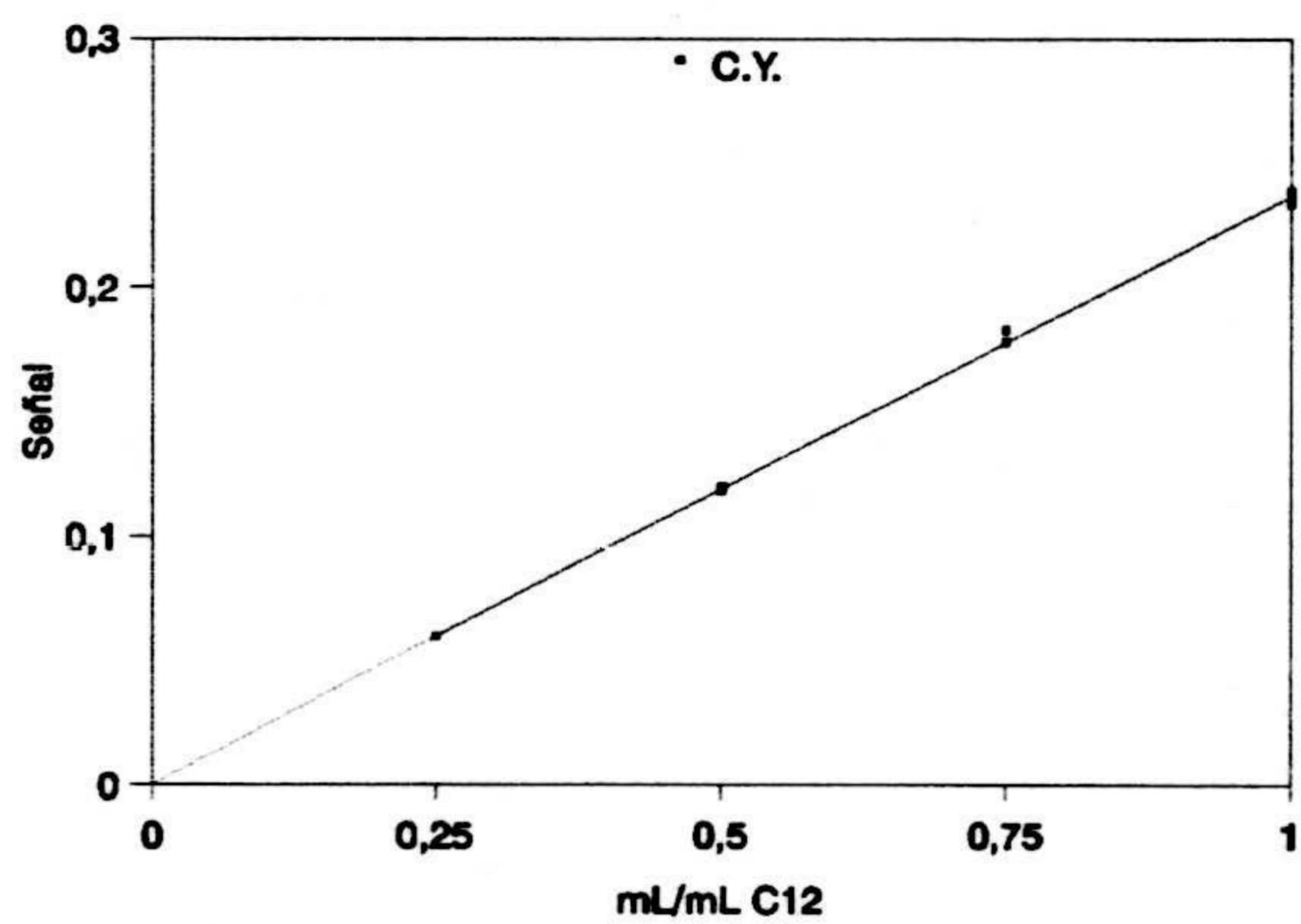
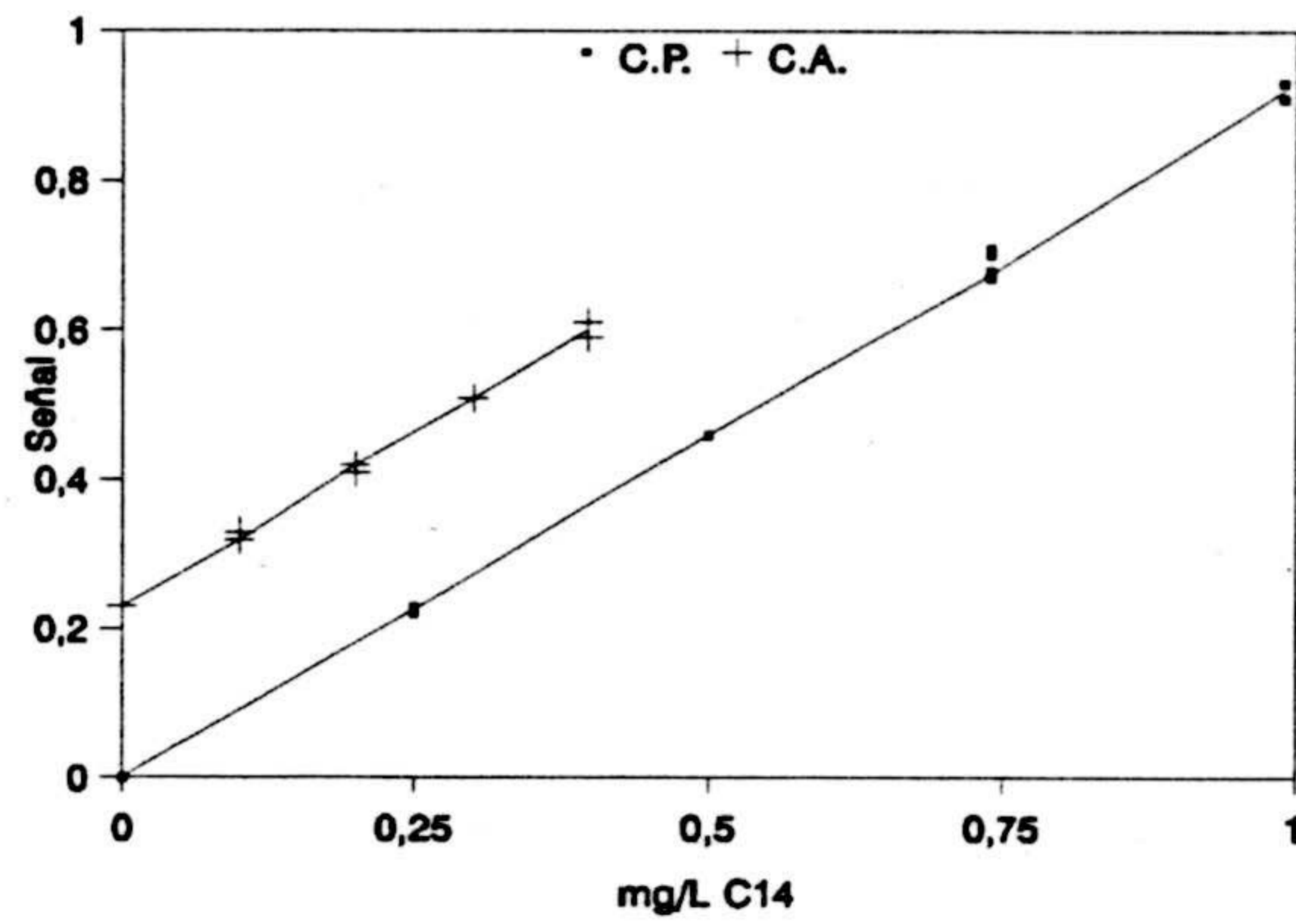


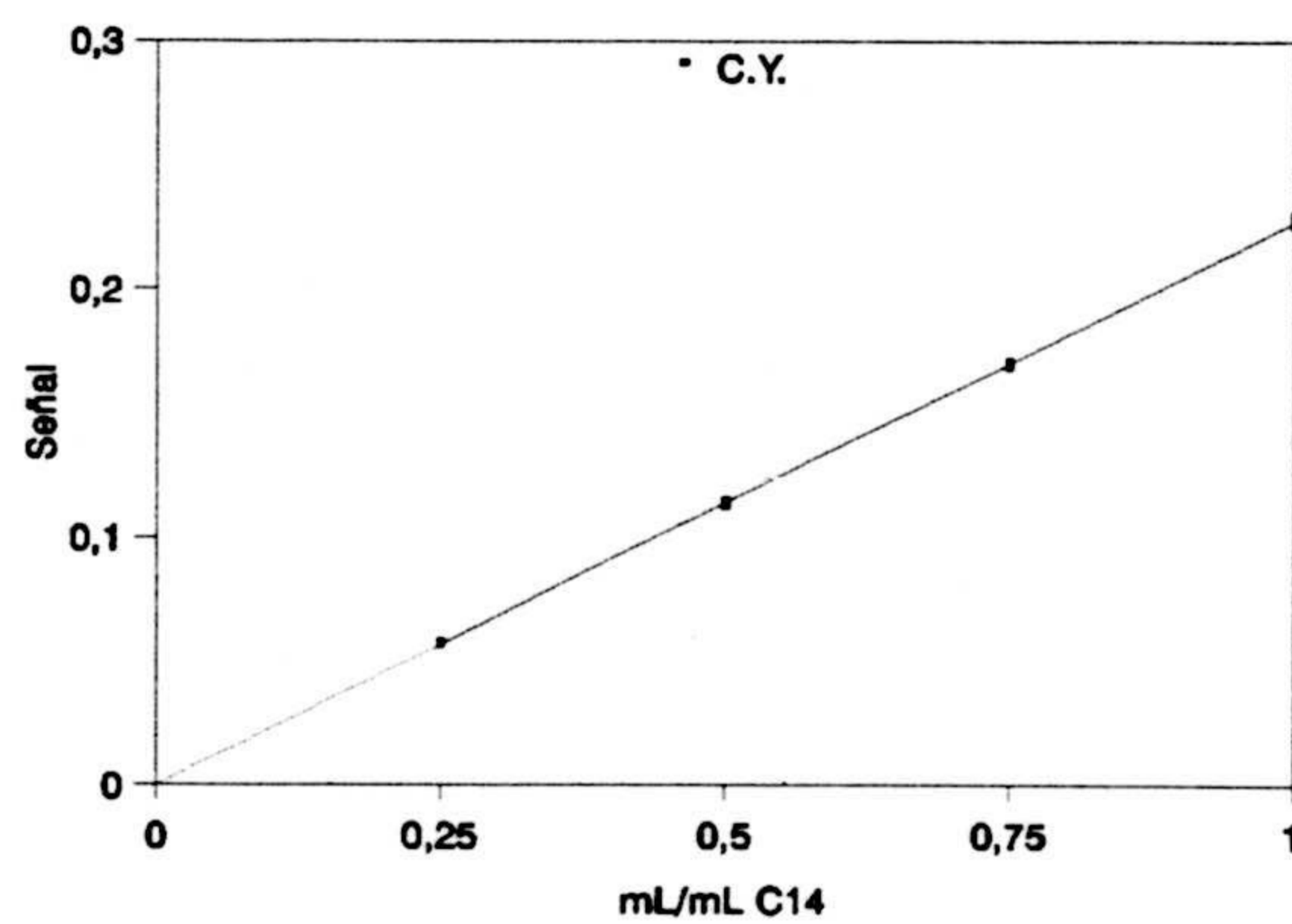
Figura IV.6.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>12</sub>.

**Tabla IV.12.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido mirístico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0011	0.2305	0.0005
<b>b</b>	0.9256	0.9184	0.2270
$S_{yx}$	0.0081	0.0036	0.0012
$S_p$	0.0070		
<b>t(b)</b>	0.5623 ( P = 58 %)		
$b_p$	0.9253		
<b>a'</b>	-0.0010	0.2291	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0016
$c_{x,S}$	0.2484	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	0.2470	-----
<b>t(c)</b>	0.5986 ( P = 56 %)		



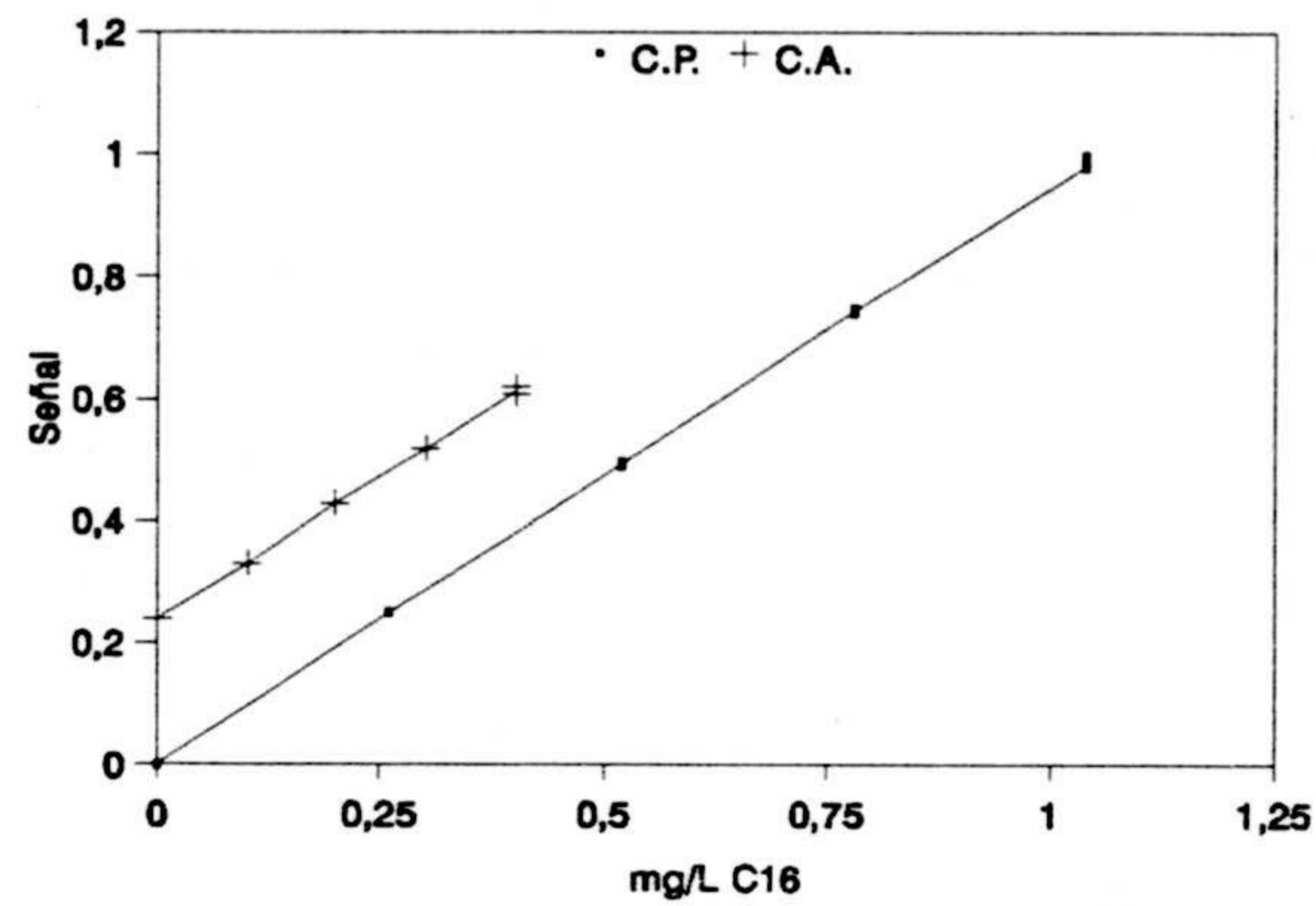
**Figura IV.7.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>14</sub>.



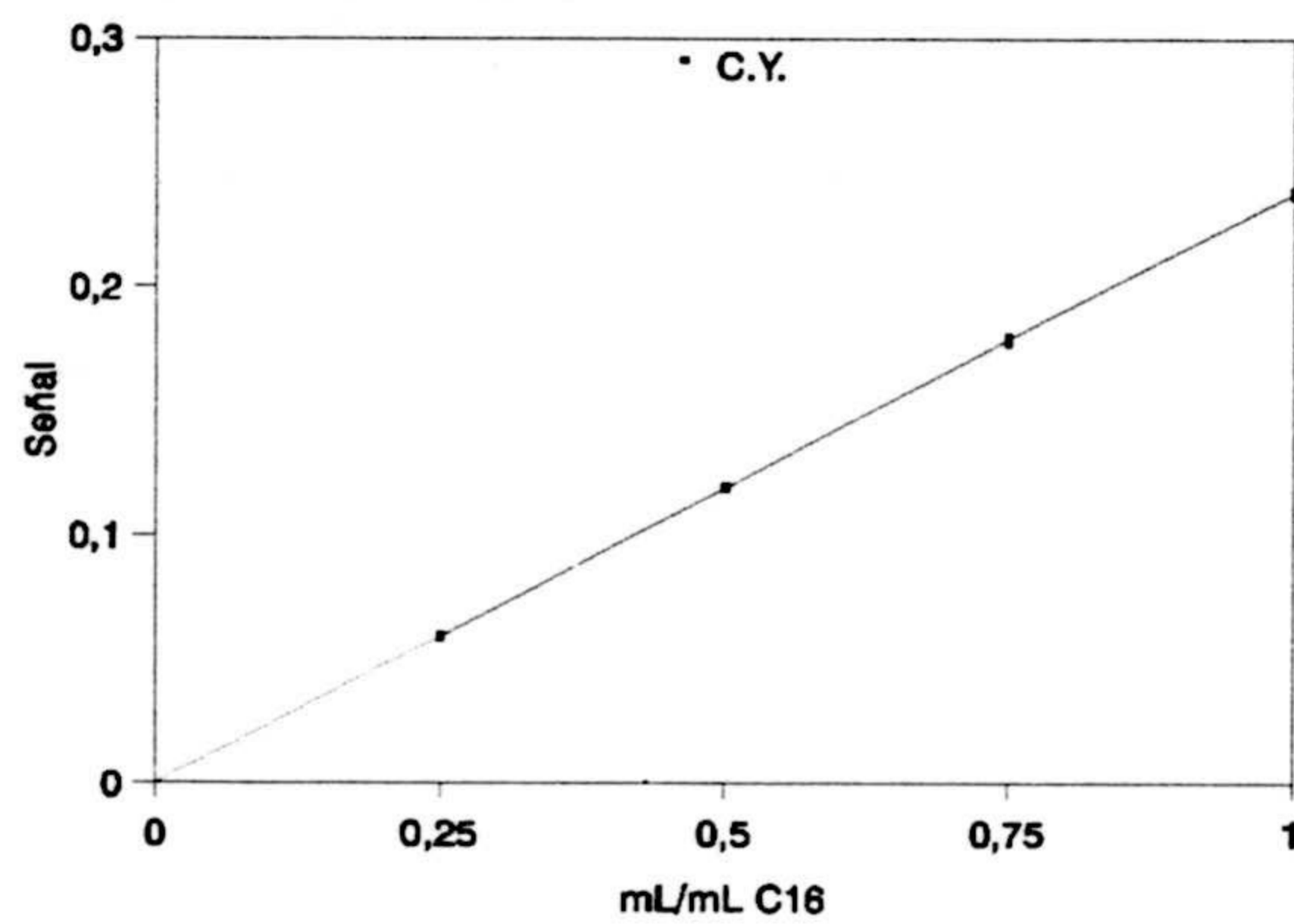
**Figura IV.8.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>14</sub>.

**Tabla IV.13.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido palmítico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0012	0.2385	0.0001
<b>b</b>	0.9481	0.9410	0.2382
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0047	0.0029	0.0010
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0042		
<b>t(b)</b>	0.9334 ( P = 36 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9479		
<b>a'</b>	0.0013	0.2371	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0012
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2510	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2500	-----
<b>t(c)</b>	0.6682 ( P = 50 %)		



**Figura IV.9.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>16</sub>.



**Figura IV.10.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>16</sub>.

**Tabla IV.14.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido oléico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0023	0.2243	-0.0045
<b>b</b>	0.8957	0.9053	0.2345
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0090	0.0022	0.0081
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0075		
<b>t(b)</b>	0.6756 ( P = 50 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8962		
<b>a'</b>	0.0019	0.2262	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0065
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2572	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2574	-----
<b>t(c)</b>	0.0683 ( P = 94 %)		

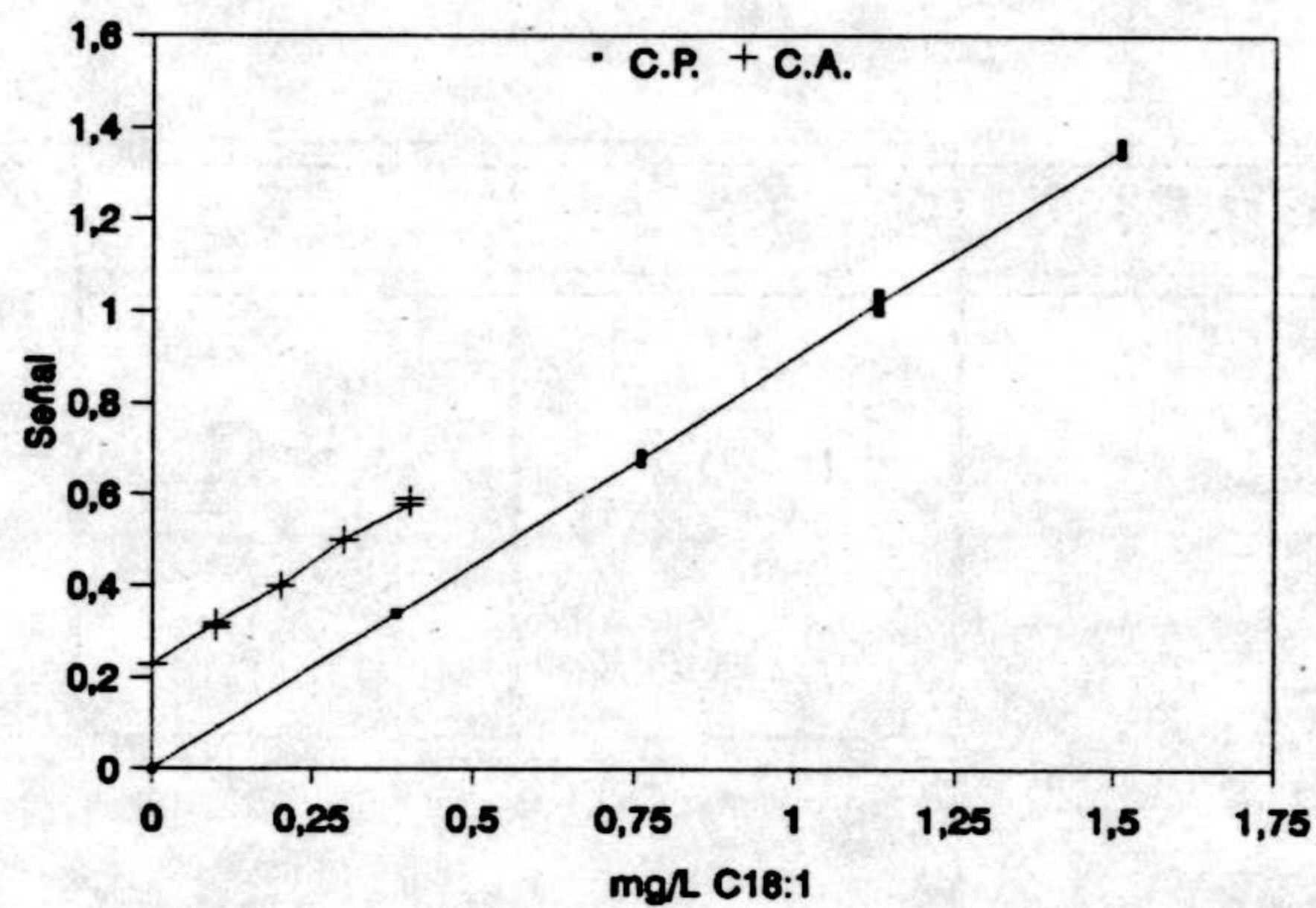


Figura IV.11.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18:1</sub>.

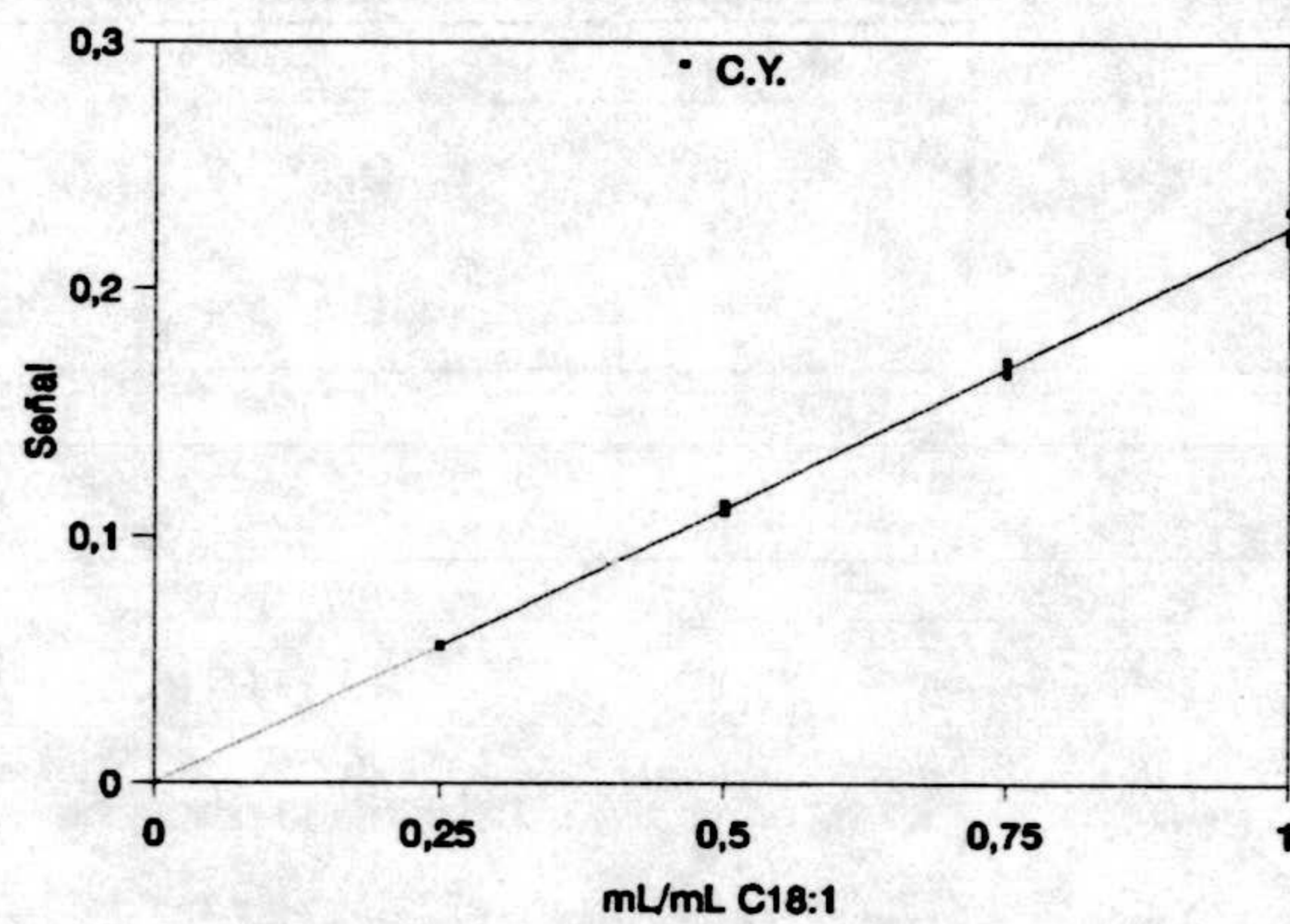


Figura IV.12.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18:1</sub>.



**Tabla IV.15.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido esteárico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0010	0.2390	0.0008
<b>b</b>	0.9574	0.9546	0.2381
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0072	0.0016	0.0018
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0060		
<b>t(b)</b>	0.2767 ( P = 78 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9576		
<b>a'</b>	0.0008	0.2384	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0000
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2493	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2481	-----
<b>t(c)</b>	0.5646 ( P = 58 %)		

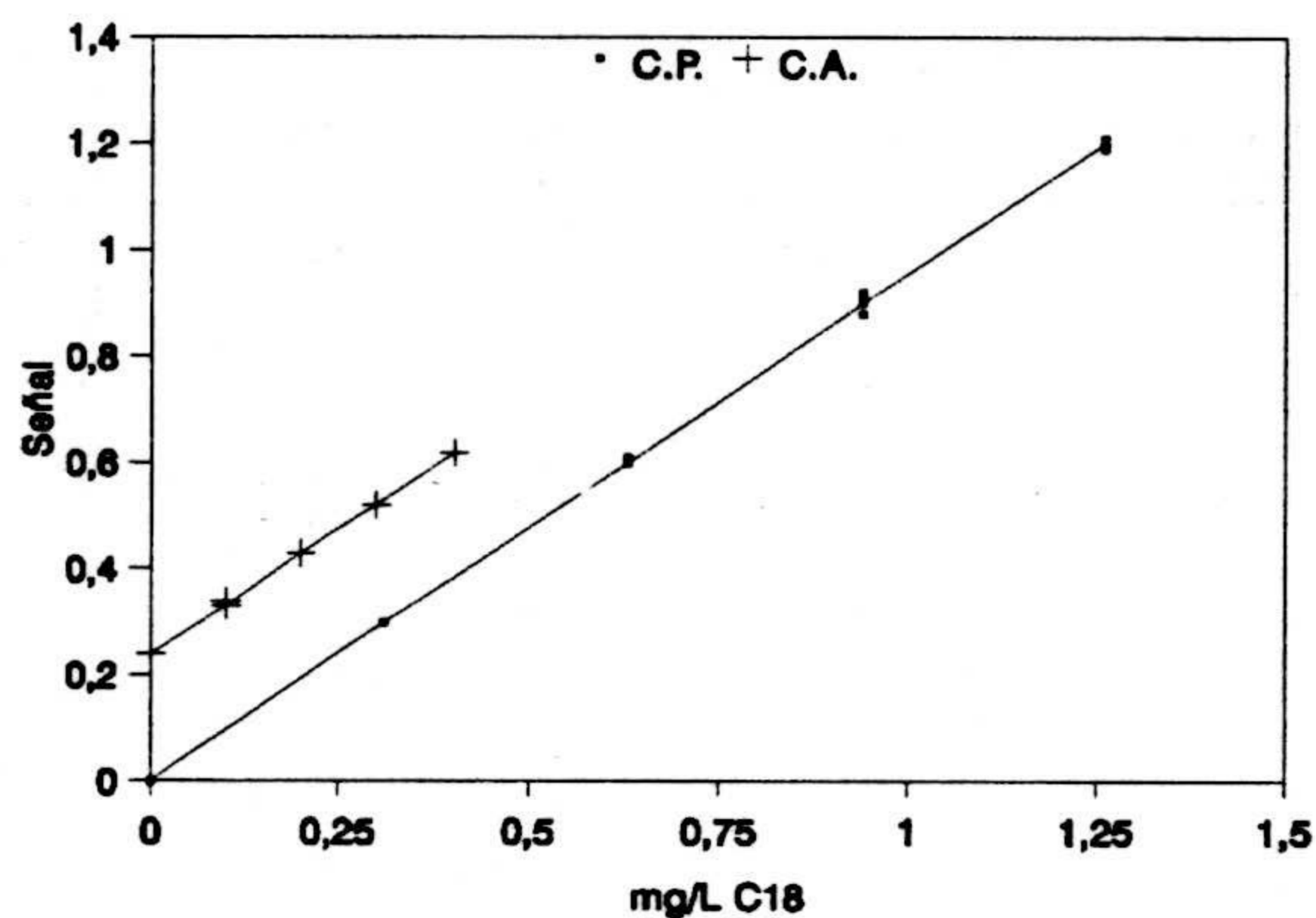


Figura IV.13.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18</sub>.

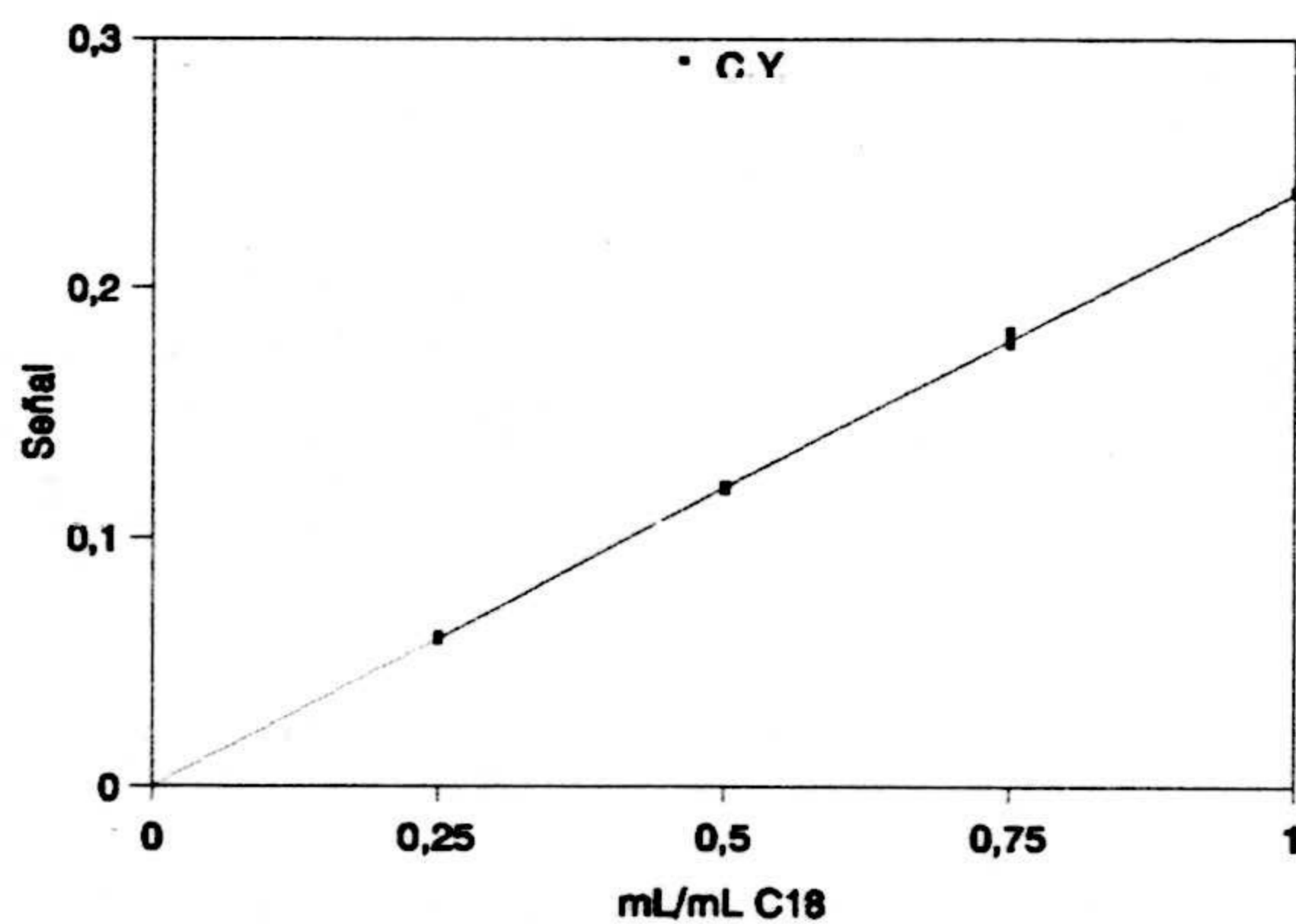
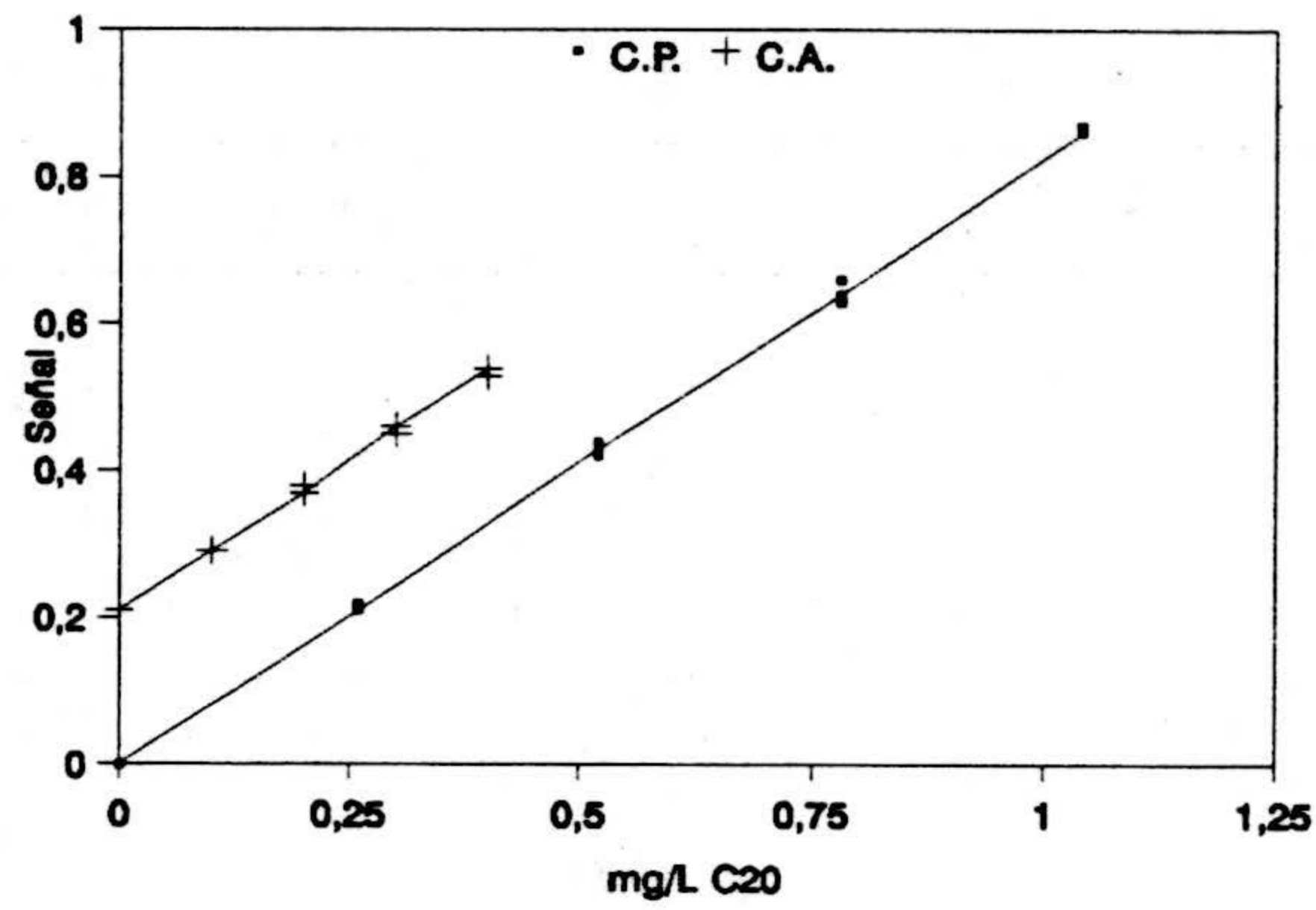


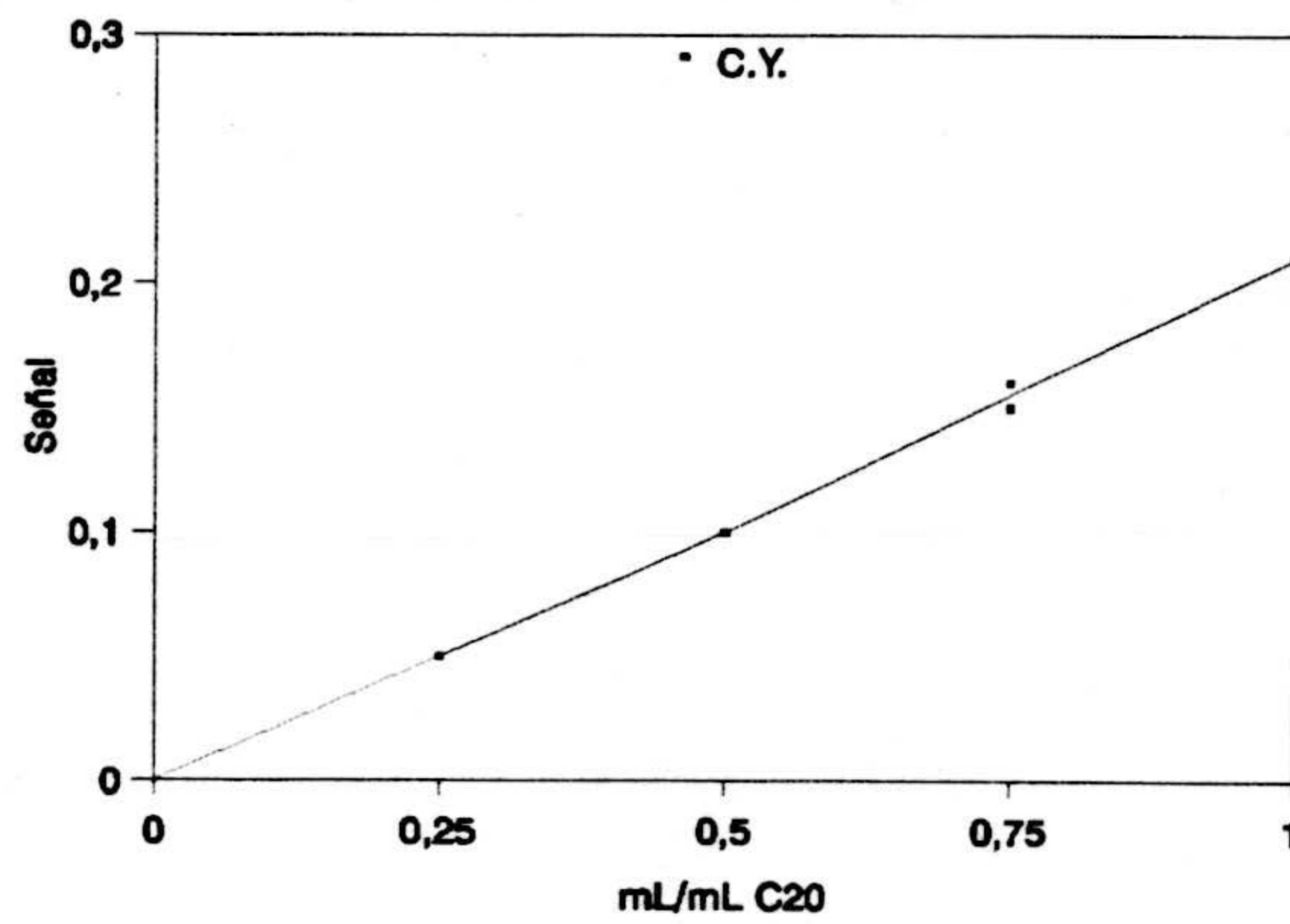
Figura IV.14.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18</sub>.

**Tabla IV.16.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido aráquico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0014	0.2088	0.0010
<b>b</b>	0.8295	0.8256	0.2061
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0065	0.0029	0.0014
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0056		
<b>t(b)</b>	0.3610 ( P = 72 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8291		
<b>a'</b>	-0.0012	0.2080	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0016
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2507	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2505	-----
<b>t(c)</b>	0.0855 ( P = 92 %)		



**Figura IV.15.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>20</sub>.



**Figura IV.16.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>20</sub>.

**Tabla IV.17.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido behénico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0006	0.1922	0.0007
<b>b</b>	0.7585	0.7641	0.1899
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0064	0.0017	0.0018
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0054		
<b>t(b)</b>	0.5527 ( P = 58 % )		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.7589		
<b>a'</b>	0.0005	0.1932	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0003
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2533	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2536	-----
<b>t(c)</b>	0.1309 ( P = 90 % )		

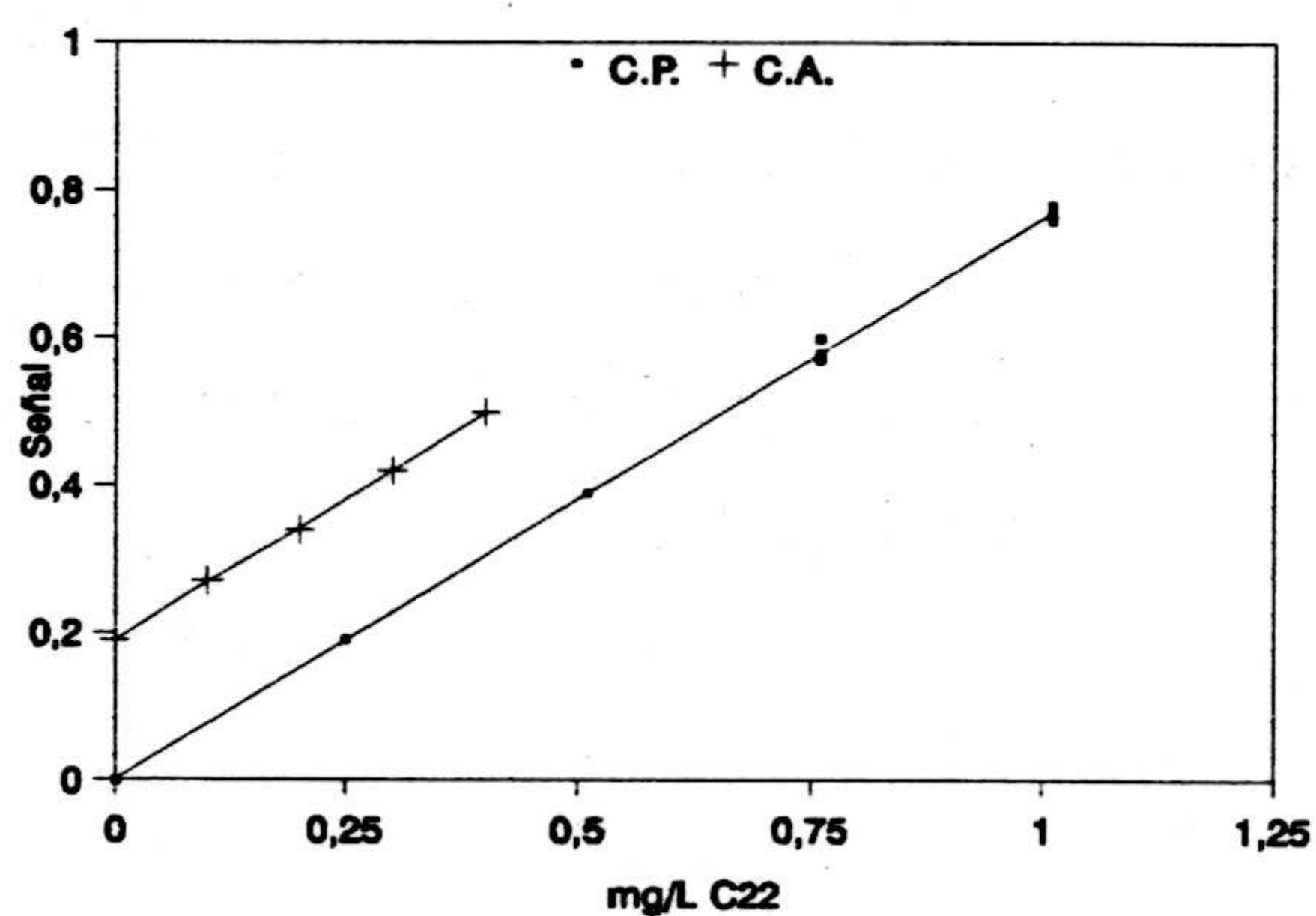


Figura IV.17.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>22</sub>.

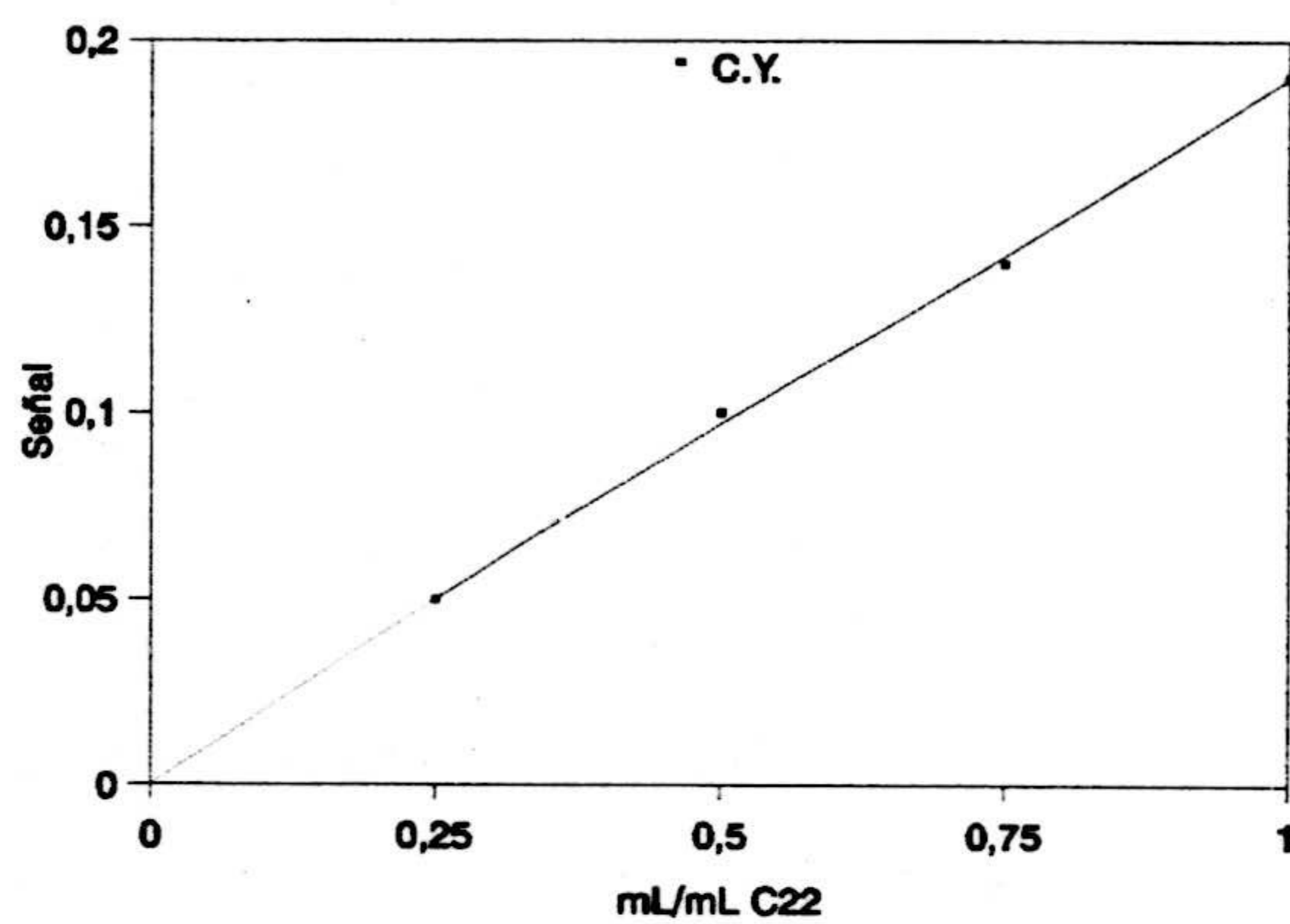


Figura IV.18.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>22</sub>.

### ***1.3.5.- Comentario de los resultados obtenidos.-***

**1.3.5.1.- Comparación de pendientes.** Se observó que en todos los casos obtenemos una conclusión no significativa, o sea al concluir por  $H_0$  ( $P > 10 \%$ ) las pendientes son iguales. Se comprobó la existencia de una ordenada en el origen positiva por lo que la adición de patrón provoca un error sistemático constante.

2.2.3.2.- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a_S'$ .

2.2.3.3.- Comprobación de la exactitud del método analítico. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), o sea el método es exacto para todos los ácidos grasos con un nivel de significación mayor del 5 %.

2.2.3.4.- Conclusión. El método queda validado para la extracción de los ácidos grasos presentes en agua potable de la ciudad de Granada..

### 1.3.6.- *Análisis de la muestra.*

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de agua potable de la ciudad de Granada. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se llevó directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis de agua potable de la ciudad de Granada. Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla IV.18

**Tabla IV.18.-** Contenido en ácidos grasos en el agua potable de la ciudad de Granada.

	[A] mg/L			[ $\bar{A}$ ] mg/L	$s_{[A]}$ mg/L	$\Delta[A]$ $t_{0.05,28}=2.048$	Ácidos grasos mg/L
	1	2	3				
$C_8$							±
$C_{10}$							±
$C_{12}$							±
$C_{14}$							±
$C_{16}$							±
$C_{18}$							±
$C_{18:1}$							±
$C_{20}$							±
$C_{22}$							±



## **2.- APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN FORMULACIONES COMERCIALES.**

Debido a la gran cantidad de formulaciones comerciales que incluyen en su composición ácidos grasos, El método fue aplicado a dos jabones de mano, y a dos polvos de acción intensa.

## **2.1.- Aplicación a jabones de mano.**

De entre todas las existentes en el mercado se seleccionaron las formulaciones ofrecidas por las marcas comerciales NIVEA y TOJADERMO.

### ***2.1.1.- Establecimiento del método de extracción de ácidos grasos en las jabones de mano.***

Para extraer los ácidos grasos de los jabones de mano se siguió el mismo proceso de extracción aplicado al agua de potable descrito en la página 276. Para ello se tomó 1 mg de jabón pulverizado adecuadamente y se le agregaron 100 mL de agua desionizada fijando el pH a un valor de 1 antes de proceder a la disolución por agitación. Al finalizar este proceso se le agregan 5 mL de diclorometano a la muestra ya tratada. La muestra se introdujo en un embudo de decantación de 250 mL y se agitó durante un minuto. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico anhidro y se sometió al procedimiento de esterificación descrito en la página 126, procediéndose posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo.

### ***2.1.2.- Validación del método extracción de los ácidos grasos presentes en jabones de mano.***

Para la validación de la extracción de ácidos grasos en jabones de mano se aplicó el protocolo estadístico basado en la metodología del método de adición de patrón. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, una adición de patrón y otra con porciones crecientes de muestra.

Para desarrollar esta metodología se relizaron las experiencias que se describen a continuación:

#### ***2.1.2.1.- Calibrado con patrones.-***

En el anterior capítulo se desarrolló este calibrado para todos los ácidos grasos, obteniéndose sus correspondientes parámetros estadísticos, así como sus parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón se empleó la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y la desviación estandar de la regresión  $S_{R,C}$ . Estos valores quedan indicados en la correspondiente tabla de validación de cada ácido graso.

### *2.1.2.2.- Calibrado con adición de patrón.-*

Para establecer este calibrado se realizó la siguiente experiencia. Se pesaron 5 mg de jabón NIVEA y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron cinco alícuotas de 100 mL de ésta, a las cuales se les añadieron volúmenes crecientes de disolución patrón de los ácidos grasos, para obtener unas concentraciones finales de 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácidos grasos individuales añadidos a la muestra. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168.

No son necesarias las réplicas del método, pero se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.19.

### ***2.1.2.3- Calibrado de Youden.-***

Se pesaron 5 mg de jabón NIVEA y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron volúmenes crecientes (25, 50, 75 y 100 mL) de ésta y se enrasaron a 100 mL con agua desionizada. Se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.20

### ***2.1.2.4.- Comprobación de la exactitud del método.-***

Para verificar la exactitud del método hay que hacer el mismo desarrollo que se empleó en el caso del agua potable.

A continuación se presentan tabulados los valores obtenidos al aplicar este desarrollo a cada ácido graso.

**Tabla IV.19.-** Señales obtenidas en el calibrado por adición de patrón (CA).

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	5	0.351	11	0.737	18	1.12	21	1.50	29	1.86
	5	0.351	11	0.738	16	1.11	23	1.52	28	1.90
	5	0.351	10	0.730	18	1.12	22	1.51	28	1.91
C <sub>10</sub>	5	0.335	9	0.589	13	0.84	16	1.09	21	1.36
	5	0.336	9	0.587	12	0.84	16	1.10	20	1.35
	5	0.334	8	0.589	13	0.83	15	1.09	19	1.34
C <sub>12</sub> (*)	49	3.116	83	5.600	128	8.02	150	10.5	198	12.8
	47	3.115	84	5.599	118	7.92	152	10.2	190	12.8
	49	3.114	80	5.585	125	7.97	149	10.4	183	12.7

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.19.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub> (*)	43	2.809	77	5.191	117	7.365	140	9.79	185	12.0
	42	2.800	76	5.148	112	7.559	147	9.86	183	12.4
	44	2.805	74	5.166	118	7.514	138	9.69	175	12.1
C <sub>16</sub> (*)	96	6.181	125	8.386	171	10.75	184	12.9	238	15.4
	93	6.185	126	8.435	159	10.70	195	13.1	222	15.0
	96	6.183	120	8.414	167	10.64	185	12.9	221	15.3
C <sub>18</sub>	84	5.359	115	7.744	160	10.05	178	12.5	229	14.9
	81	5.360	116	7.753	150	10.14	185	12.4	223	15.0
	83	5.355	111	7.772	159	10.09	178	12.5	215	14.8
C <sub>18:1</sub> (*)	44	2.848	79	5.281	122	7.623	143	9.98	193	12.5
	43	2.852	78	5.246	112	7.573	148	9.95	184	12.4
	44	2.843	75	5.233	119	7.571	143	10.0	181	12.5
C <sub>20</sub>	1.3	0.085	4.6	0.309	8.1	0.509	10	0.73	15	0.96
	1.2	0.085	4.5	0.305	7.7	0.521	11	0.74	14	0.95
	1.3	0.083	4.3	0.302	8.0	0.512	10	0.73	14	0.94

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.19- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-4</sup> )				
C <sub>13</sub>	15.6	14.9	15.9	14.3	15.4
	15.0	14.9	14.8	14.9	14.8
	15.6	14.2	15.7	14.3	14.4



**Tabla IV.20.-** Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	1.33	0.088	2.70	0.175	3.99	0.265	5.58	0.358
	1.34	0.089	2.55	0.178	3.92	0.264	5.32	0.348
	1.37	0.086	2.75	0.179	4.04	0.266	5.24	0.351
C <sub>10</sub>	1.28	0.084	2.53	0.164	3.82	0.254	5.20	0.334
	1.27	0.083	2.45	0.171	3.77	0.255	5.11	0.334
	1.34	0.084	2.58	0.168	3.86	0.254	5.06	0.338
C <sub>12</sub>	11.5	0.762	23.4	1.516	34.8	2.309	48.4	3.105
	11.9	0.782	22.2	1.550	35.3	2.382	48.1	3.147
	12.2	0.771	22.9	1.494	35.7	2.350	47.0	3.146
C <sub>14</sub>	10.6	0.700	21.2	1.376	31.4	2.090	44.9	2.885
	10.7	0.704	20.4	1.420	31.7	2.143	42.6	2.785
	11.1	0.697	21.7	1.416	32.3	2.126	42.6	2.852
C <sub>16</sub>	23.5	1.549	47.4	3.079	69.6	4.623	95.1	6.109
	22.3	1.489	44.1	3.078	70.1	4.736	93.8	6.139
	24.3	1.532	47.4	3.096	69.9	4.594	93.6	6.266
C <sub>18</sub>	20.2	1.327	41.7	2.706	5.96	3.962	8.13	5.219
	20.4	1.342	37.9	2.646	5.91	3.990	8.29	5.424
	21.6	1.362	41.5	2.713	6.04	3.973	8.07	5.400

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

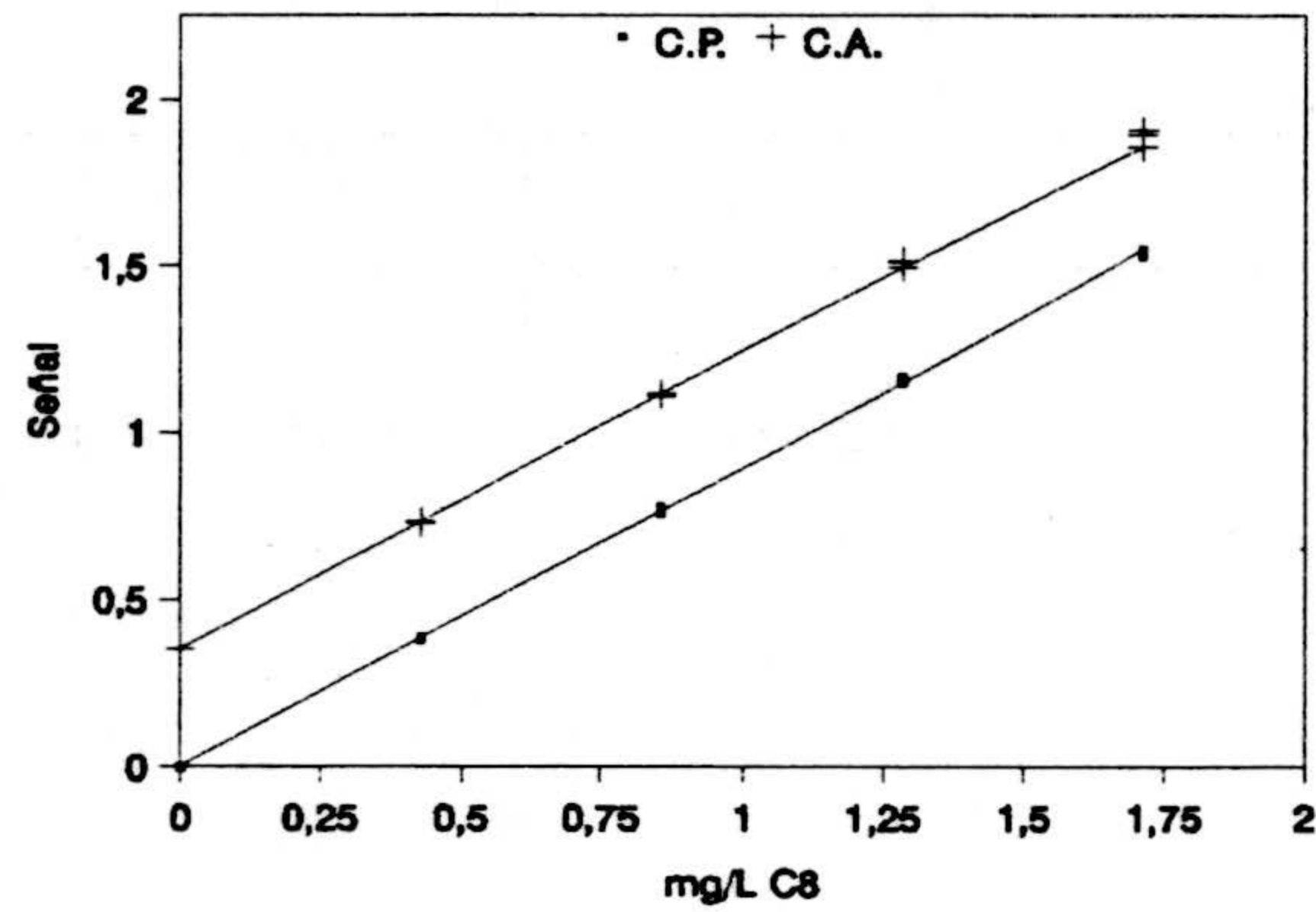
Tabla IV.20.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	10.8	0.714	21.7	1.411	32.2	2.137	45.1	2.897
	11.0	0.724	20.9	1.458	31.4	2.120	43.5	2.848
	11.2	0.705	21.4	1.397	33.4	2.194	42.4	2.835
C <sub>20</sub>	0.33	0.022	0.68	0.044	0.93	0.062	1.32	0.085
	0.31	0.021	0.62	0.043	0.92	0.063	1.33	0.087
	0.32	0.021	0.65	0.042	0.98	0.064	1.28	0.086
C <sub>13</sub>	15.2		15.4		15.1		15.6	
	15.2		14.3		14.8		15.3	
	15.9		15.3		15.2		14.9	

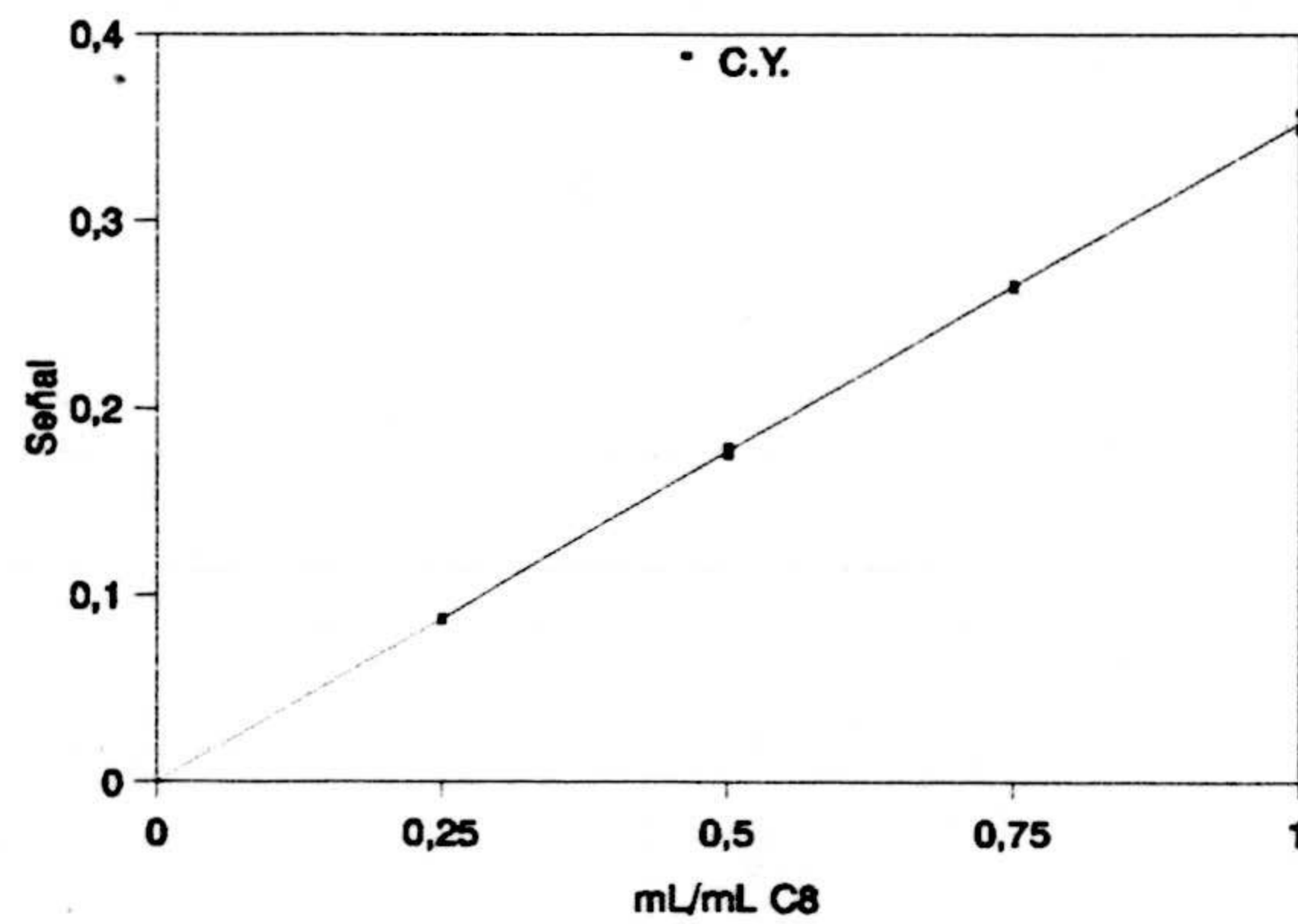
A, área analito (10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

**Tabla IV.21.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido caprílico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0040	0.3507	-0.0001
<b>b</b>	0.8991	0.8981	0.3530
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0056	0.0115	0.0027
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0081		
<b>t(b)</b>	0.3306 ( P = 74 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8991		
<b>a'</b>	0.0014	0.3499	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0015
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.3905	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.3893	-----
<b>t(c)</b>	0.3979 ( P = 70 %)		



**Figura IV.19.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>8</sub>.



**Figura IV.20.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>8</sub>.

**Tabla IV.22.** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido cáprico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	0.3343	-0.0002
<b>b</b>	0.9646	0.9645	0.3367
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0076	0.0049	0.0023
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0069		
<b>t(b)</b>	0.0216 ( P = 97 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9644		
<b>a'</b>	-0.0020	0.3344	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0019
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.3475	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.3469	-----
<b>t(c)</b>	0.2612 ( P = 78 %)		

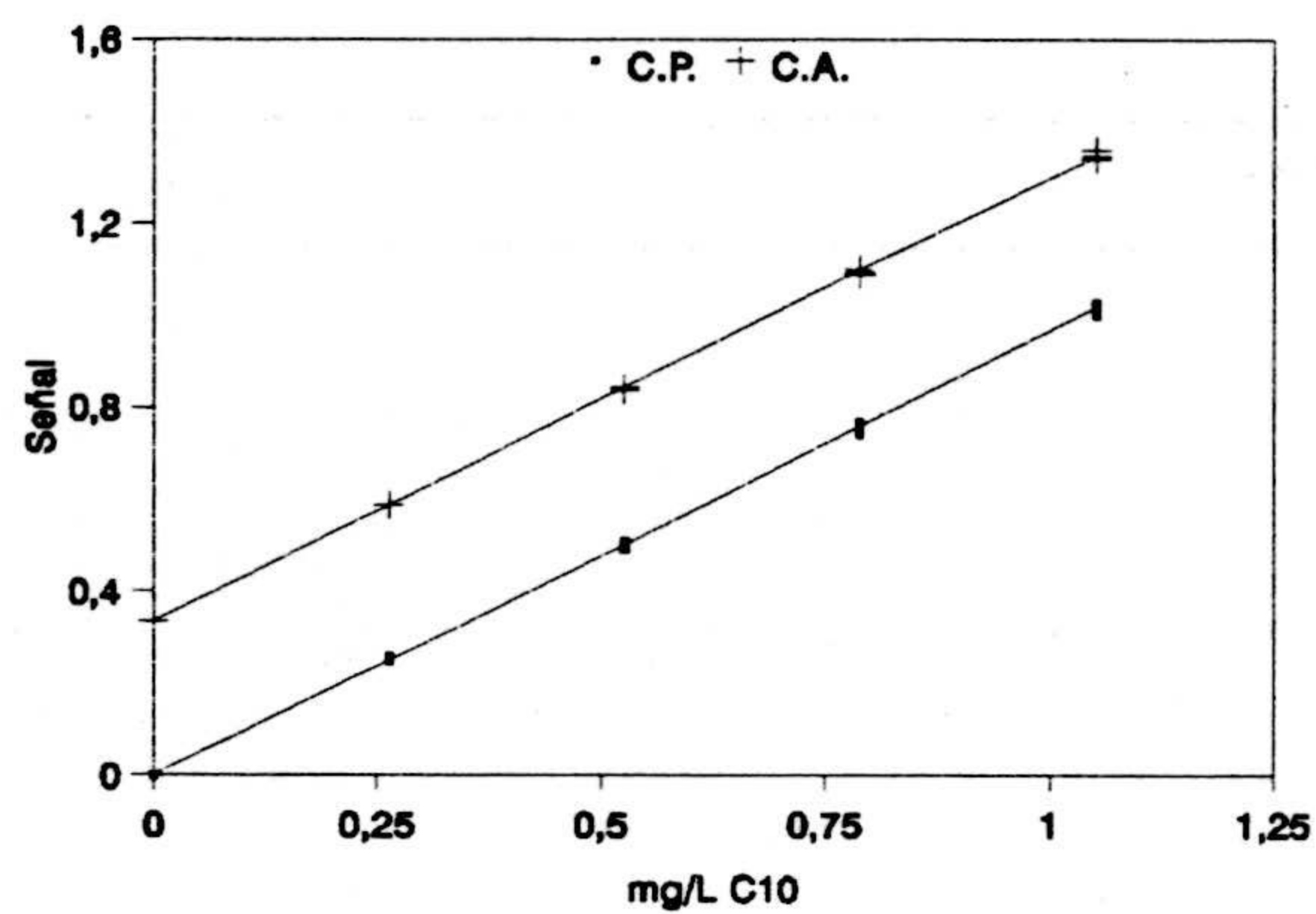


Figura IV.21.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>10</sub>.

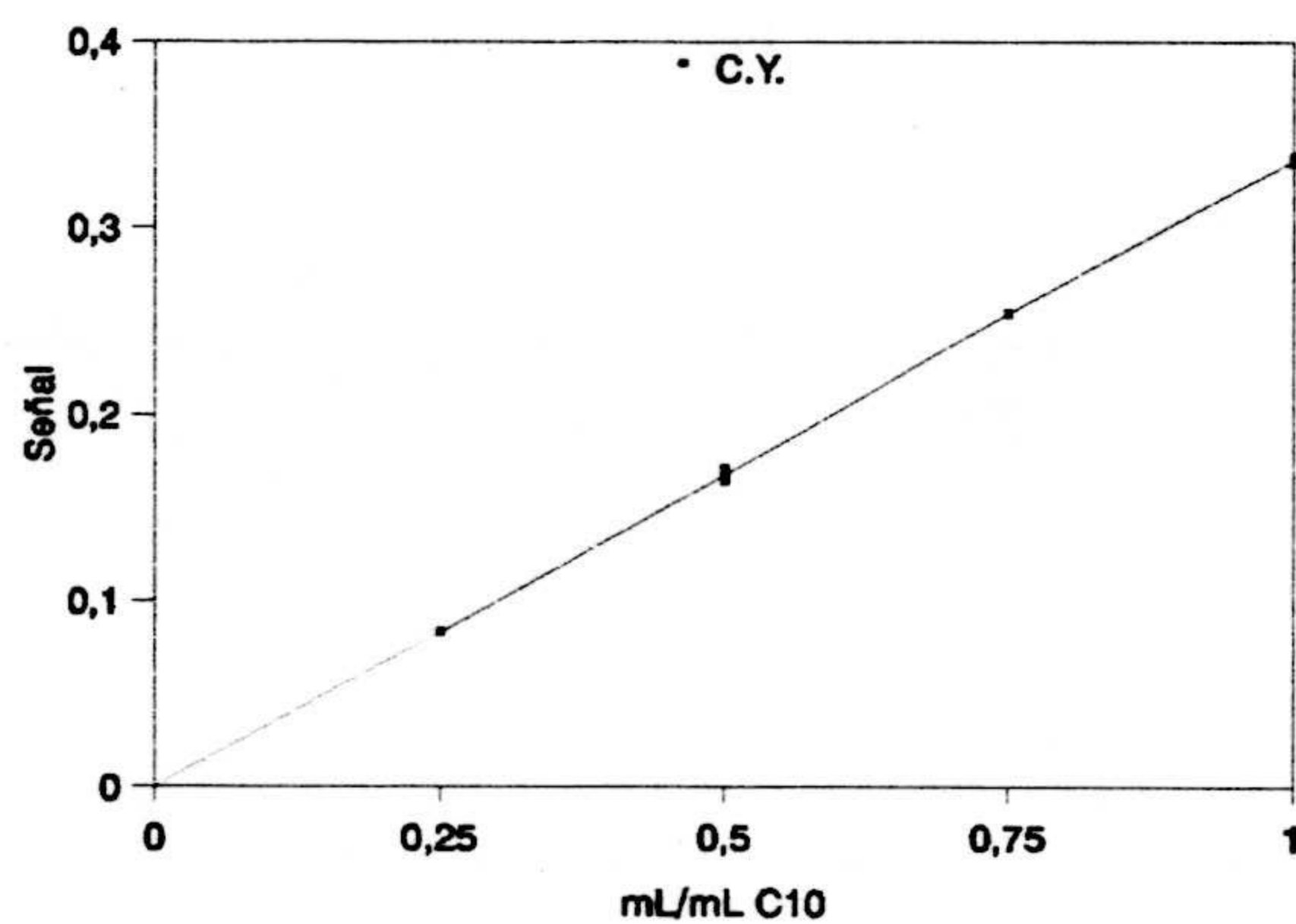


Figura IV.22.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>10</sub>.

**Tabla IV.23.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido láurico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0097	3.1416	0.0294
<b>b</b>	0.8980	0.8935	3.1707
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0802	0.0713	0.0294
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0775		
<b>t(b)</b>	0.6992 ( P = 48 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8965		
<b>a'</b>	0.0177	3.1254	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0561
<b>c<sub>x,S</sub></b>	3.5185	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	3.5290	-----
<b>t(c)</b>	0.3543 ( P = 72 %)		

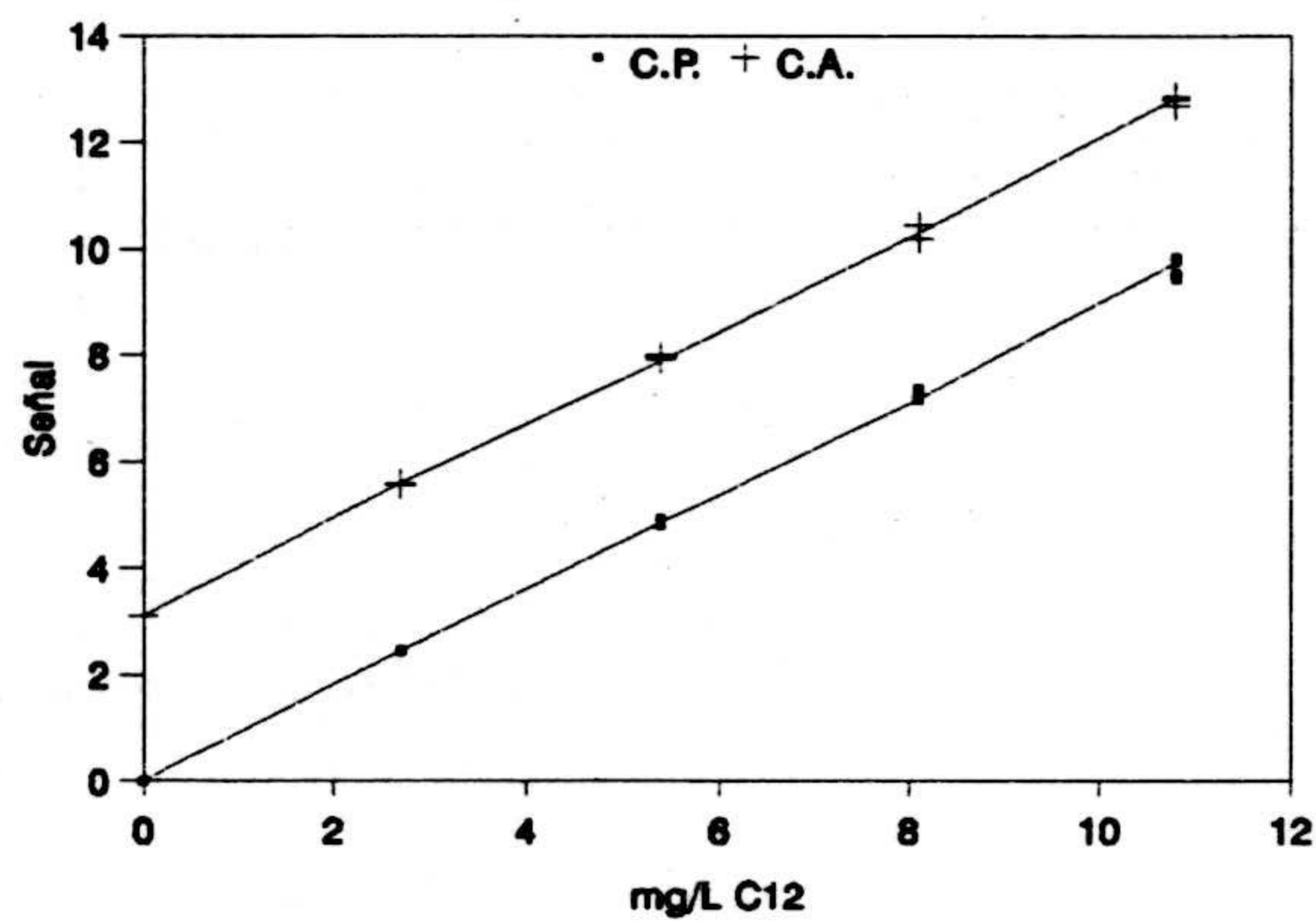


Figura IV.23.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>12</sub>.

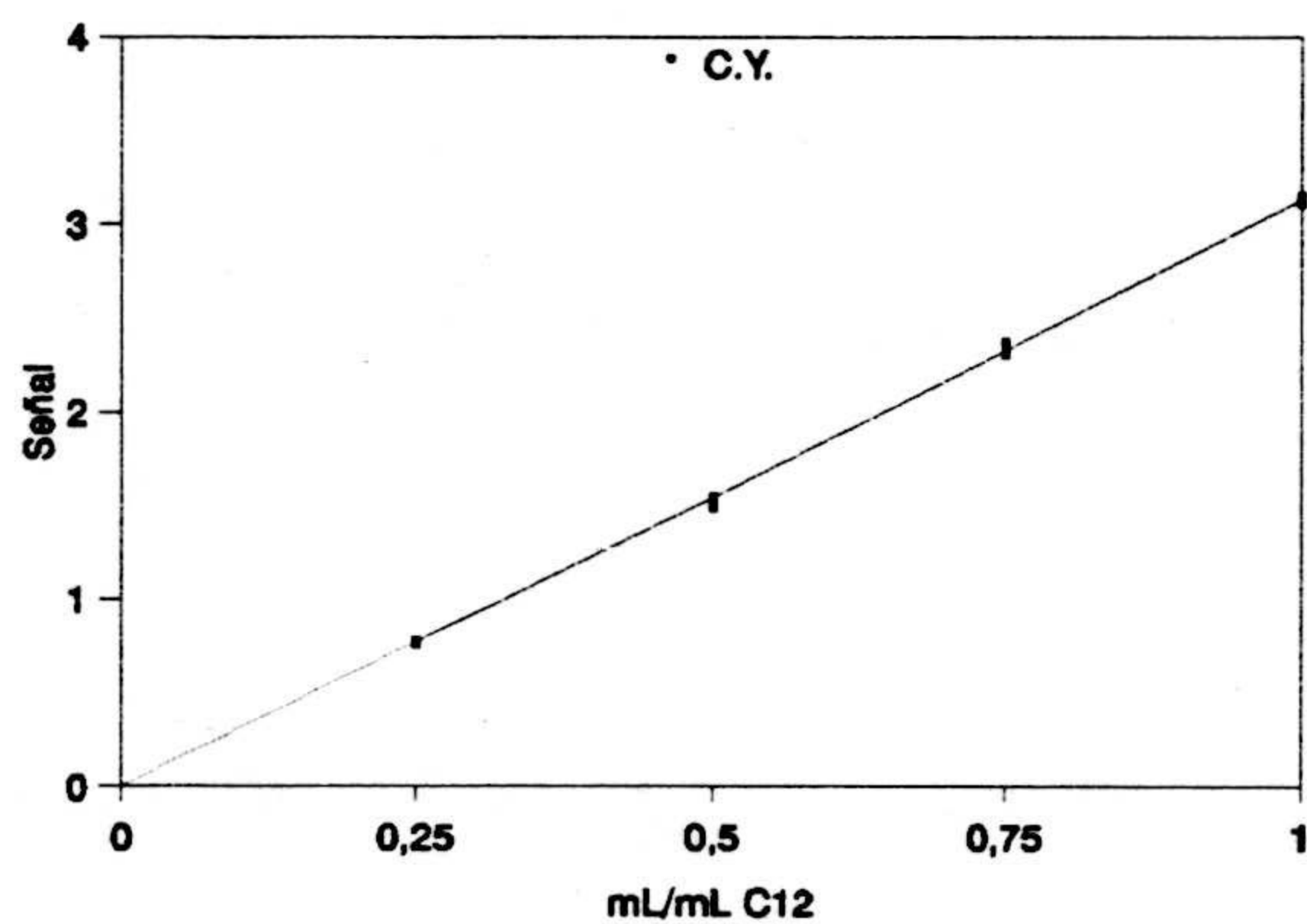
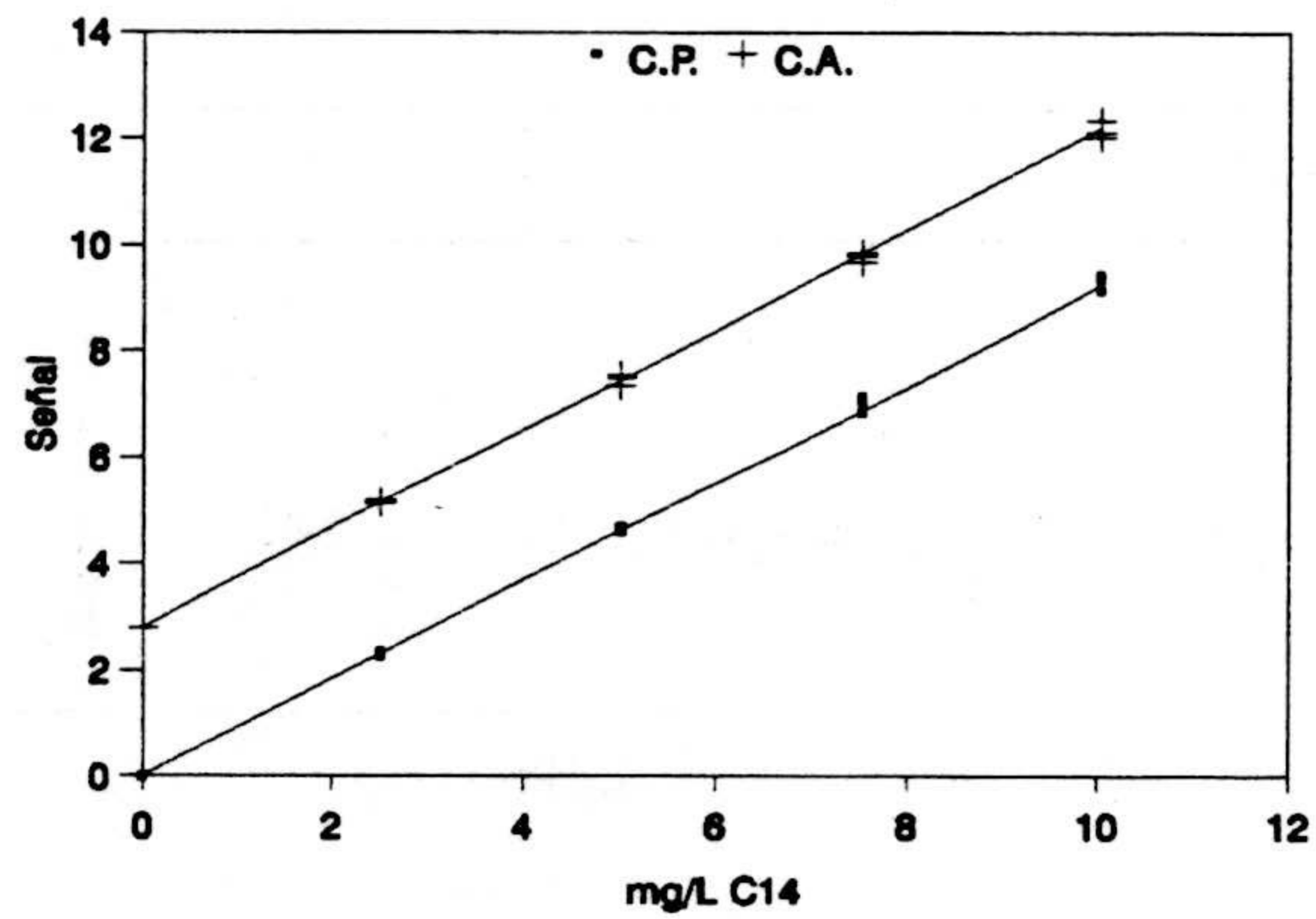


Figura IV.24.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>12</sub>.

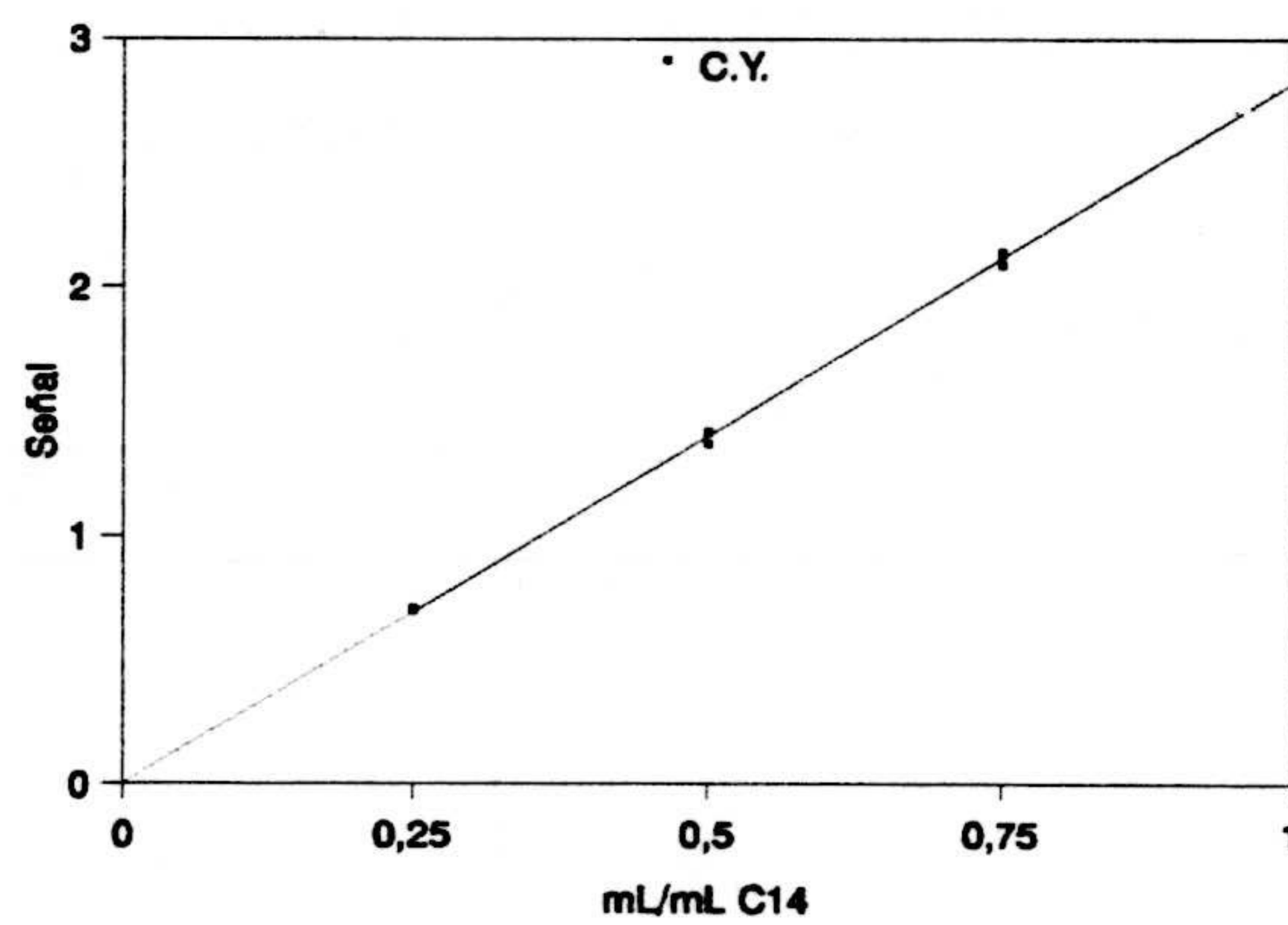


**Tabla IV.24.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido mirístico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0054	2.8093	-0.0185
<b>b</b>	0.9305	0.9304	2.8551
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0694	0.0886	0.0286
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0760		
<b>t(b)</b>	0.0137 ( P = 98 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9305		
<b>a'</b>	-0.0052	2.8090	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0133
<b>c<sub>x,S</sub></b>	3.0291	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	3.0388	-----
<b>t(c)</b>	0.3483 ( P = 0.72 %)		



**Figura IV.25.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>14</sub>.



**Figura IV.26.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>14</sub>.

**Tabla IV.25.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el **ácido palmítico**.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	6.1640	-0.0200
<b>b</b>	0.9425	0.9446	6.2053
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0619	0.0957	0.0554
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0743		
<b>t(b)</b>	0.2968 ( P = 78 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9432		
<b>a'</b>	-0.0054	6.1706	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0146
<b>c<sub>x,S</sub></b>	6.5733	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	6.5633	-----
<b>t(c)</b>	0.2966 ( P = 76 %)		

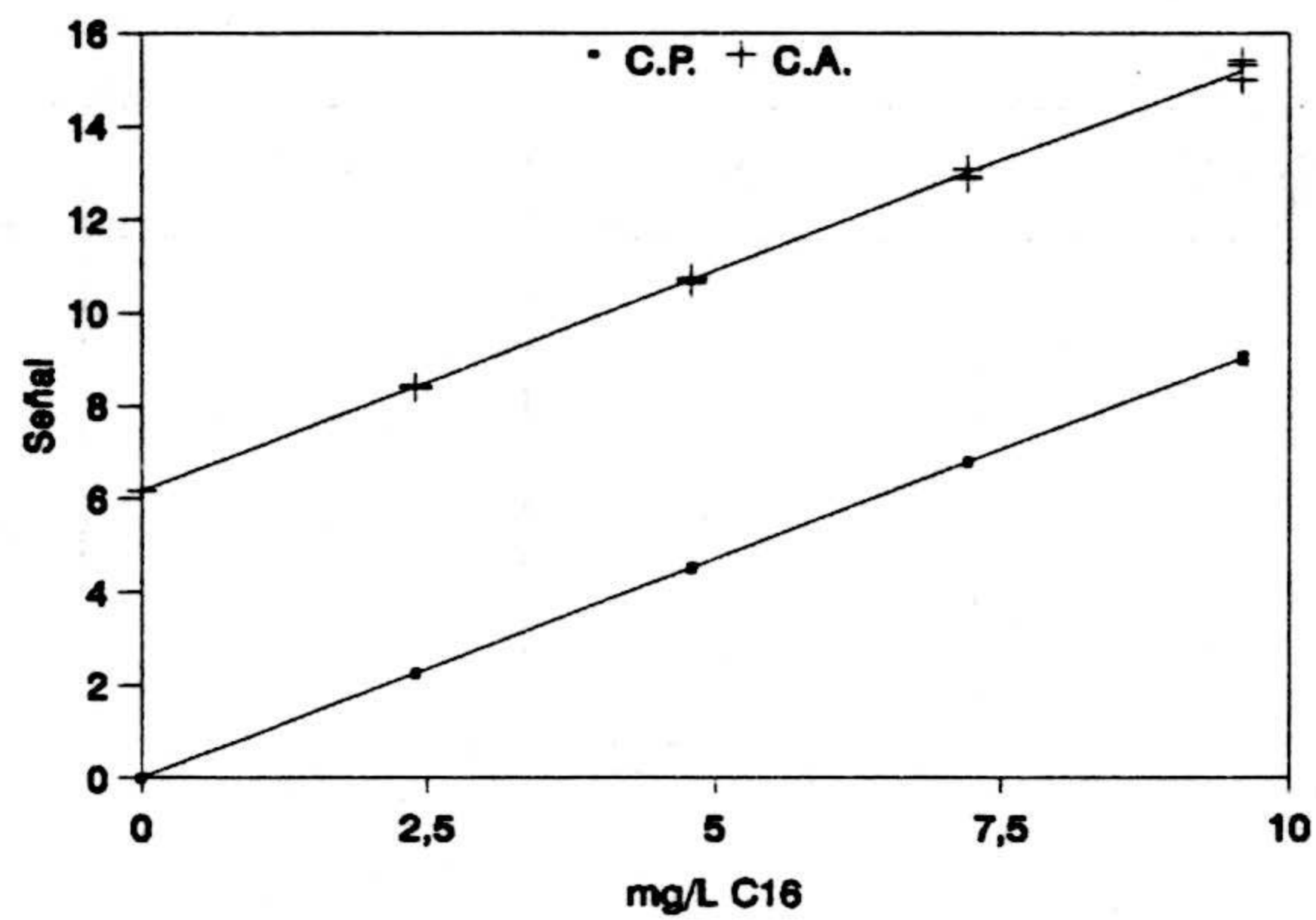


Figura IV.27.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>16</sub>.

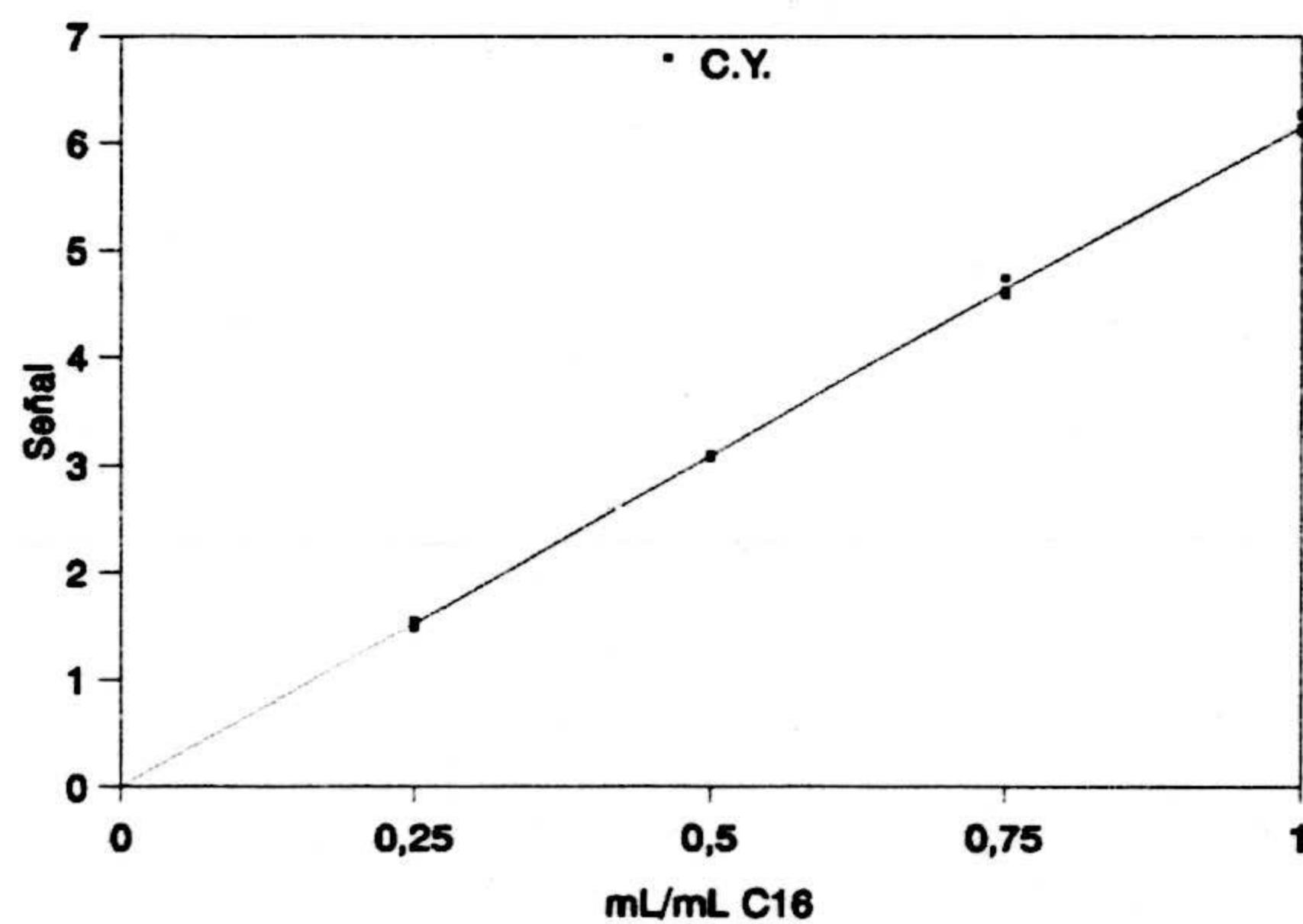


Figura IV.28.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>16</sub>.

**Tabla IV.26.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido oléico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0047	2.8320	-0.0083
<b>b</b>	0.9175	0.9199	2.8707
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0535	0.0483	0.0276
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0519		
<b>t(b)</b>	0.5455 ( P = 58 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9183		
<b>a'</b>	0.0004	2.8404	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0088
<b>c<sub>x,S</sub></b>	3.1126	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	3.1022	-----
<b>t(c)</b>	0.5413 ( P = 60 %)		

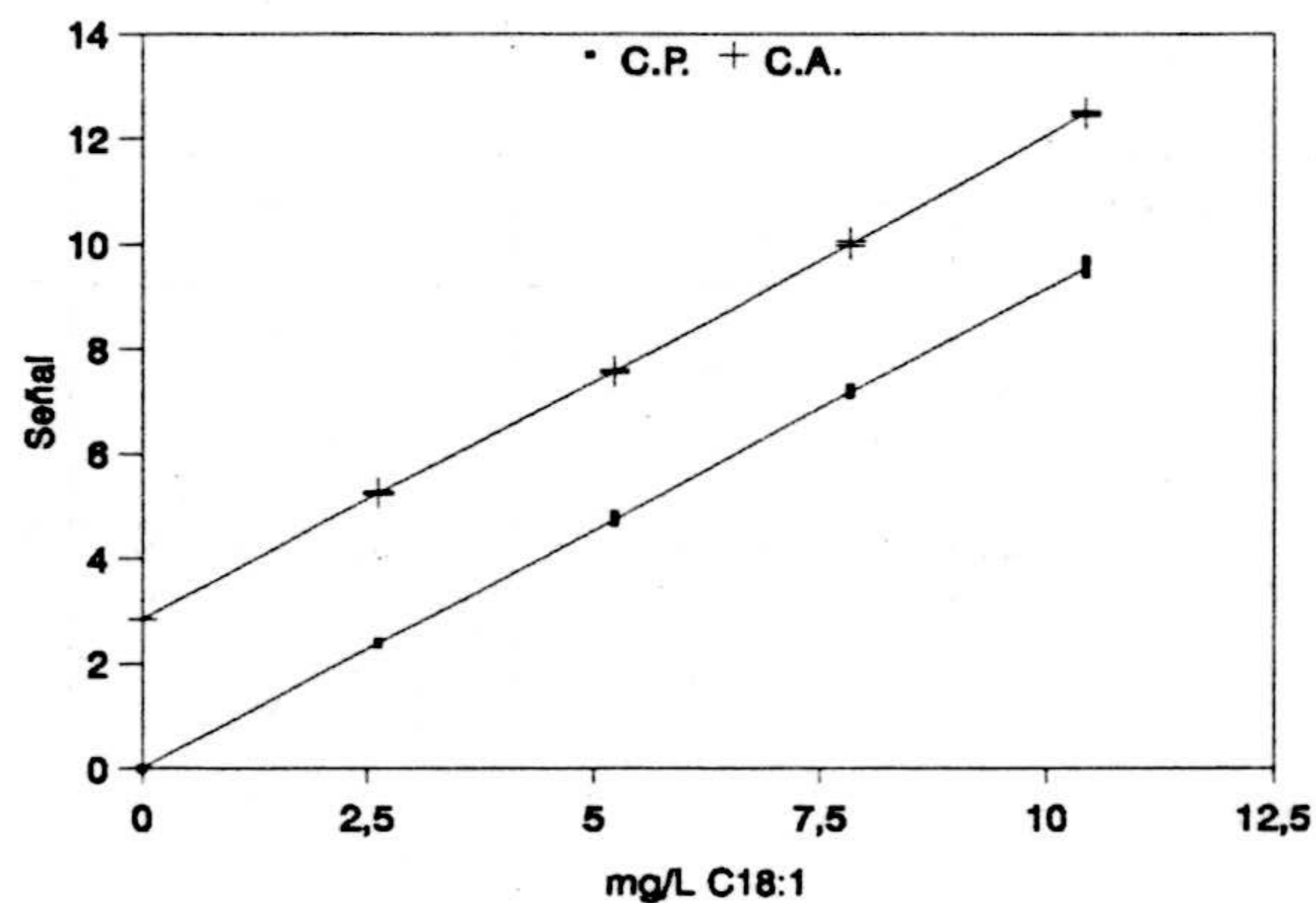


Figura IV.29.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18:1</sub>

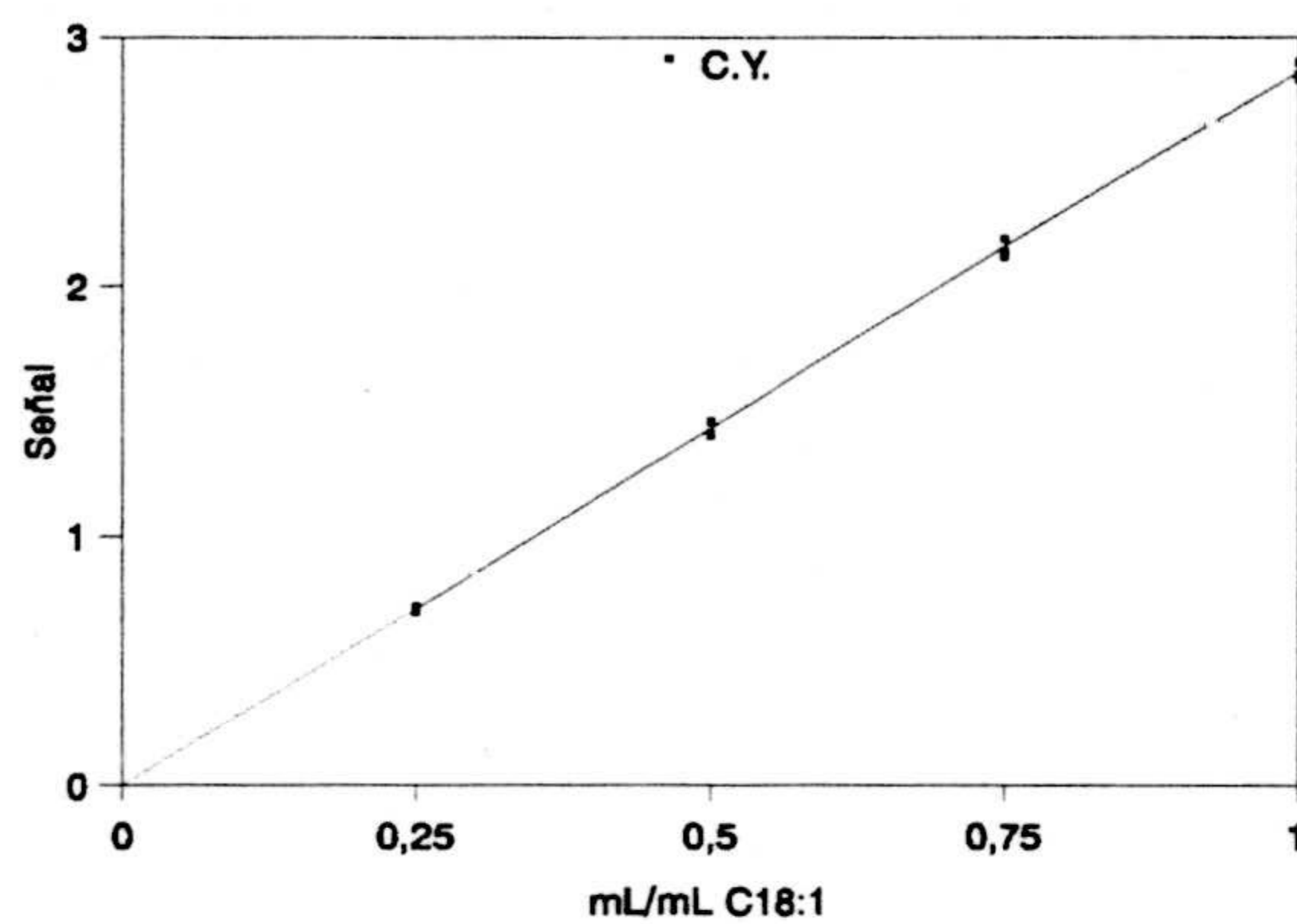
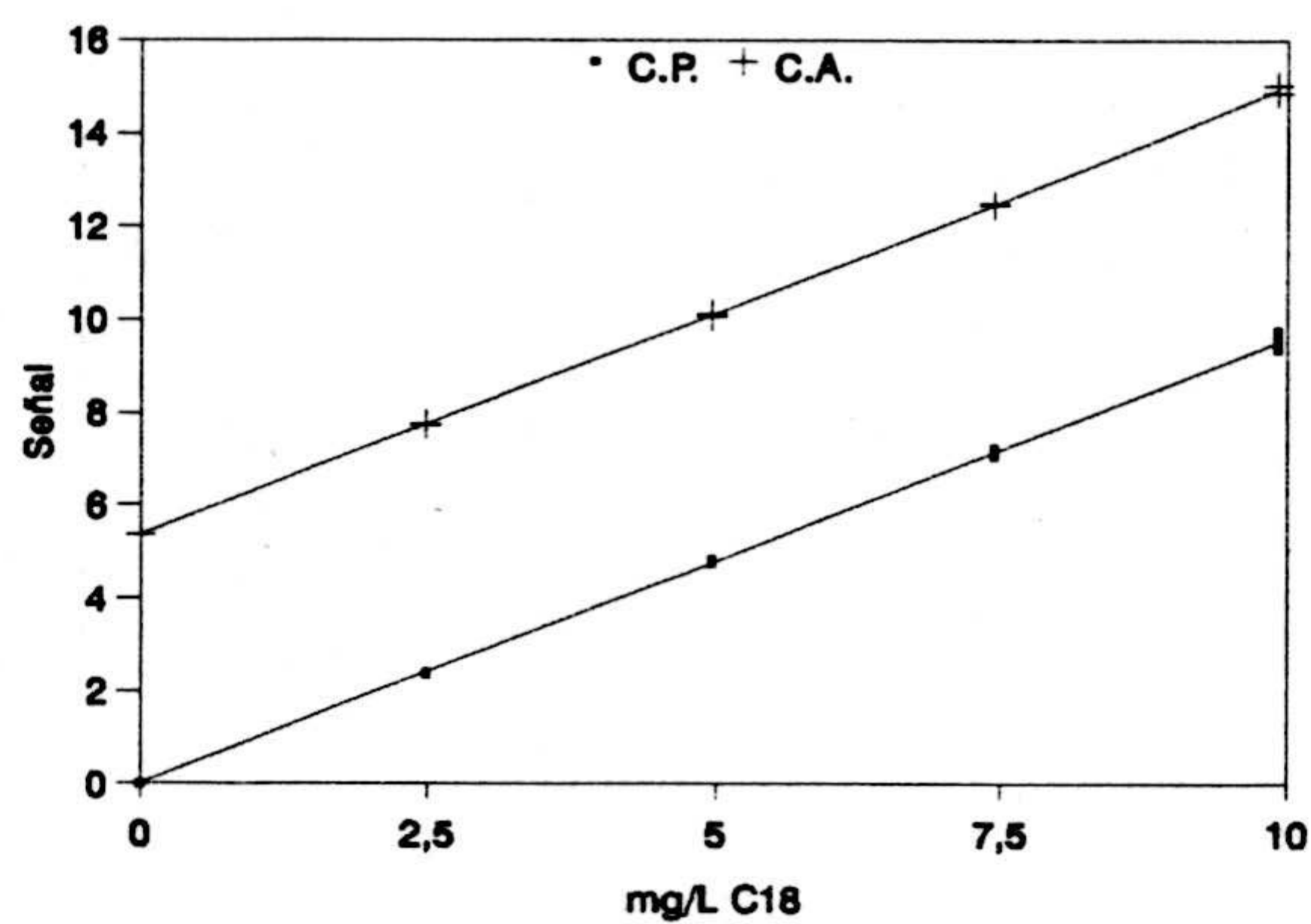


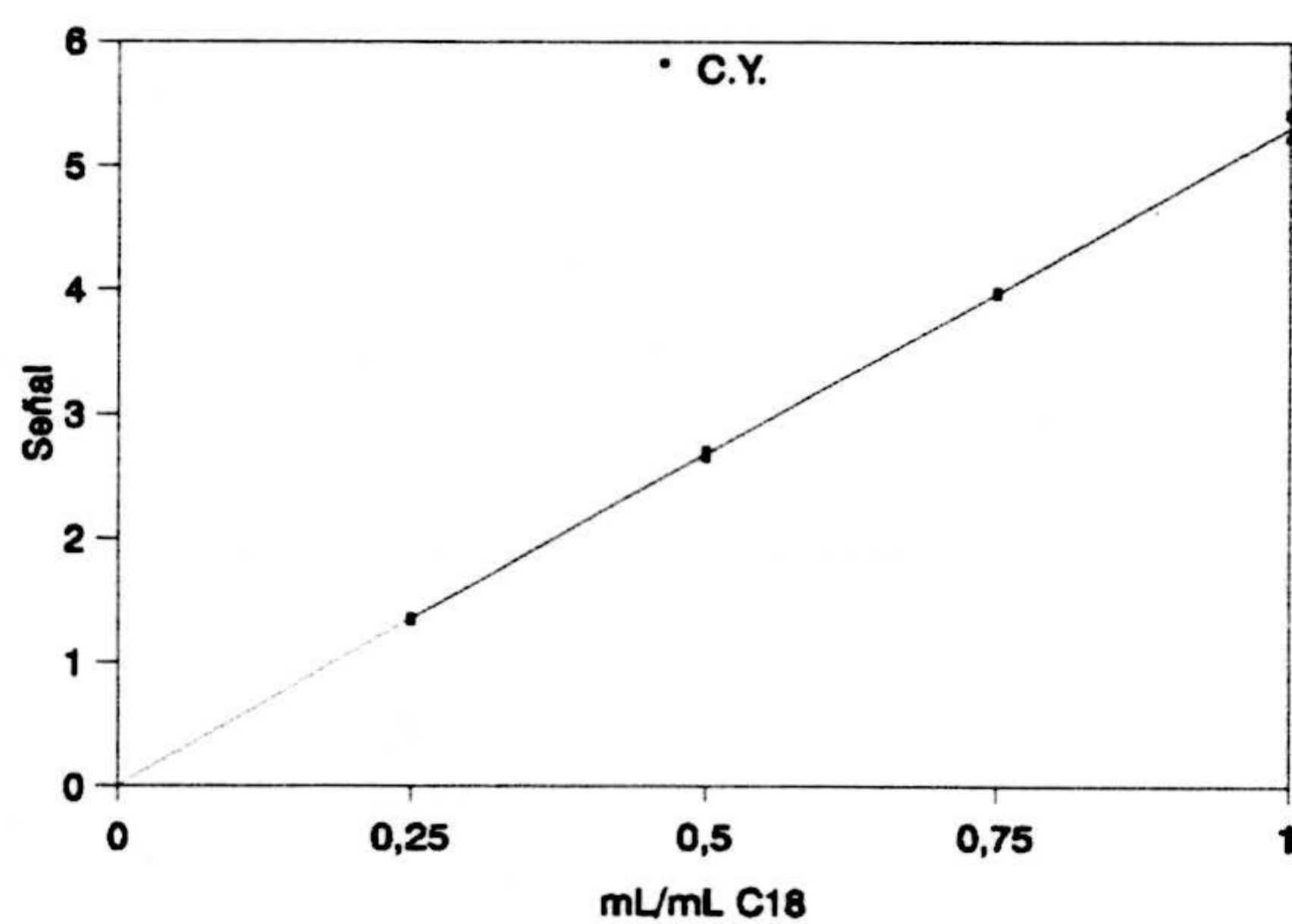
Figura IV.30.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18:1</sub>.

**Tabla IV.27.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido esteárico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0035	5.3540	0.0150
<b>b</b>	0.9616	0.9602	5.3173
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0731	0.0494	0.0563
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0665		
<b>t(b)</b>	0.2341 ( P = 82 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9612		
<b>a'</b>	0.0059	5.3494	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0091
<b>c<sub>x,S</sub></b>	5.5610	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	5.5500	-----
<b>t(c)</b>	0.4053 ( P = 68 %)		



**Figura IV.31.-** Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18</sub>.



**Figura IV.32.-** Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18</sub>.



**Tabla IV.28.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido aráquico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0014	0.0880	-0.0003
<b>b</b>	0.8295	0.8269	0.0859
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0065	0.0061	0.0010
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0064		
<b>t(b)</b>	0.4506 ( P = 66 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8286		
<b>a'</b>	-0.0009	0.0871	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0006
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.1090	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.1056	-----
<b>t(c)</b>	1.4050 ( P = 16 %)		

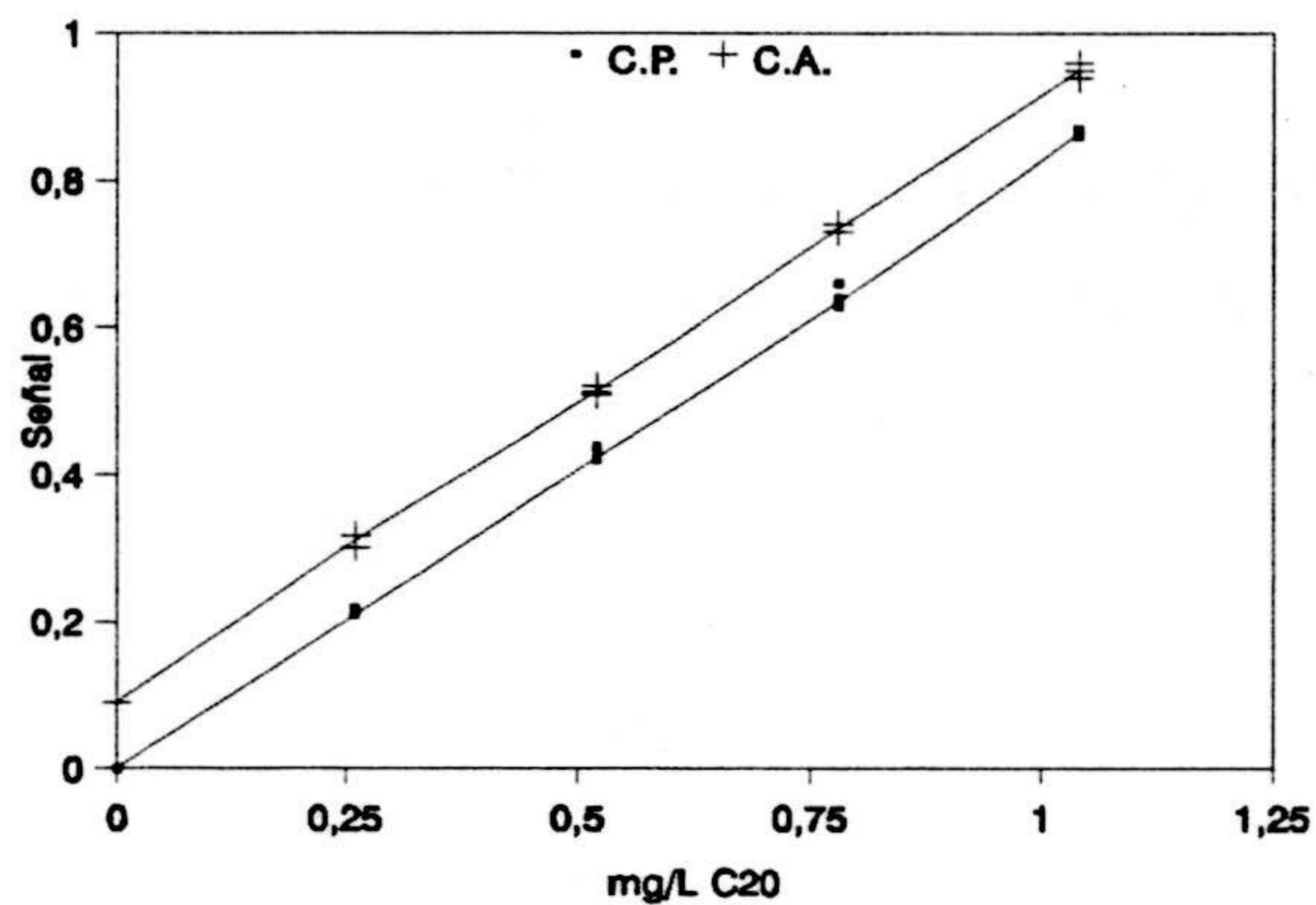


Figura IV.33.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>20</sub>.

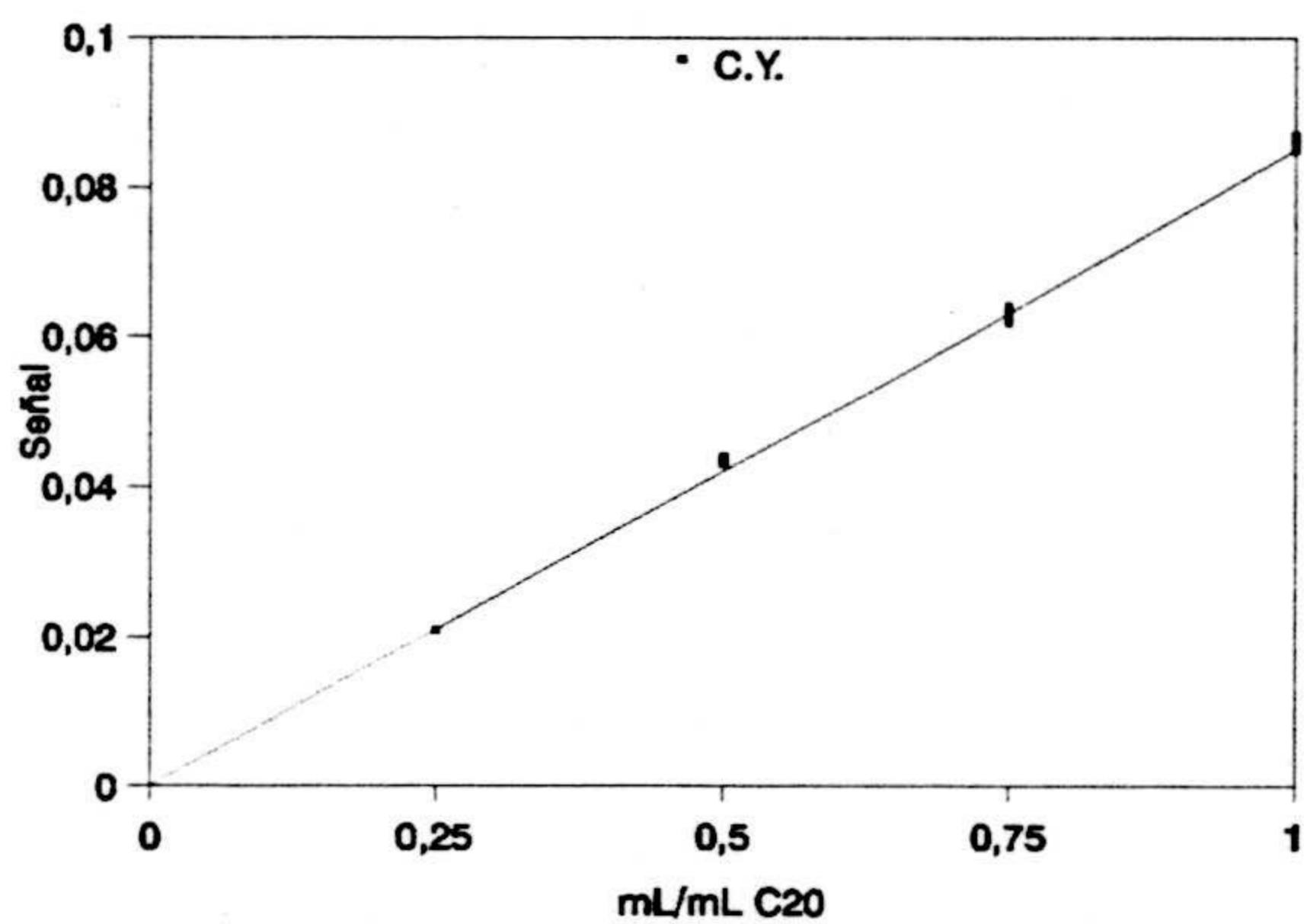


Figura IV.34.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>20</sub>.

### 2.1.2.5.- *Comentario de los resultados obtenidos.-*

2.1.2.5.1.- Comparación de pendientes. Se observó que en todos los casos obtenemos una conclusión no significativa, o sea al concluir por  $H_0$  ( $P > 10\%$ ) las pendientes son iguales. Se comprobó la existencia de una ordenada en el origen positiva por lo que la adición de patrón provoca un error sistemático constante.

2.1.2.5.2.- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a_S'$ .

2.1.2.5.3.- Comprobación de la exactitud del método analítico. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), o sea el método es exacto para todos los ácidos grasos con un nivel de significación mayor del 5%.

2.1.2.5.4.- Conclusión. El método queda validado para la extracción de los ácidos grasos presentes en los jabones de mano.

### 2.1.2.6.- Análisis de la muestra.

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de jabón de mano NIVEA. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se lleva directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis a una muestra de jabón de mano nivea NIVEA, las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla IV.29.

**Tabla IV.29.-** Contenido en ácidos grasos del jabón de mano NIVEA.

	[A] mg/g			[ $\bar{A}$ ] mg/g	$s_{[A]}$ mg/g	$\Delta[A]$ $t_{0.05,28}=2.048$	Ácidos grasos mg/g
	1	2	3				
C <sub>8</sub>	3.74	4.03	3.82	3.86	0.15	0.31	3.9±0.3
C <sub>10</sub>	3.30	3.65	3.59	3.51	0.19	0.39	3.5±0.4
C <sub>12</sub>	35.3	34.1	34.5	34.6	0.61	1.24	34.6±1.2
C <sub>14</sub>	30.5	31.1	31.7	31.1	0.60	1.23	31.1±1.2
C <sub>16</sub>	65.9	65.8	65.4	65.7	0.26	0.53	65.7±0.5
C <sub>18</sub>	54.9	55.4	54.8	55.0	0.32	0.66	55.0±0.7
C <sub>18:1</sub>	31.7	30.9	30.5	31.0	0.61	1.25	31.0±1.3
C <sub>20</sub>	1.07	1.02	0.99	1.02	0.04	0.08	1.02±0.04

### ***2.1.3.- Aplicación del método al jabón de mano TOJADERMO.***

Además del análisis de la muestra necesitamos realizar un calibrado de Youden para determinar si  $a_Y$  está incluida en el intervalo calculado para  $a_S'$ .

#### **2.1.3.1.- Calibrado de Youden.**

Se pesaron 5 mg de jabón TOJADERMO y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron volúmenes crecientes (25, 50, 75 y 100 mL) de ésta y se enrasaron a 100 mL con agua desionizada. Se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.30.

Tabla IV.30.- Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	1.03	0.068	2.04	0.142	3.14	0.211	4.06	0.275
	1.09	0.069	2.19	0.137	3.03	0.208	4.39	0.281
	1.04	0.070	2.04	0.141	2.99	0.206	4.27	0.287
C <sub>10</sub>	0.73	0.048	1.40	0.098	2.17	0.146	2.87	0.194
	0.75	0.047	1.49	0.093	2.11	0.145	3.02	0.193
	0.73	0.049	1.42	0.098	2.10	0.145	2.94	0.198
C <sub>12</sub>	6.65	0.441	13.0	0.902	19.5	1.307	25.5	1.724
	6.77	0.431	14.1	0.879	19.6	1.346	27.0	1.729
	6.53	0.440	12.8	0.889	19.0	1.308	26.9	1.813
C <sub>14</sub>	7.87	0.523	14.8	1.031	23.1	1.547	30.4	2.054
	7.98	0.507	16.9	1.055	22.4	1.537	32.0	2.050
	7.65	0.515	14.7	1.018	22.6	1.554	31.7	2.129
C <sub>16</sub>	16.9	1.122	32.4	2.255	51.3	3.440	65.7	4.439
	18.1	1.150	36.4	2.275	49.5	3.402	71.8	4.597
	16.8	1.129	32.5	2.249	50.3	3.461	67.7	4.550
C <sub>18</sub>	15.6	1.037	30.2	2.103	45.8	3.075	60.3	4.074
	16.2	1.027	32.1	2.011	44.8	3.075	64.2	4.109
	15.3	1.027	29.4	2.038	43.8	3.011	61.6	4.143

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.30.- Continuación.

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	7.78	0.517	15.3	1.068	24.6	1.653	32.1	2.168
	8.40	0.534	16.7	1.045	23.2	1.595	33.0	2.113
	8.05	0.542	15.1	1.043	23.3	1.600	30.4	2.043
C <sub>20</sub>	0.46	0.030	0.89	0.062	1.43	0.096	1.84	0.124
	0.50	0.032	1.01	0.063	1.36	0.094	1.95	0.125
	0.47	0.032	0.87	0.061	1.41	0.097	1.87	0.126
C <sub>13</sub>	15.1		14.4		14.9		14.8	
	15.7		16.0		14.6		15.6	
	14.9		14.4		14.5		14.9	

A, área analito (10<sup>4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

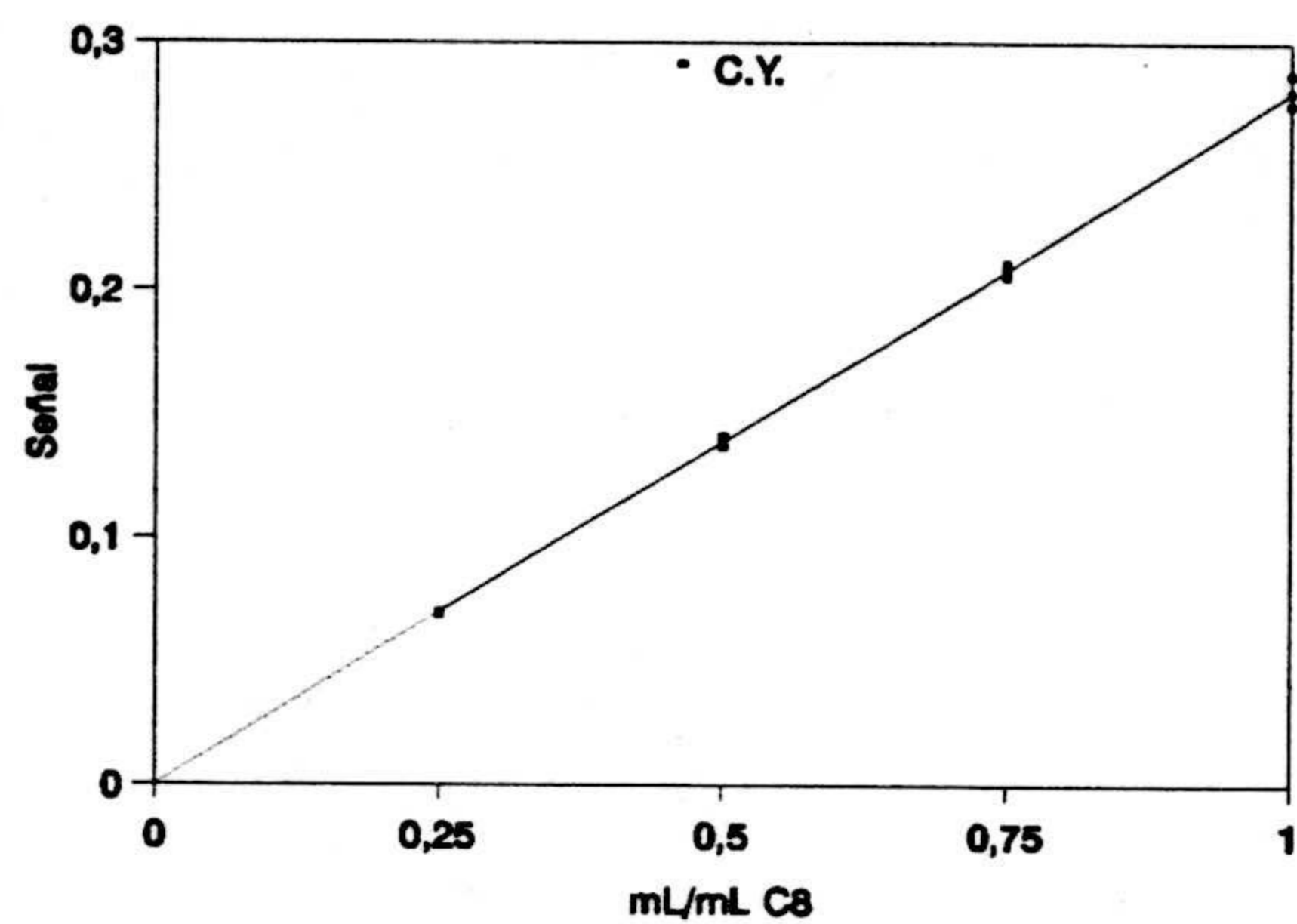


Figura IV.35.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>8</sub>.

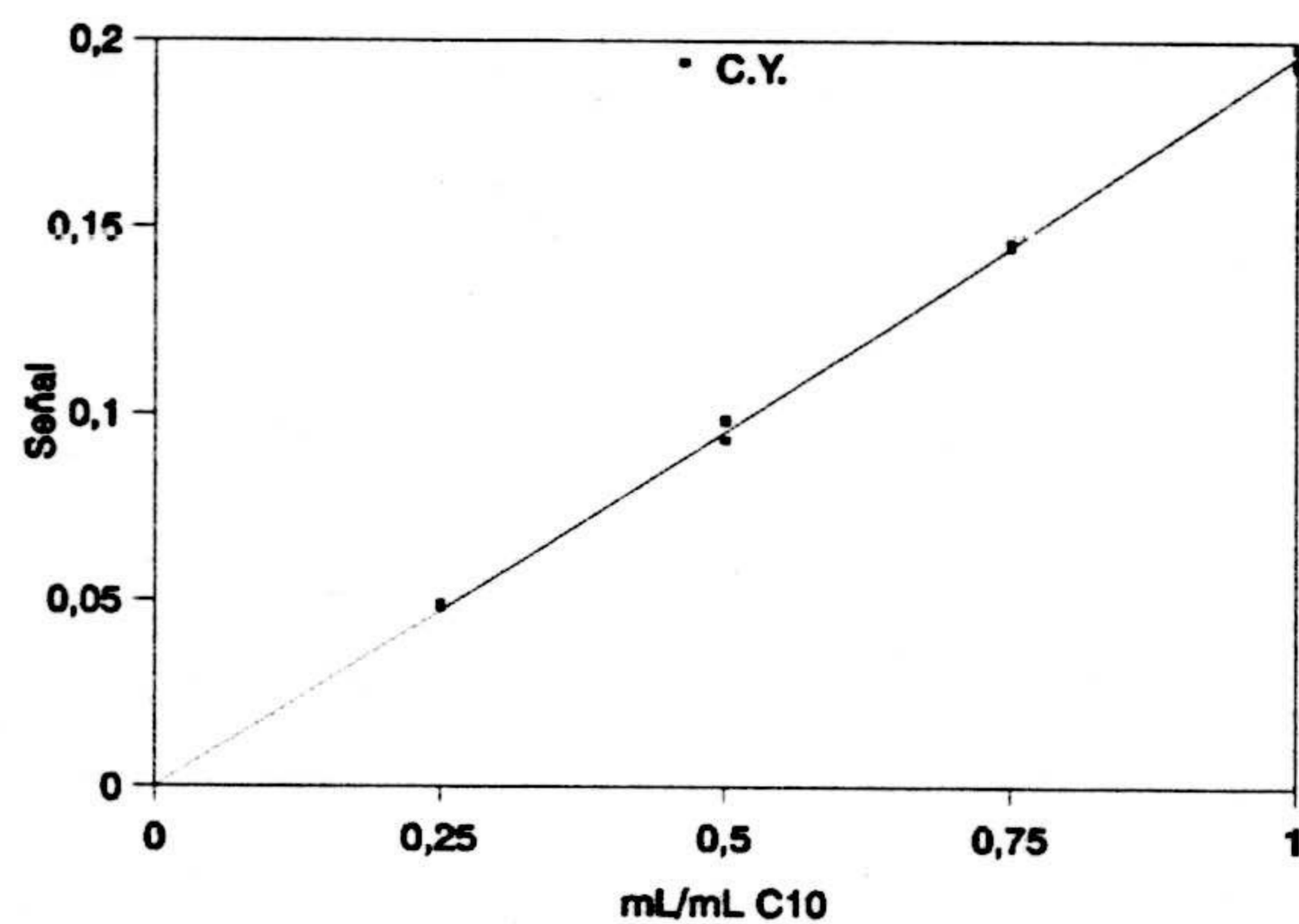


Figura IV.36.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>10</sub>.



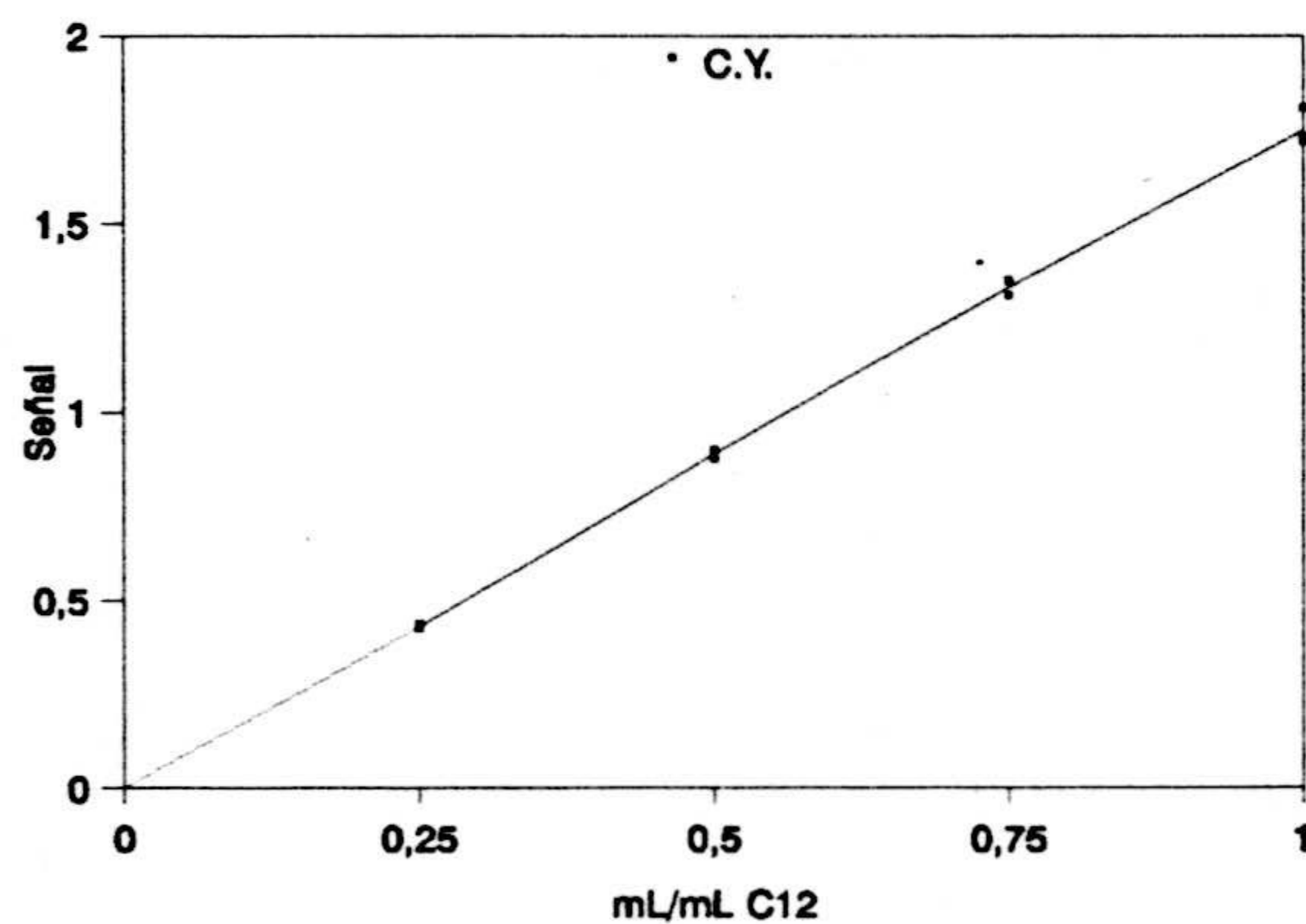


Figura IV.37.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>12</sub>.

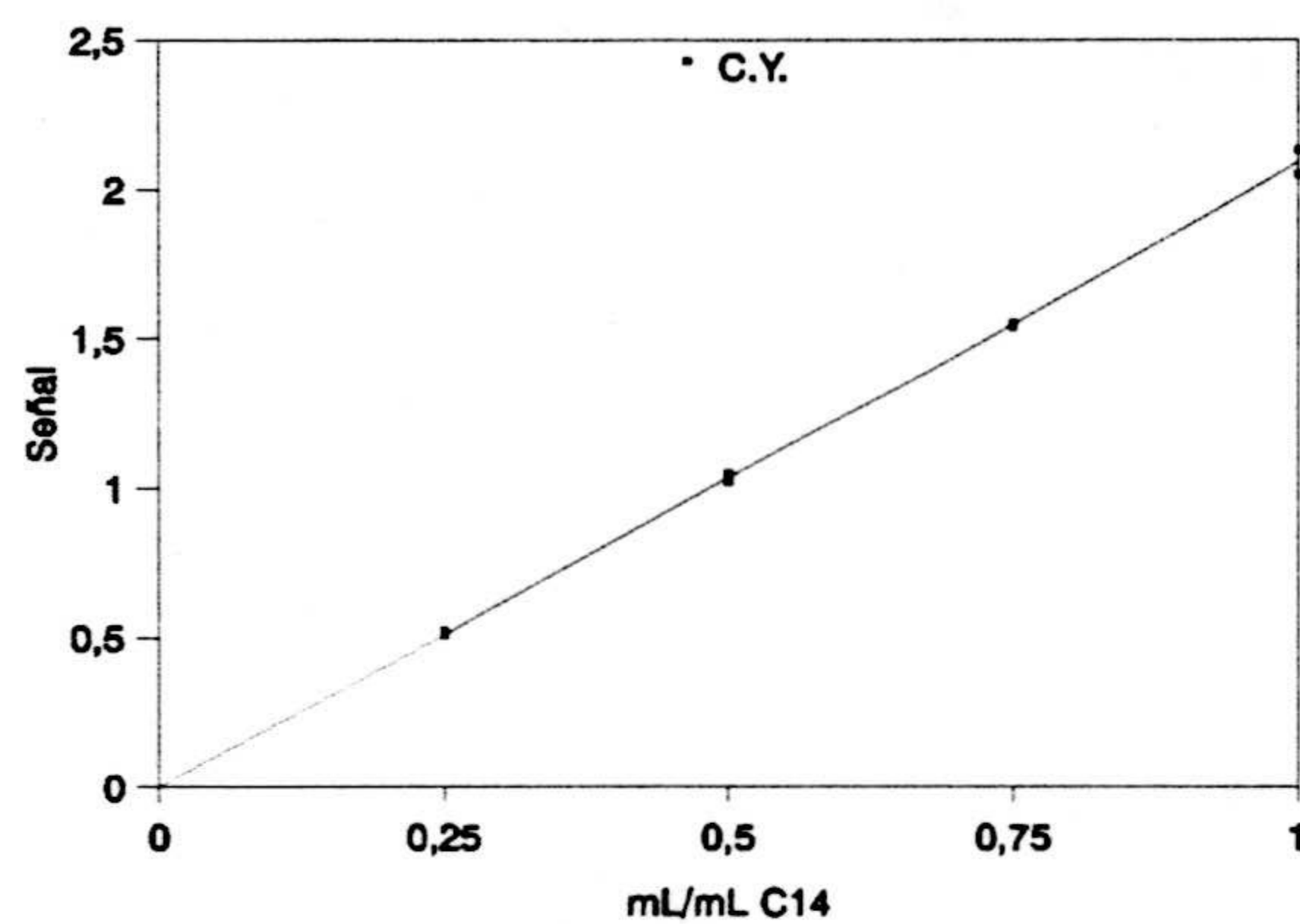


Figura IV.38.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>14</sub>.

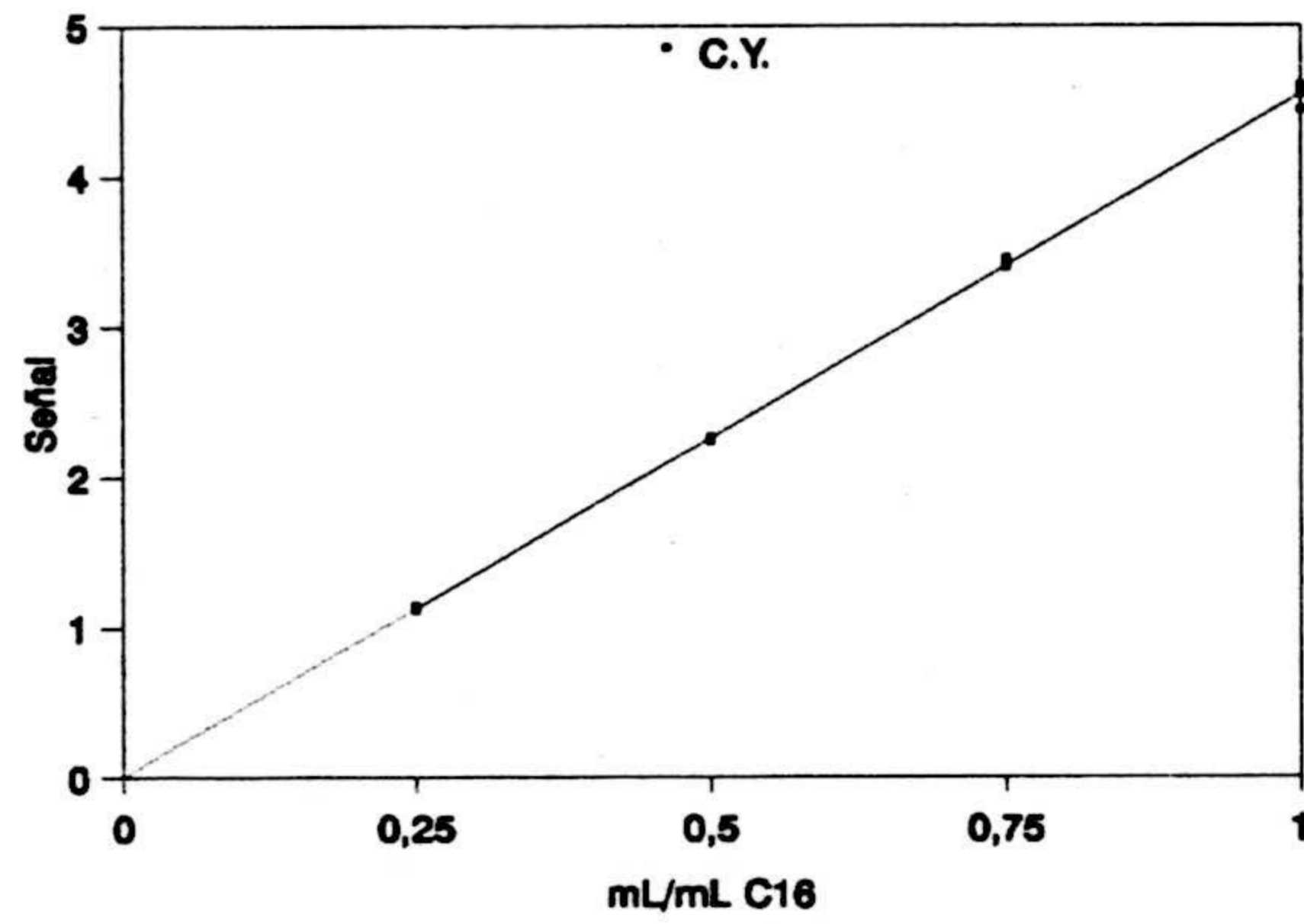


Figura IV.39.- Calibrado de youden para el éster C<sub>16</sub>.

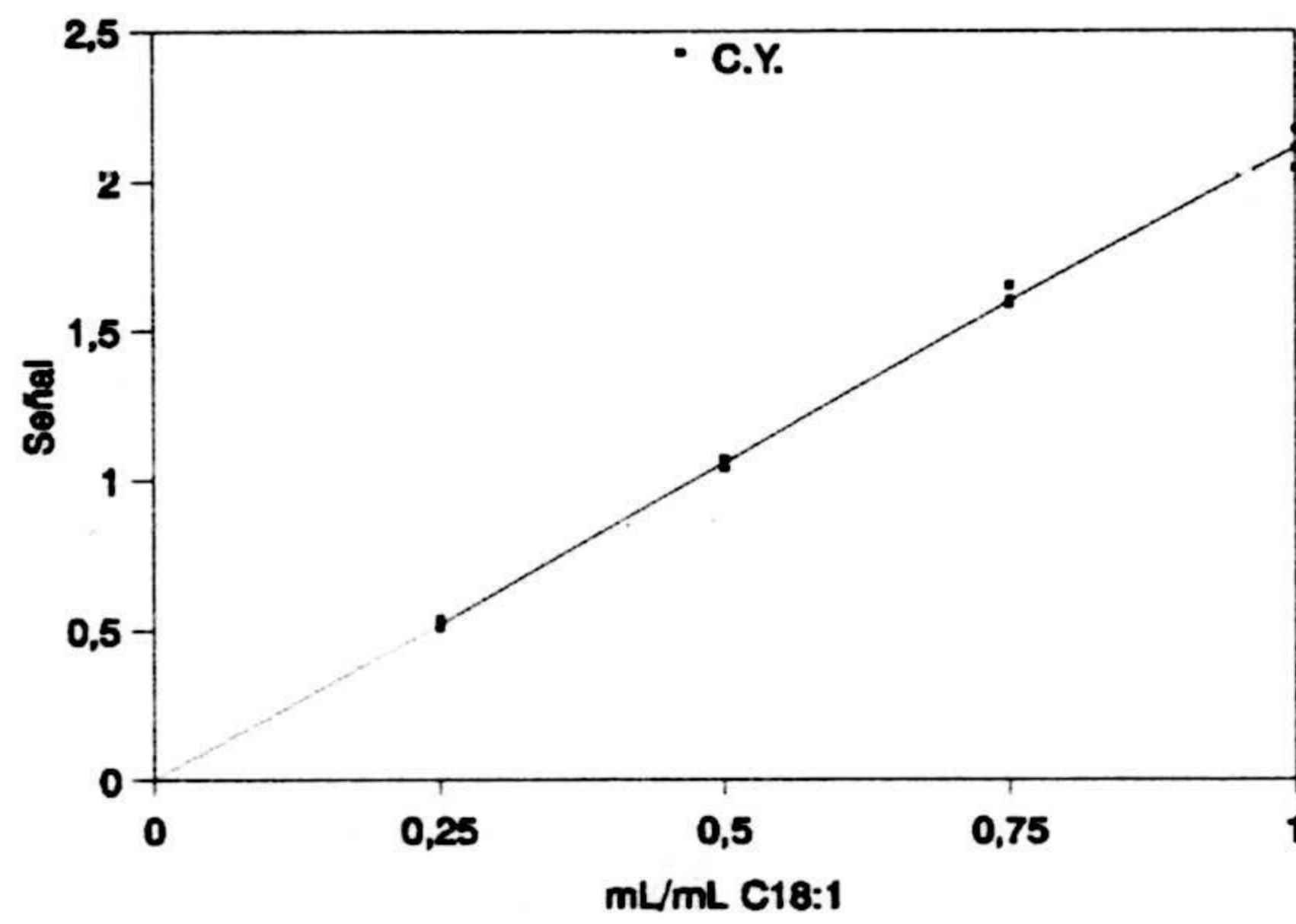


Figura IV.40.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18:1</sub>.

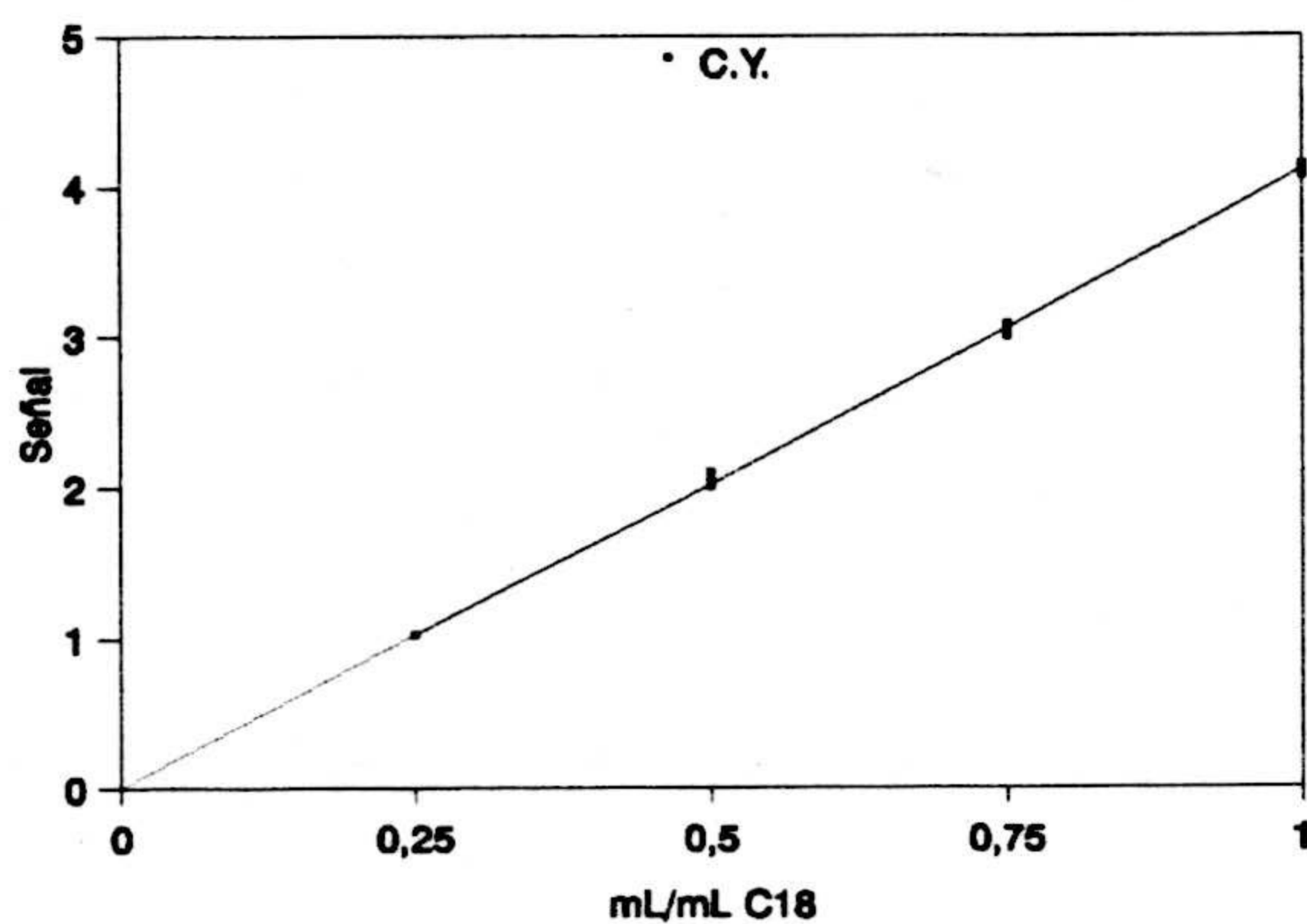


Figura IV.41.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18</sub>.

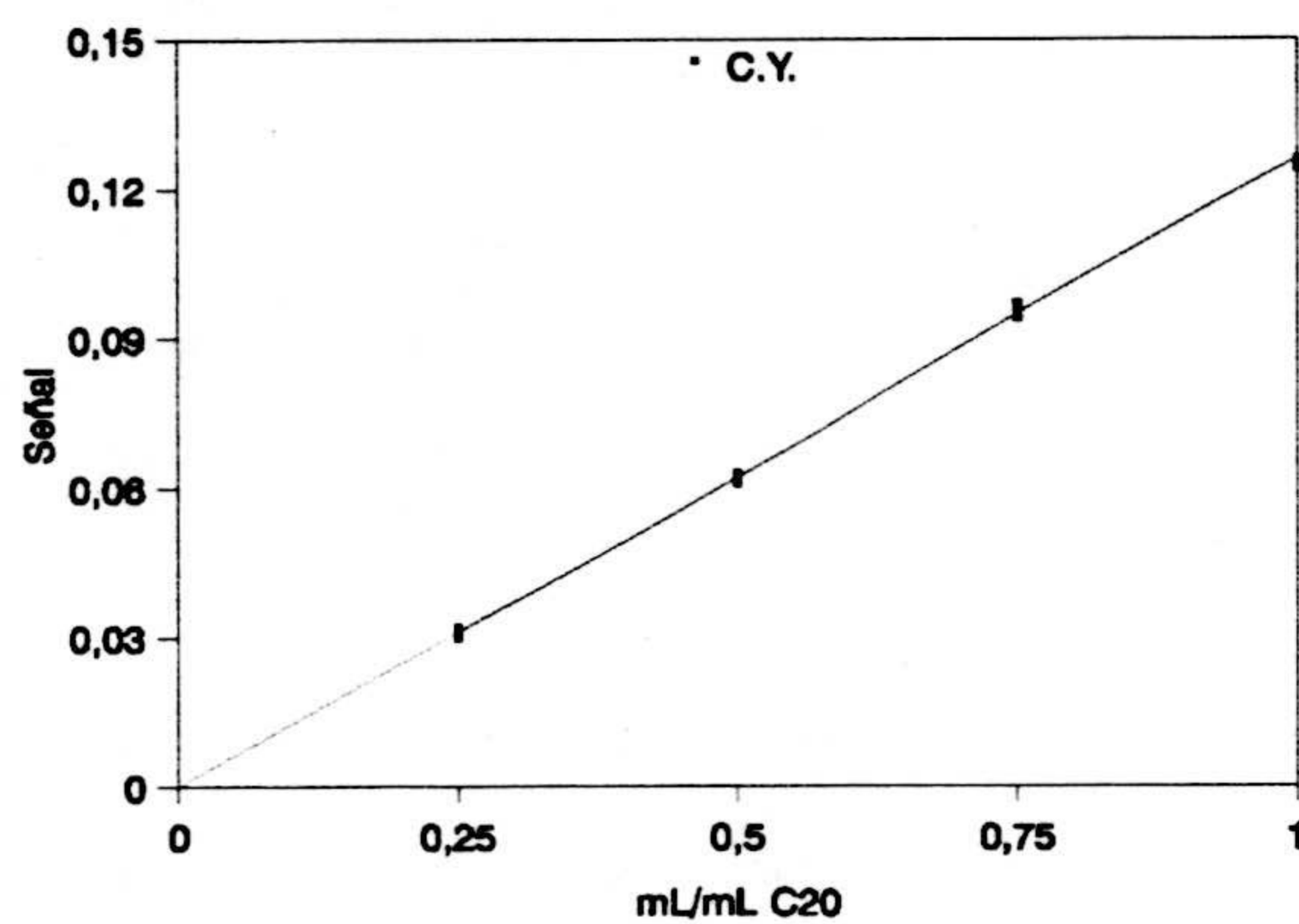


Figura IV.42.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>20</sub>.

En todos los casos  $a_y$  está incluida en el intervalo calculado para  $a_s'$ .

### 2.1.3.2.- Análisis de la muestra.

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de jabón de mano TOJADERMO. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se lleva directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis a una muestra de jabón de mano nivea TOJADERMO, las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla IV.31.

**Tabla IV.31.-** Contenido en ácidos grasos del jabón de mano TOJADERMO.

	[A] mg/g			[ $\bar{A}$ ] mg/g	$s_{[\bar{A}]}$ mg/g	$\Delta[A]$ $t_{0.05,28=2.048}$	Ácidos grasos mg/g
	1	2	3				
$C_8$	3.33	3.06	3.02	3.14	0.17	0.35	$3.1 \pm 0.2$
$C_{10}$	1.93	2.23	2.01	2.05	0.16	0.33	$2.0 \pm 0.2$
$C_{12}$	19.6	19.5	19.3	19.5	0.15	0.31	$19.5 \pm 0.3$
$C_{14}$	22.3	22.4	22.7	22.5	0.21	0.43	$22.5 \pm 0.4$
$C_{16}$	47.6	47.3	47.9	47.6	0.30	0.61	$47.6 \pm 0.6$
$C_{18}$	43.1	42.6	43.5	43.1	0.45	0.92	$43.1 \pm 0.9$
$C_{18:1}$	23.2	22.7	23.2	23.0	0.29	0.59	$23.0 \pm 0.6$
$C_{20}$	1.48	1.50	1.52	1.50	0.02	0.04	$1.50 \pm 0.04$

## **2.2.- Aplicación a polvos de acción intensa.**

De entre todas las existentes en el mercado se seleccionaron las formulaciones ofrecidas por las marcas comerciales MICOLOR y LEL.

### ***2.2.1.- Establecimiento del método de extracción de ácidos grasos en los polvos de acción intensa.***

Para extraer los ácidos grasos de los polvos de acción intensa se siguió el mismo proceso de extracción aplicado al agua de potable descrito en la página... Para ello se tomó 10 mg de formulación pulverizada adecuadamente y se le agregaron 100 mL de agua desionizada fijando el pH a un valor de 1 antes de proceder a la disolución por agitación. Al finalizar este proceso se le agregan 5 mL de diclorometano a la muestra ya tratada. La muestra se introdujo en un embudo de decantación de 250 mL y se agitó durante un minuto. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico anhidro y se sometió al procedimiento de esterificación descrito en la página 125, procediéndose posteriormente a la inyección del extracto esterificado en el cromatógrafo.

### ***2.2.2.- Validación del método extracción de los ácidos grasos presentes en polvos de acción intensa.***

Para la validación de la extracción de ácidos grasos en polvos de acción intensa se aplicó el protocolo estadístico basado en la metodología del método de adición de patrón. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, una adición de patrón y otra con porciones crecientes de muestra.

Para desarrollar esta metodología se realizaron las experiencias que se describen a continuación:

#### ***2.3.2.1.- Calibrado con patrones.-***

En el anterior capítulo se desarrolló este calibrado para todos los ácidos grasos, obteniéndose sus correspondientes parámetros estadísticos, así como sus parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón se empleó la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y la desviación estandar de la regresión  $S_{R,C}$ . Estos valores quedan indicados en la correspondiente tabla de validación para cada ácido graso.

#### **2.2.2.2.- Calibrado con adición de patrón.-**

Para establecer este calibrado se realizó la siguiente experiencia. Se pesaron 50 mg de formulación MICOLOR y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron cinco alícuotas de 100 mL de ésta, a las cuales se les añadieron volúmenes crecientes de disolución patrón de los ácidos grasos, para obtener unas concentraciones finales de 0.000, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.100  $\mu\text{g. L}^{-1}$  de ácidos grasos individuales añadidos a la muestra. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168.

No son necesarias las réplicas del método, pero se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.32.

### **2.2.2.3- Calibrado de Youden.-**

Se pesaron 50 mg de formulación MICOLOR y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron volúmenes crecientes (25, 50, 75 y 100 mL) de ésta y se enrasaron a 100 mL con agua desionizada. Se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.33.

### **2.2.2.4.- Comprobación de la exactitud del método.-**

Para verificar la exactitud del método hay que hacer el mismo desarrollo que se empleó en el caso del agua potable.

A continuación se presentan tabulados los valores obtenidos al aplicar este desarrollo a cada ácido graso.



**Tabla IV.32.-** Señales obtenidas en el calibrado por adición de patrón (CA).

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	1	0.063	7	0.443	12	0.829	18	1.19	24	1.62
	1	0.062	6	0.451	13	0.833	19	1.22	23	1.60
	1	0.063	7	0.455	13	0.831	18	1.22	23	1.57
C <sub>10</sub>	1	0.036	5	0.294	8	0.543	12	0.80	16	1.05
	1	0.035	4	0.290	8	0.537	12	0.80	15	1.04
	1	0.036	4	0.293	8	0.542	11	0.80	16	1.05
C <sub>12</sub> (*)	6	0.380	10	0.624	13	0.858	17	1.11	20	1.32
	6	0.379	9	0.620	13	0.861	17	1.10	20	1.35
	6	0.380	9	0.621	13	0.851	16	1.10	20	1.33

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.32.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub> (*)	10	0.647	14	0.872	16	1.103	20	1.34	23	1.56
	9	0.646	13	0.879	17	1.106	20	1.33	22	1.55
	10	0.647	13	0.870	17	1.106	20	1.33	23	1.56
C <sub>16</sub> (*)	59	3.860	96	6.136	122	8.342	162	10.7	191	12.7
	60	3.859	90	6.087	127	8.482	162	10.6	189	12.9
	57	3.860	93	6.153	125	8.345	155	10.5	192	12.8
C <sub>18</sub>	42	5.359	81	7.744	109	10.05	149	12.5	185	14.9
	44	5.360	77	7.753	113	10.14	147	12.4	180	15.0
	41	5.355	78	7.772	114	10.09	147	12.5	184	14.8
C <sub>18:1</sub> (*)	5	0.360	11	0.697	15	1.033	21	1.37	26	1.74
	6	0.359	10	0.690	15	1.032	21	1.39	25	1.72
	5	0.360	11	0.710	15	1.020	20	1.40	26	1.71
C <sub>20</sub>	0.7	0.048	4.1	0.267	7.1	0.482	11	0.70	14	0.90
	0.7	0.047	3.9	0.264	7.0	0.468	10	0.68	13	0.91
	0.7	0.048	4.0	0.265	7.3	0.487	10	0.68	14	0.91

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.32- Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>4</sup> )				
C <sub>13</sub>	15.2	15.6	14.6	15.2	15.0
	15.6	14.7	15.0	15.3	14.7
	14.9	15.1	15.0	14.8	15.0

Tabla IV.33.- Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	0.22	0.015	0.50	0.032	0.71	0.047	0.94	0.062
	0.25	0.016	0.47	0.031	0.75	0.050	0.93	0.061
	0.23	0.015	0.48	0.031	0.66	0.046	0.93	0.062
C <sub>10</sub>	0.14	0.010	0.29	0.019	0.44	0.029	0.59	0.039
	0.15	0.010	0.29	0.019	0.44	0.029	0.59	0.039
	0.14	0.010	0.29	0.019	0.42	0.028	0.56	0.038
C <sub>12</sub>	1.36	0.094	3.02	0.189	4.34	0.287	5.79	0.380
	1.49	0.096	2.89	0.192	4.33	0.290	5.75	0.378
	1.41	0.096	2.94	0.194	4.14	0.286	5.63	0.375
C <sub>14</sub>	2.31	0.159	5.11	0.328	7.42	0.492	9.71	0.638
	2.46	0.158	5.09	0.333	7.14	0.478	9.79	0.644
	2.34	0.159	4.82	0.314	7.07	0.488	9.92	0.661
C <sub>16</sub>	13.8	0.952	30.1	1.935	43.2	2.862	59.3	3.899
	15.0	0.966	29.5	1.926	42.8	2.868	58.7	3.863
	14.4	0.981	29.6	1.927	42.8	2.959	58.9	3.928
C <sub>18</sub>	10.2	0.705	21.9	1.409	31.1	2.058	41.7	2.739
	10.7	0.692	20.9	1.365	30.8	2.060	43.5	2.863
	10.6	0.718	21.5	1.399	30.3	2.096	42.5	2.832

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.33.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	1.31	0.090	2.70	0.174	3.90	0.258	5.57	0.366
	1.41	0.091	2.74	0.179	4.00	0.268	5.42	0.356
	1.32	0.089	2.65	0.173	3.79	0.262	5.43	0.362
C <sub>20</sub>	0.18	0.013	0.38	0.024	0.57	0.038	0.75	0.049
	0.20	0.013	0.38	0.025	0.55	0.037	0.75	0.050
	0.18	0.012	0.38	0.025	0.54	0.037	0.76	0.051
					64			
C <sub>13</sub>	14.5		15.6		15.1		15.2	
	15.5		15.3		14.9		15.2	
	14.7		15.3		14.5		15.0	

A, área analito (10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

**Tabla IV.34.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido caprílico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0004	0.0645	0.0014
<b>b</b>	0.8991	0.8943	0.0607
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0056	0.0123	0.0013
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0085		
<b>t(b)</b>	1.1818 ( P = 24 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8978		
<b>a'</b>	0.0025	0.0615	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0011
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.0686	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.0669	-----
<b>t(c)</b>	0.5647 ( P = 58 %)		

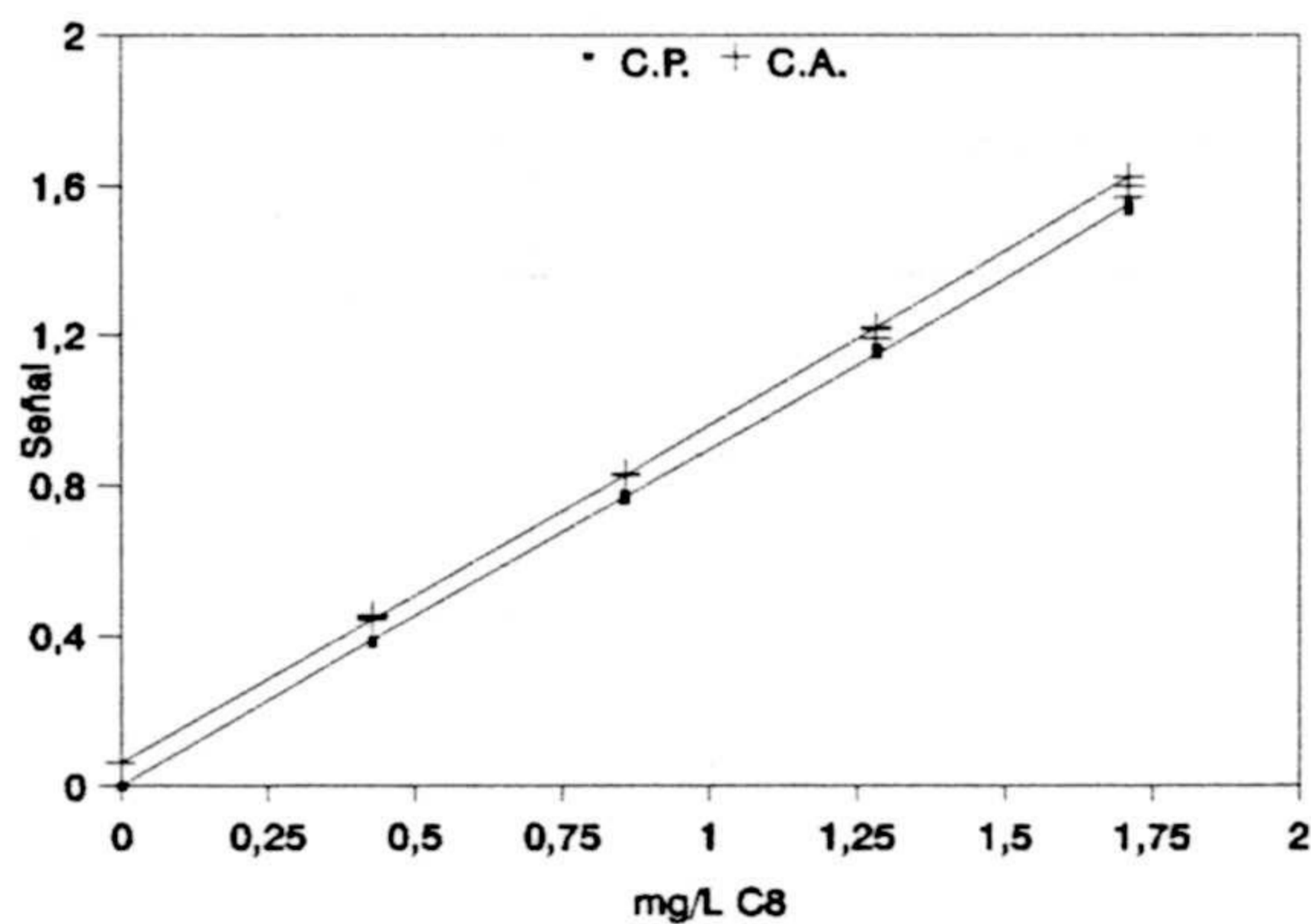


Figura IV.43.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>8</sub>.

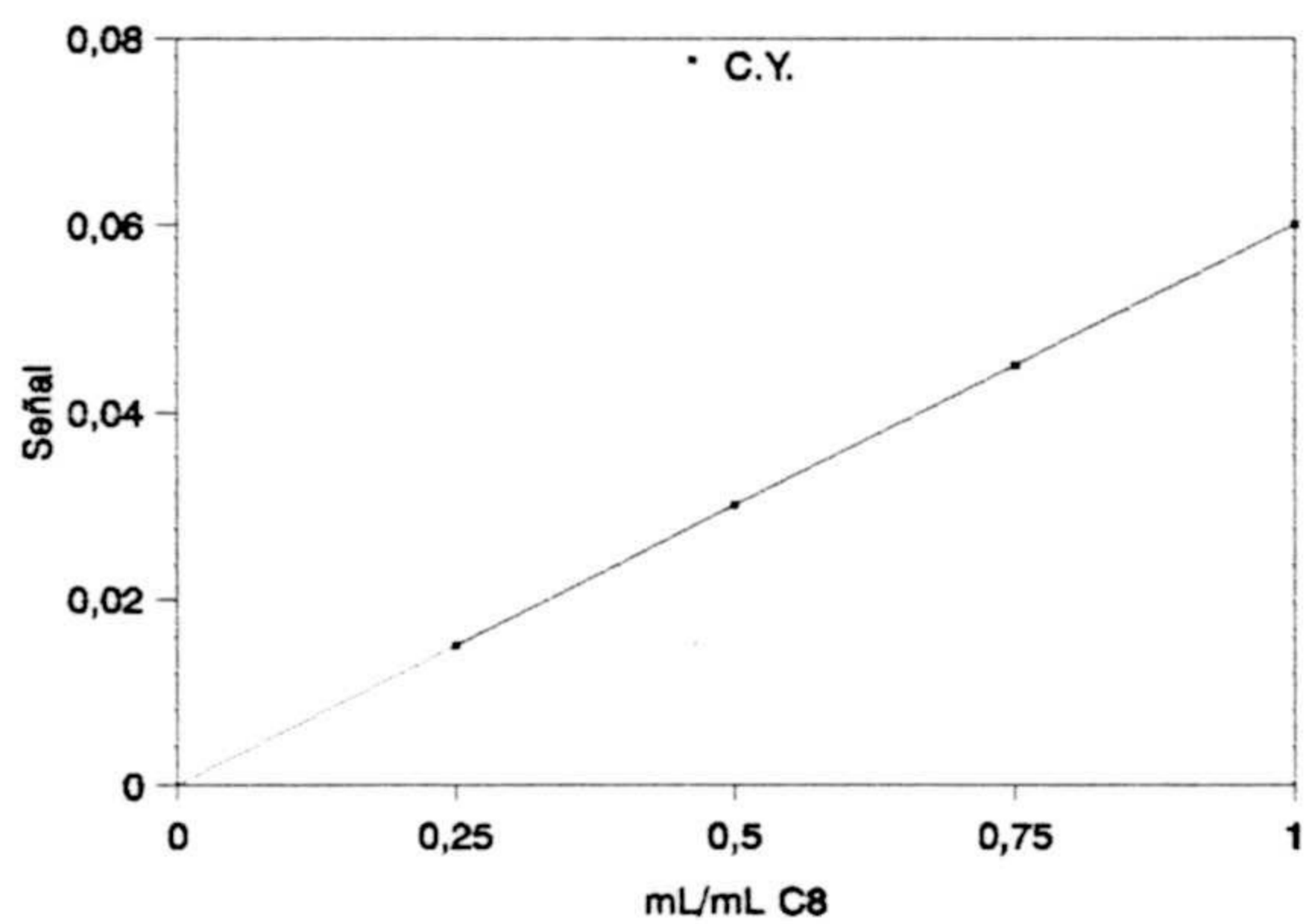


Figura IV.44.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>8</sub>.

**Tabla IV.35.** Valores numéricos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido cáprico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	0.0380	0.0025
<b>b</b>	0.9646	0.9594	0.0353
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0076	0.0050	0.0005
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0069		
<b>t(b)</b>	0.8400 ( P = 40 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9627		
<b>a'</b>	-0.0011	0.0363	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0036
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.0390	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.0351	-----
<b>t(c)</b>	1.7038 ( P = 10 %)		



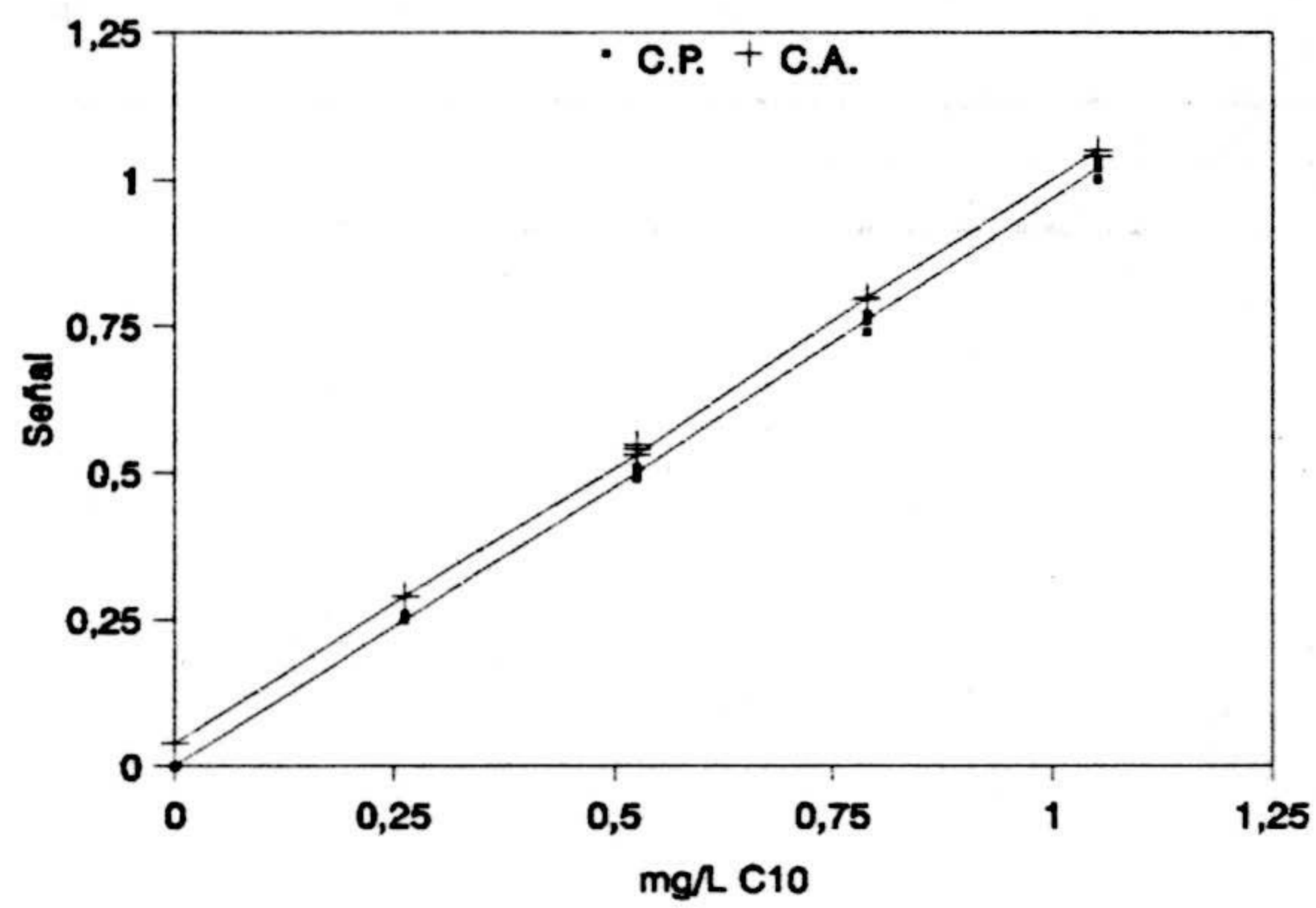


Figura IV.45.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>10</sub>.

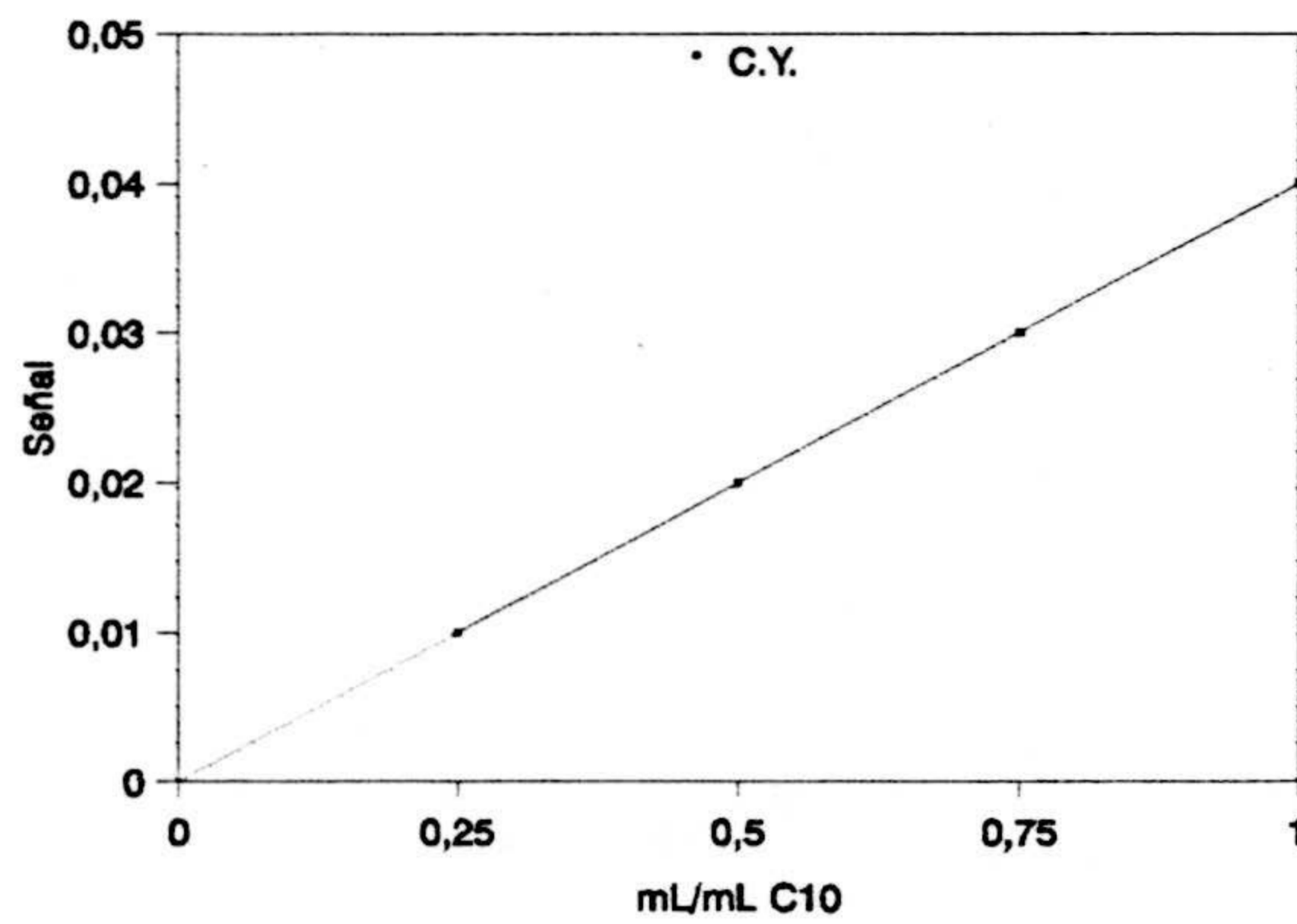


Figura IV.46.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>10</sub>.

**Tabla IV.35.-** Valores numéricos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido láurico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0008	0.3811	0.0023
<b>b</b>	0.9547	0.9471	0.3772
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0060	0.0087	0.0027
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0070		
<b>t(b)</b>	1.2323 ( P = 22 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9522		
<b>a'</b>	0.0005	0.3786	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0019
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.3966	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.3951	-----
<b>t(c)</b>	0.5728 ( P = 58 %)		

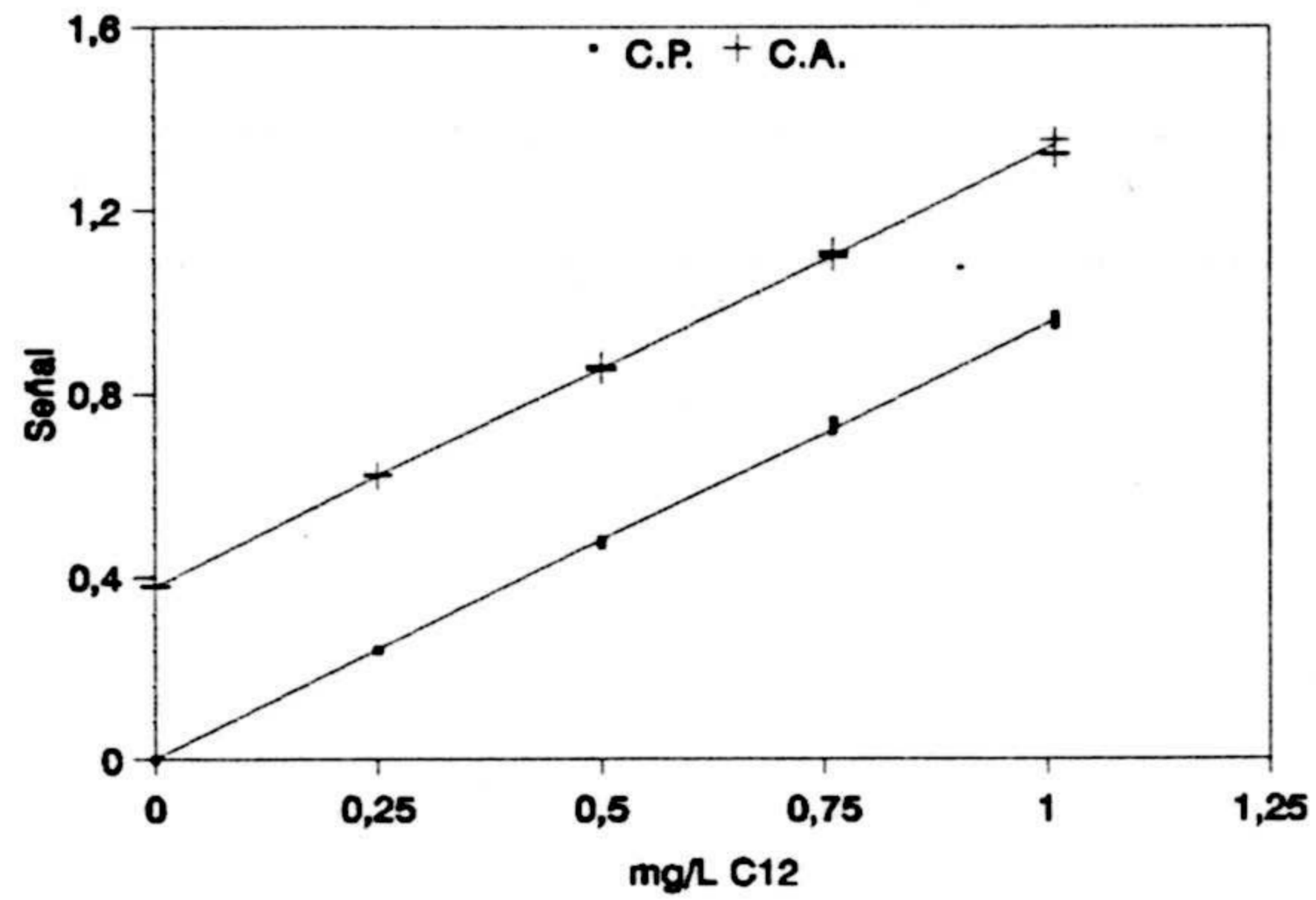


Figura IV.47.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>12</sub>.

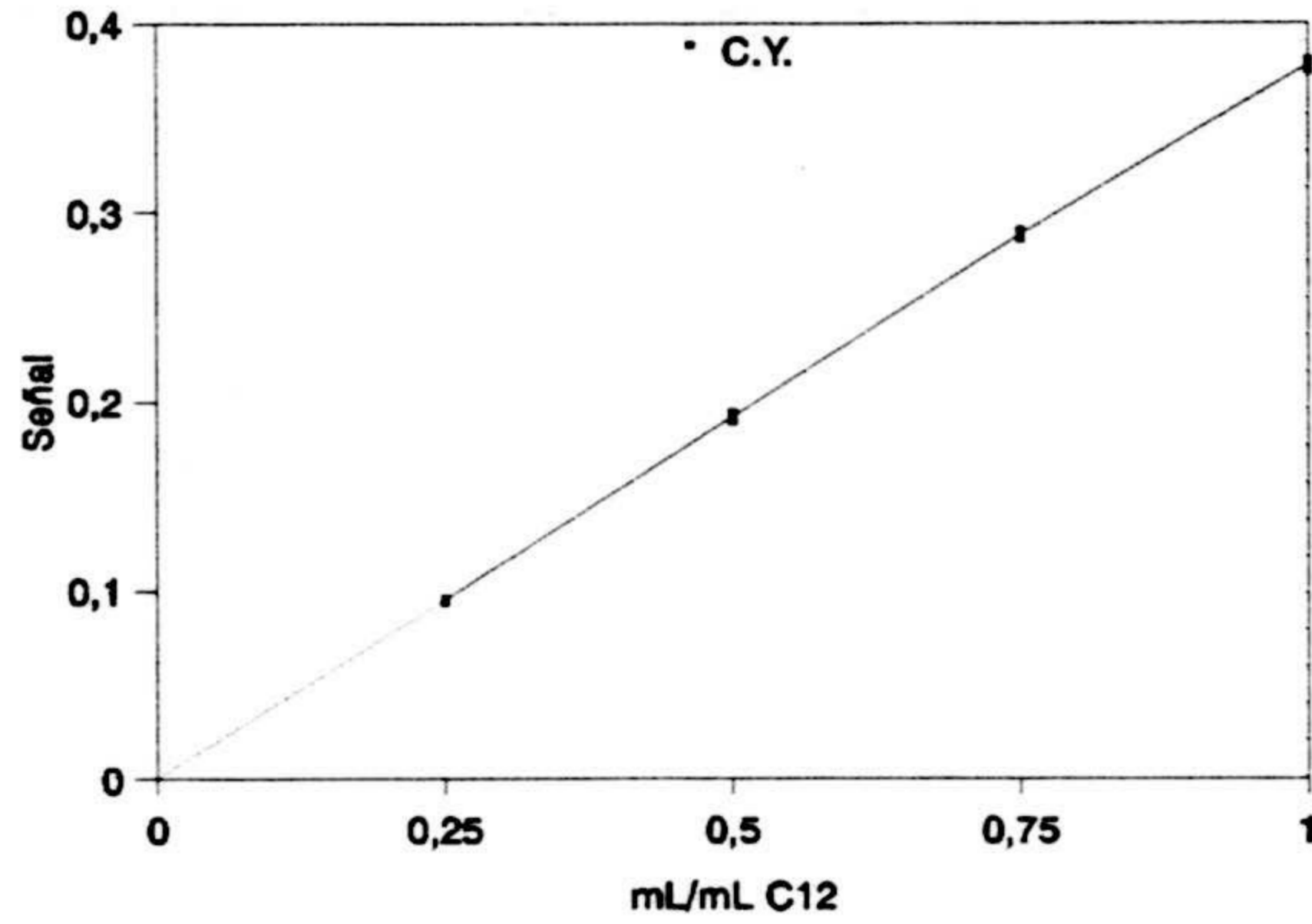


Figura IV.48.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>12</sub>.

**Tabla IV.36.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido mirístico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0013	0.6471	-0.0028
<b>b</b>	0.9259	0.9199	0.6513
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0081	0.0041	0.0077
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0071		
<b>t(b)</b>	0.9356 ( P = 36 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9239		
<b>a'</b>	-0.0003	0.6451	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0025
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.7034	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.7013	-----
<b>t(c)</b>	0.6213 ( P = 54 %)		

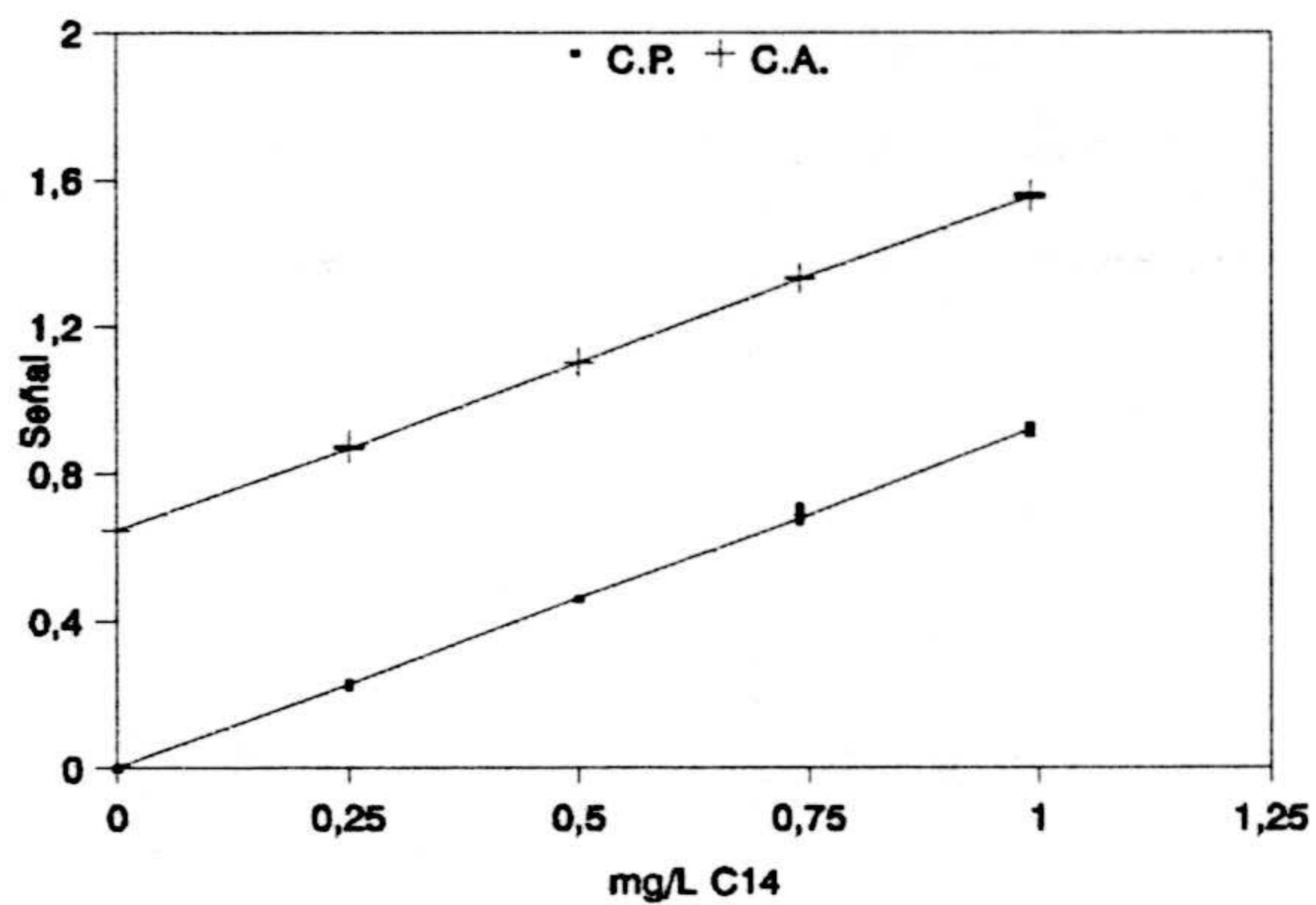


Figura IV.49.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>14</sub>.

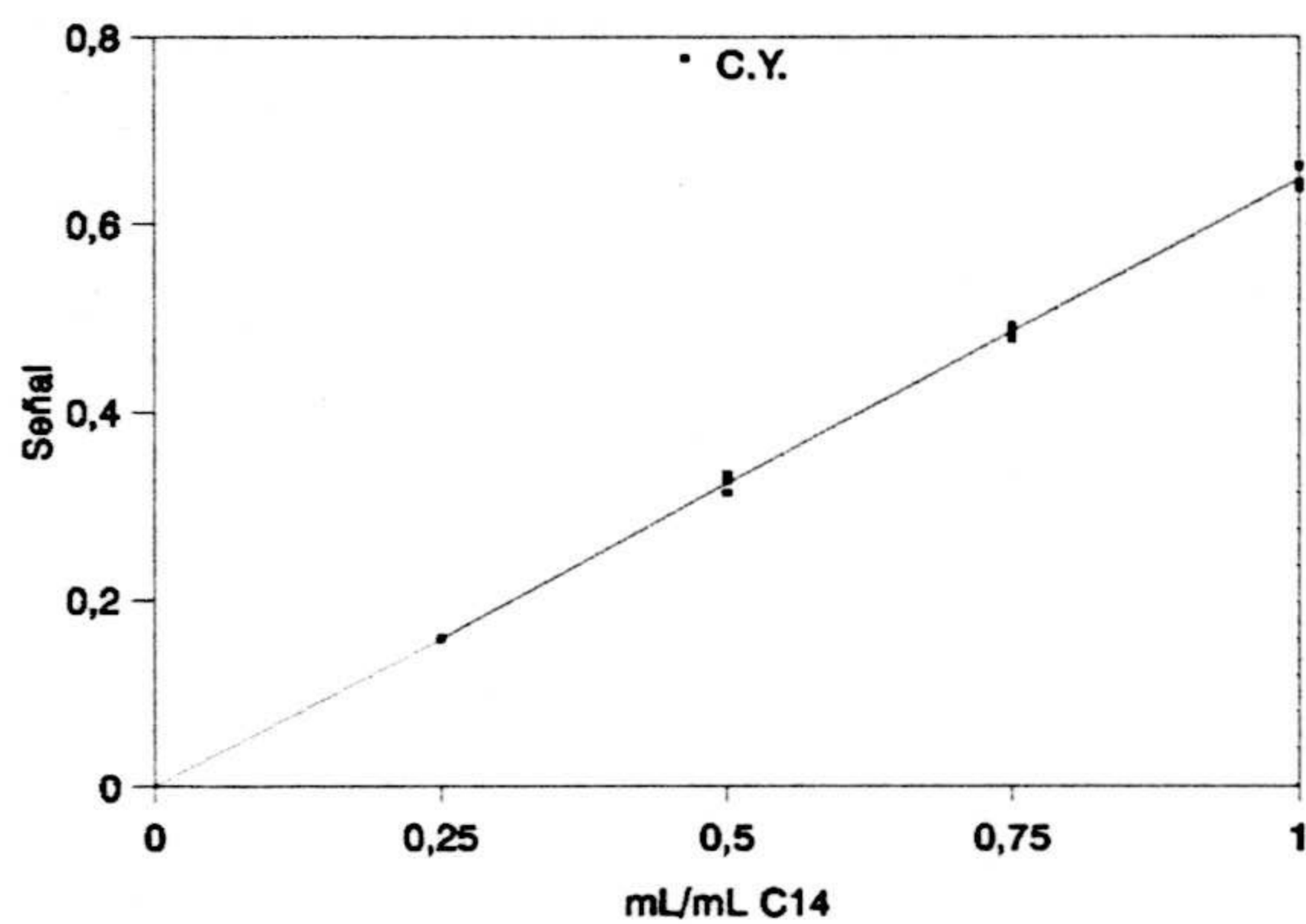


Figura IV.50.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>14</sub>.

**Tabla IV.37.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido palmítico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	3.8740	-0.0183
<b>b</b>	0.9425	0.9343	3.9040
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0619	0.0704	0.0321
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0647		
<b>t(b)</b>	1.3635 ( P = 18 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9398		
<b>a'</b>	0.0111	3.8477	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0294
<b>c<sub>x,S</sub></b>	4.1268	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	4.1137	-----
<b>t(c)</b>	0.5233 ( P = 60 %)		

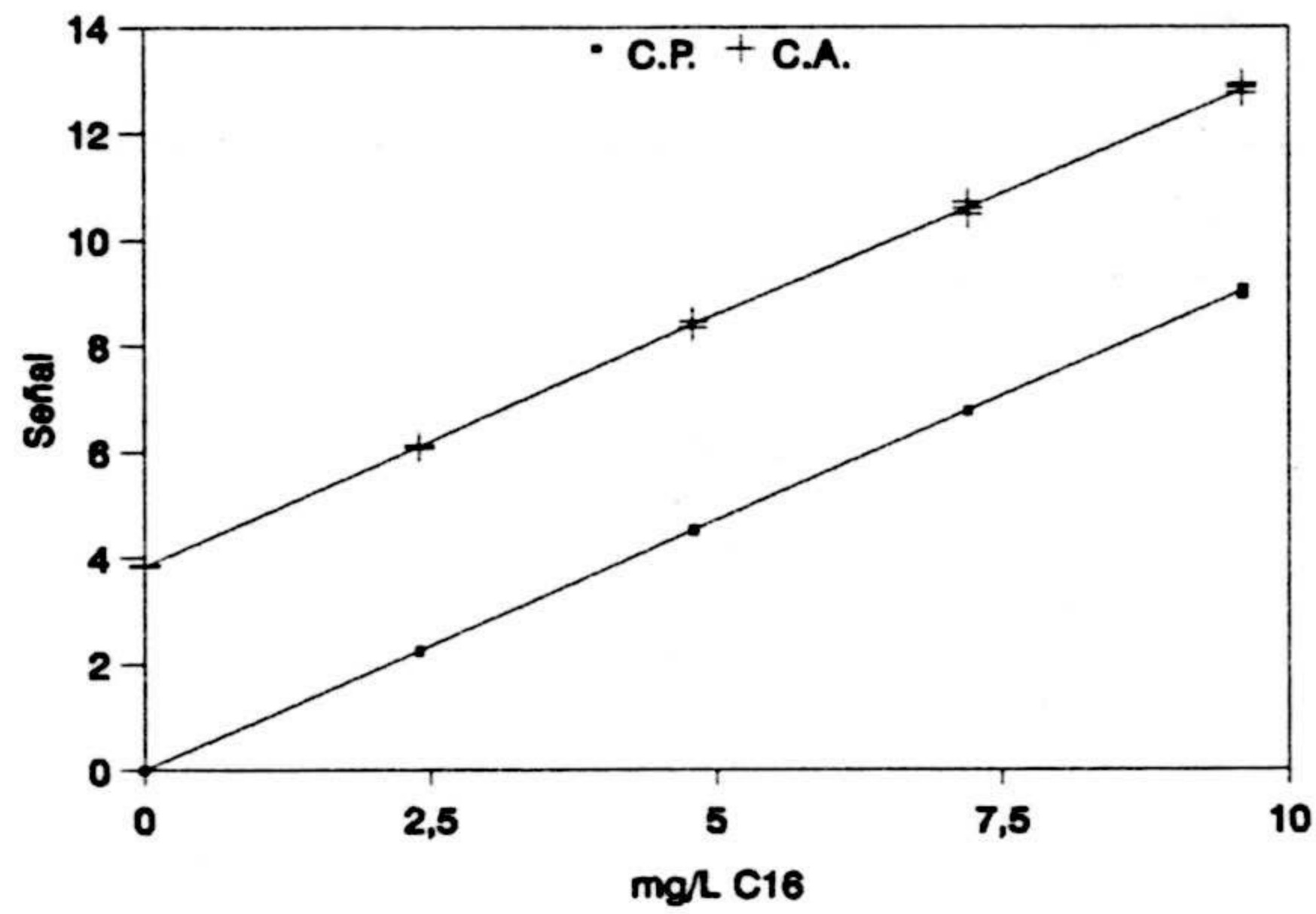


Figura IV.51.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>16</sub>.

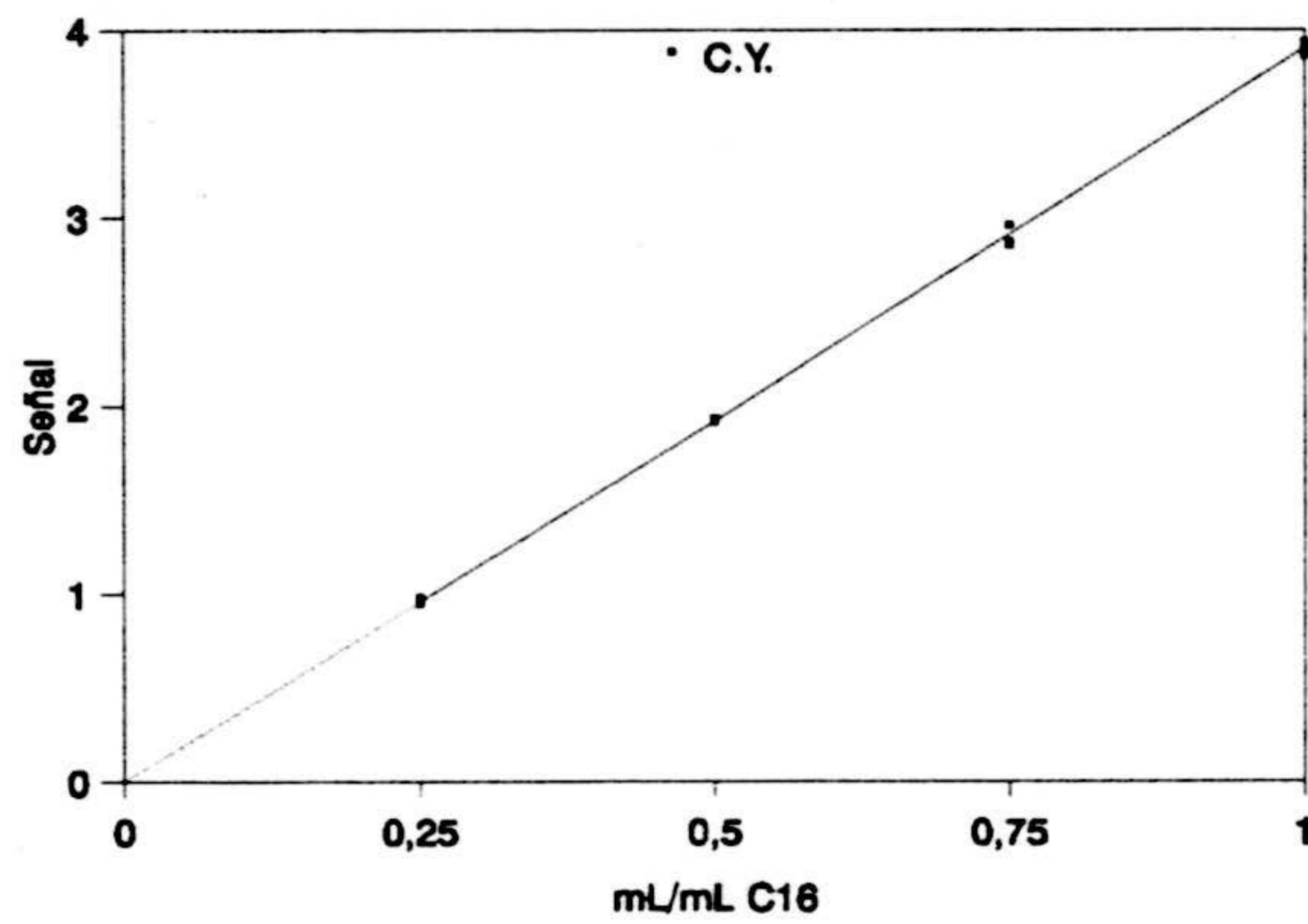


Figura IV.52.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>16</sub>.

**Tabla IV.38.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido oléico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0022	0.3546	-0.0033
<b>b</b>	0.8959	0.9047	0.3609
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0090	0.0105	0.0051
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0095		
<b>t(b)</b>	1.5714 ( P = 12 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8988		
<b>a'</b>	0.0000	0.3590	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0033
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.4042	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.4032	-----
<b>t(c)</b>	0.2996 ( P = 76 %)		



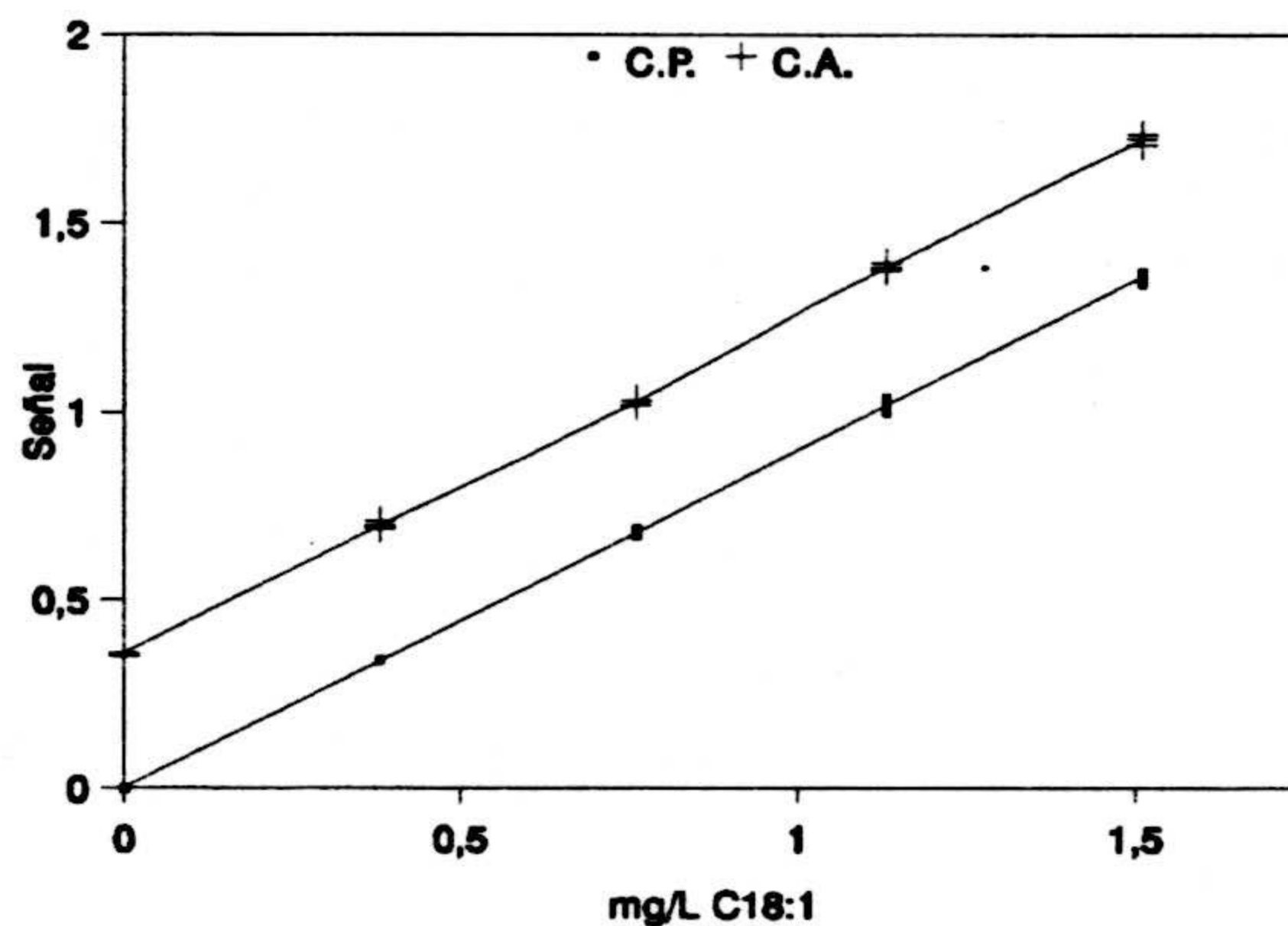


Figura IV.53.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>18:1</sub>.

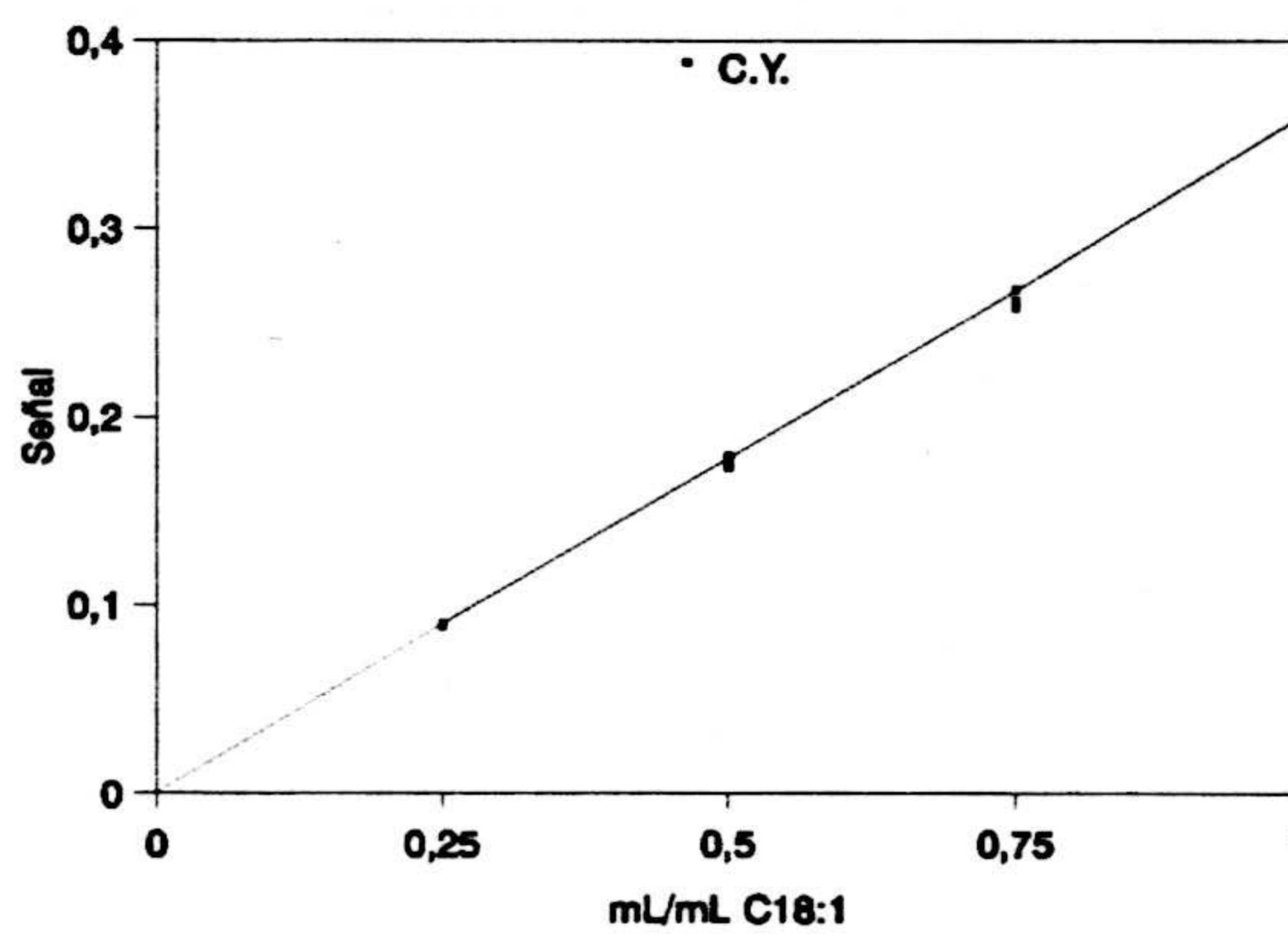


Figura IV.54.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>18:1</sub>.

**Tabla IV.39.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido esteárico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0035	2.7933	0.0000
<b>b</b>	0.9616	0.9528	2.7920
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0731	0.0976	0.0372
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0817		
<b>t(b)</b>	1.1943 ( P = 24 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9587		
<b>a'</b>	0.0181	2.7642	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0181
<b>c<sub>x,S</sub></b>	2.9102	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	2.8834	-----
<b>t(c)</b>	0.9304 ( P = 34 %)		

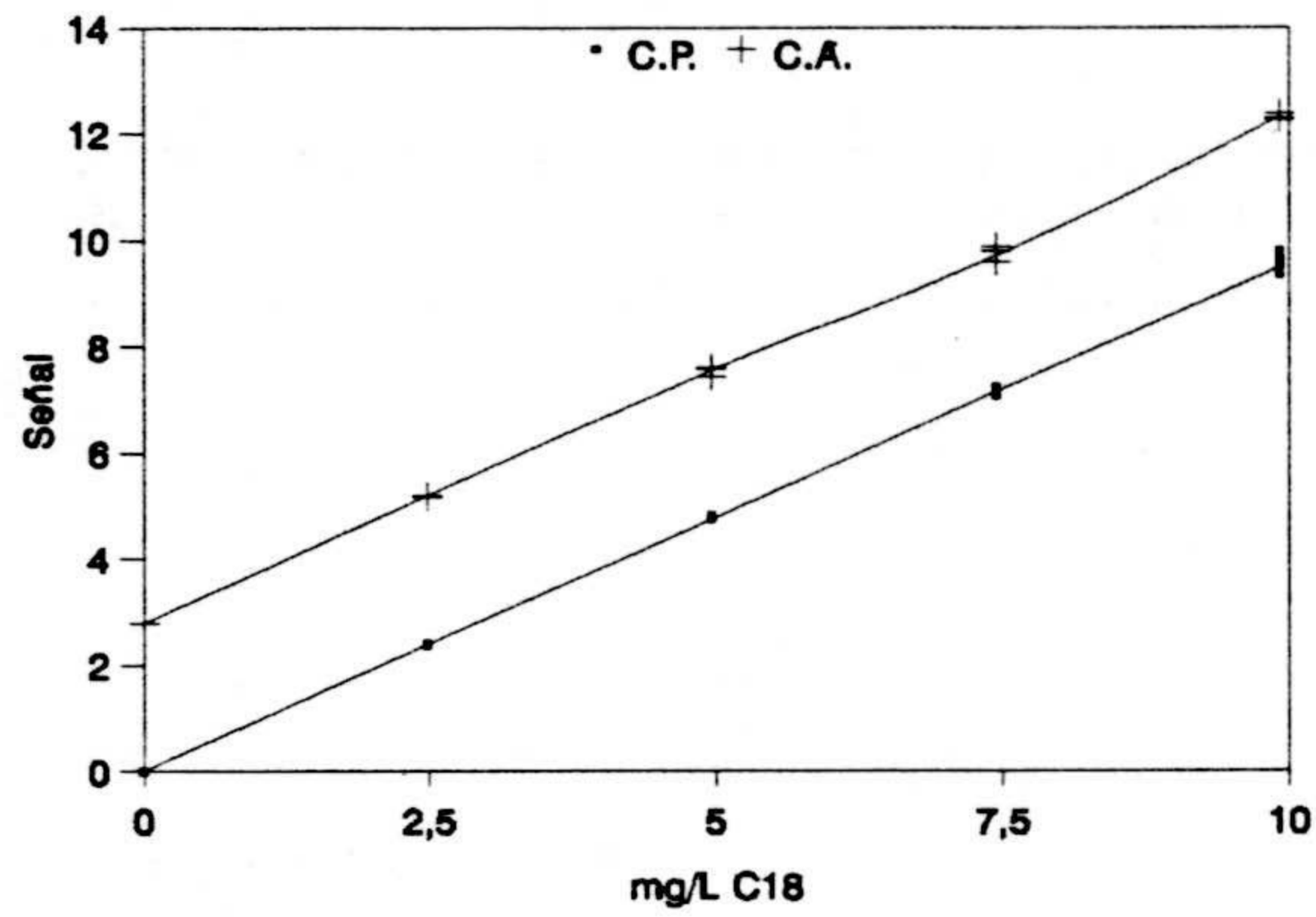


Figura IV.55.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>18</sub>.

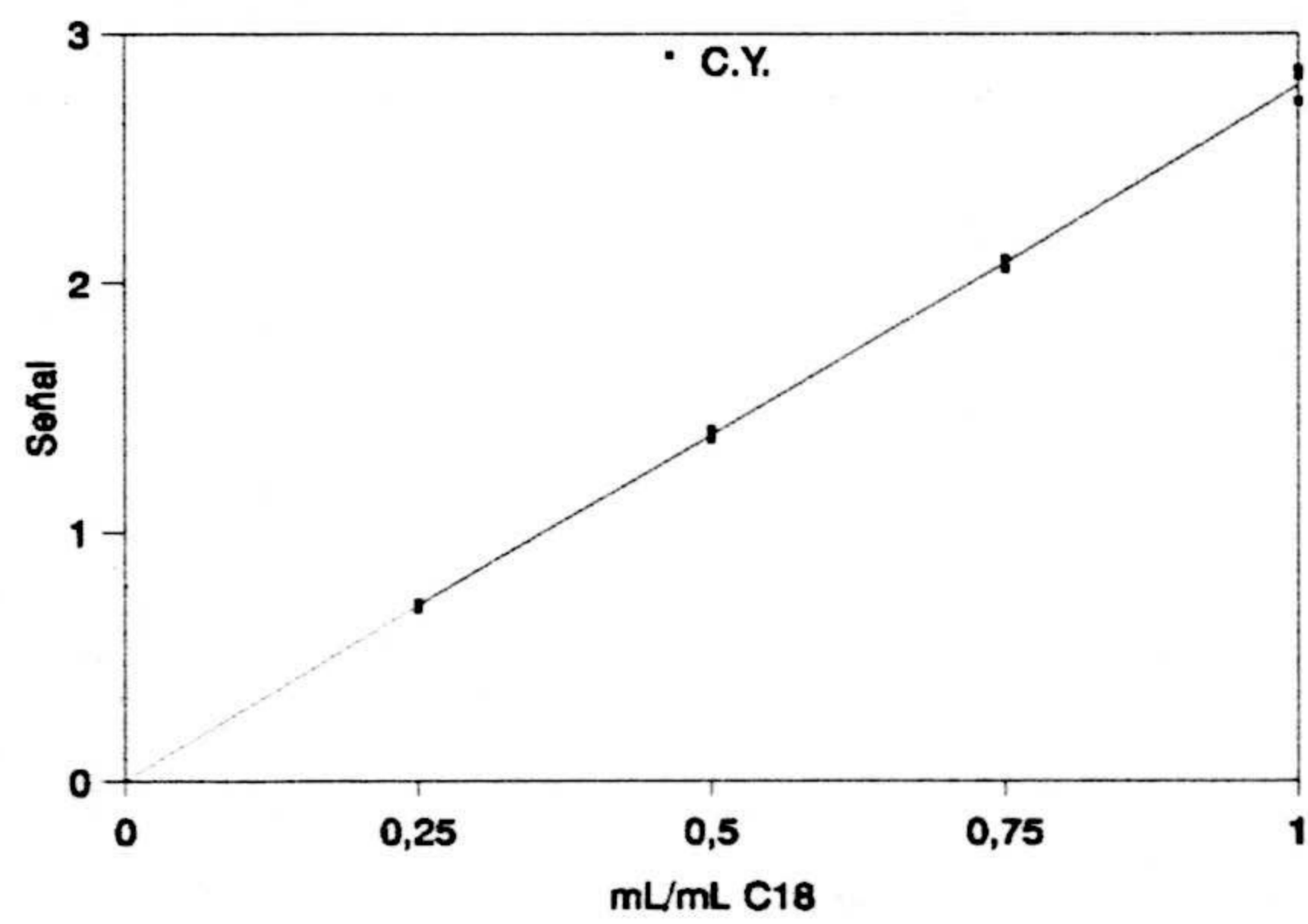


Figura IV.56.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>18</sub>.

**Tabla IV.40.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido aráquico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0014	0.0493	-0.0007
<b>b</b>	0.8295	0.8244	0.0507
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0065	0.0072	0.0007
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0067		
<b>t(b)</b>	0.8712 ( P = 38 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8277		
<b>a'</b>	-0.0005	0.0476	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0002
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.0612	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.0583	-----
<b>t(c)</b>	1.1322 ( P = 26 %)		

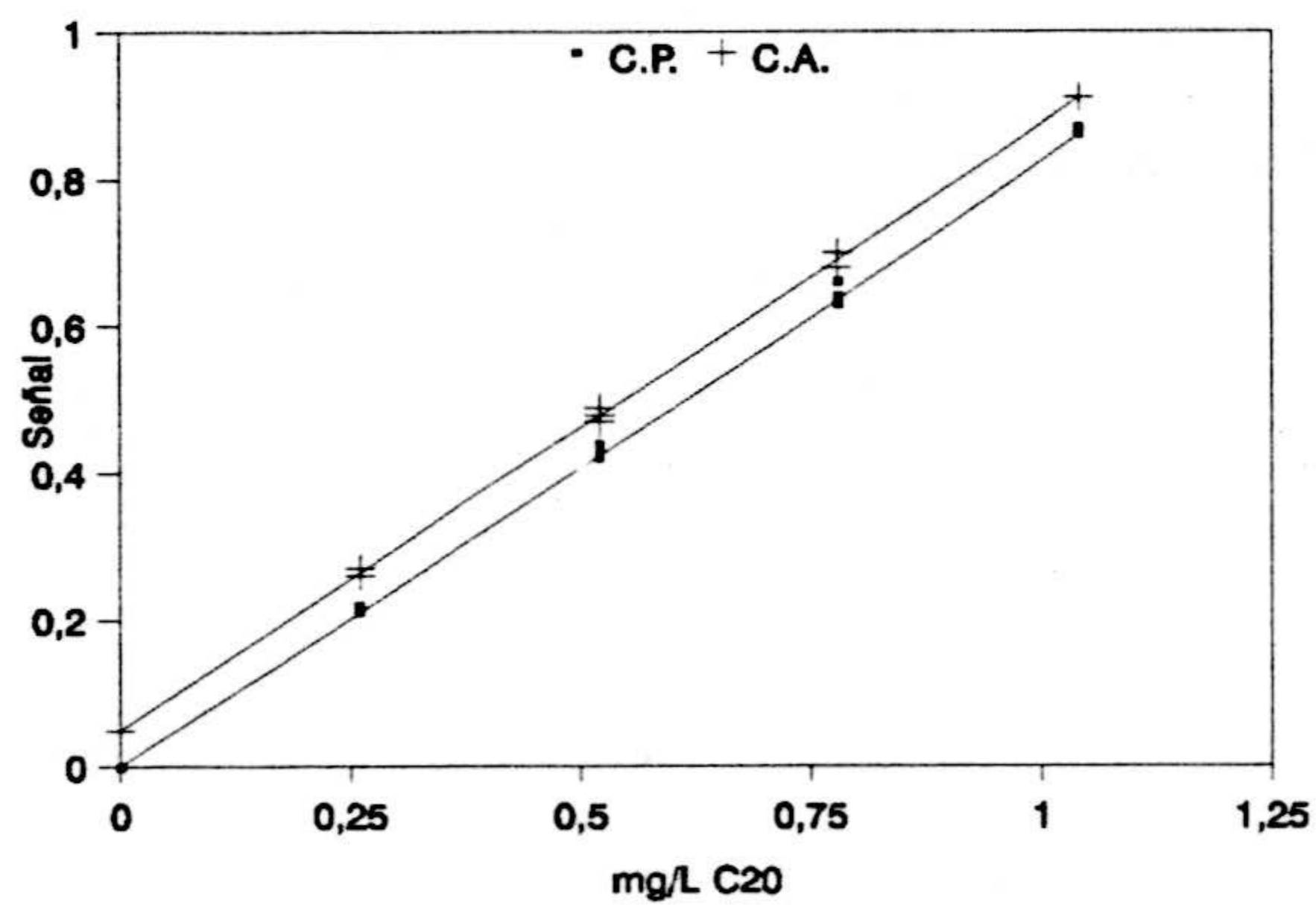


Figura IV.57.- Calibrado con patrones C.P. y calibrado con adición de patrón C.A. del éster C<sub>20</sub>.

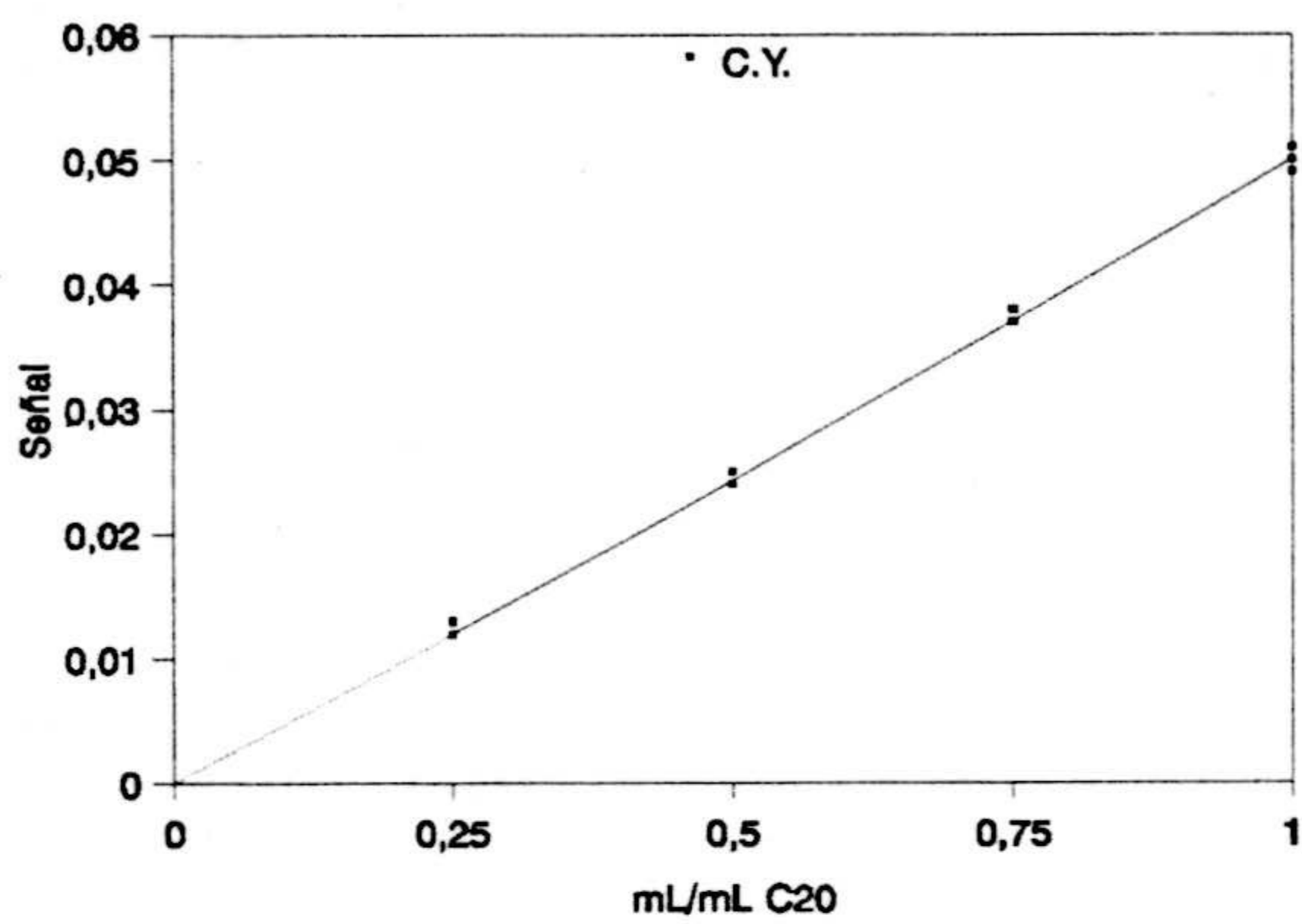


Figura IV.58.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>20</sub>.

### 2.2.2.5.- *Comentario de los resultados obtenidos.-*

2.2.2.5.1.- Comparación de pendientes. Se observó que en todos los casos obtenemos una conclusión no significativa, o sea al concluir por  $H_0$  ( $P > 10 \%$ ) las pendientes son iguales. Se comprobó la existencia de una ordenada en el origen positiva por lo que la adición de patrón provoca un error sistemático constante.

2.2.2.5.2.- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a_S'$ .

2.2.2.5.3.- Comprobación de la exactitud del método analítico. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), o sea el método es exacto para todos los ácidos grasos con un nivel de significación mayor del 5 %.

2.2.2.5.4.- Conclusión. El método queda validado para la extracción de los ácidos grasos presentes en los polvode acción intensa.

**2.2.2.6.- Análisis de la muestra.**

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de polvo de acción intensa MICOLOR. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se lleva directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis a una muestra de polvo de acción intensa MICOLOR. Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla IV.41.

**Tabla IV.41.-** Contenido en ácidos grasos del polvo de acción intensa MICOLOR.

	[A] mg/g			[ $\bar{A}$ ] mg/g	s <sub>[<math>\bar{A}</math>]</sub> mg/g	$\Delta[A]$ t <sub>0.05,28-2.048</sub>	Ácidos grasos mg/g
	1	2	3				
C <sub>8</sub>	0.08	0.08	0.07	0.08	5E-3	0.010	0.08 ± 0.01
C <sub>10</sub>	0.04	0.04	0.05	0.04	6E-3	0.012	0.04 ± 0.01
C <sub>12</sub>	0.43	0.42	0.47	0.44	0.03	0.061	0.44 ± 0.06
C <sub>14</sub>	0.67	0.68	0.75	0.70	0.04	0.082	0.70 ± 0.08
C <sub>16</sub>	4.11	3.90	3.88	3.96	0.13	0.266	4.0 ± 0.3
C <sub>18</sub>	2.87	2.93	2.83	2.89	0.07	0.143	2.9 ± 0.1
C <sub>18:1</sub>	0.38	0.37	0.41	0.39	0.02	0.041	0.39 ± 0.04
C <sub>20</sub>	0.06	0.05	0.06	0.06	3E-3	0.006	0.06 ± 0.01

### ***2.2.3.- Aplicación del método al polvo de acción intensa LEL.***

Además del análisis de la muestra necesitamos realizar un calibrado de Youden para determinar si  $a_Y$  está incluida en el intervalo calculado para  $a_S'$ .

#### **2.2.3.1.- Calibrado de Youden.**

Se pesaron 50 mg de formulación LEL y se enrasaron a 500 mL con agua desionizada. Se tomaron volúmenes crecientes (25, 50, 75 y 100 mL) de ésta y se enrasaron a 100 mL con agua desionizada. Se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.42.



Tabla IV.42.- Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	0.34	0.022	0.65	0.045	0.97	0.065	1.35	0.089
	0.34	0.022	0.66	0.044	1.04	0.068	1.28	0.091
	0.33	0.023	0.71	0.045	1.06	0.070	1.39	0.092
C <sub>10</sub>	0.37	0.024	0.71	0.049	1.08	0.072	1.45	0.095
	0.36	0.023	0.70	0.047	1.11	0.073	1.38	0.098
	0.35	0.024	0.77	0.048	1.11	0.073	1.42	0.095
C <sub>12</sub>	0.72	0.048	1.41	0.097	2.08	0.139	2.87	0.189
	0.74	0.048	1.42	0.095	2.20	0.144	2.66	0.189
	0.71	0.047	1.51	0.096	2.16	0.143	2.88	0.191
C <sub>14</sub>	1.44	0.095	2.61	0.180	4.11	0.275	5.66	0.372
	1.42	0.092	2.77	0.184	4.26	0.278	5.27	0.374
	1.34	0.090	2.88	0.182	4.30	0.284	5.67	0.377
C <sub>16</sub>	18.3	1.203	35.2	2.430	54.7	3.651	76.0	4.998
	18.4	1.191	36.3	2.412	55.2	3.605	67.3	4.778
	18.3	1.228	38.8	2.455	53.0	3.502	73.5	4.888
C <sub>18</sub>	15.9	1.047	29.7	2.054	46.5	3.105	63.1	4.148
	16.4	1.061	31.7	2.110	46.5	3.041	60.0	4.260
	15.4	1.034	34.0	2.153	47.4	3.131	62.3	4.160

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.42.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	1.38	0.091	2.62	0.181	3.95	0.264	5.40	0.355
	1.35	0.088	2.59	0.172	4.12	0.269	5.03	0.357
	1.32	0.089	2.80	0.177	4.08	0.270	5.22	0.347
C <sub>20</sub>	0.32	0.021	0.60	0.041	0.92	0.061	1.28	0.084
	0.31	0.020	0.61	0.041	0.96	0.063	1.17	0.083
	0.32	0.021	0.65	0.041	0.95	0.063	1.27	0.084
C <sub>13</sub>	15.2		14.5		15.0		15.2	
	15.4		15.0		15.3		14.0	
	14.9		15.8		15.1		15.0	

A, área analito (10<sup>4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

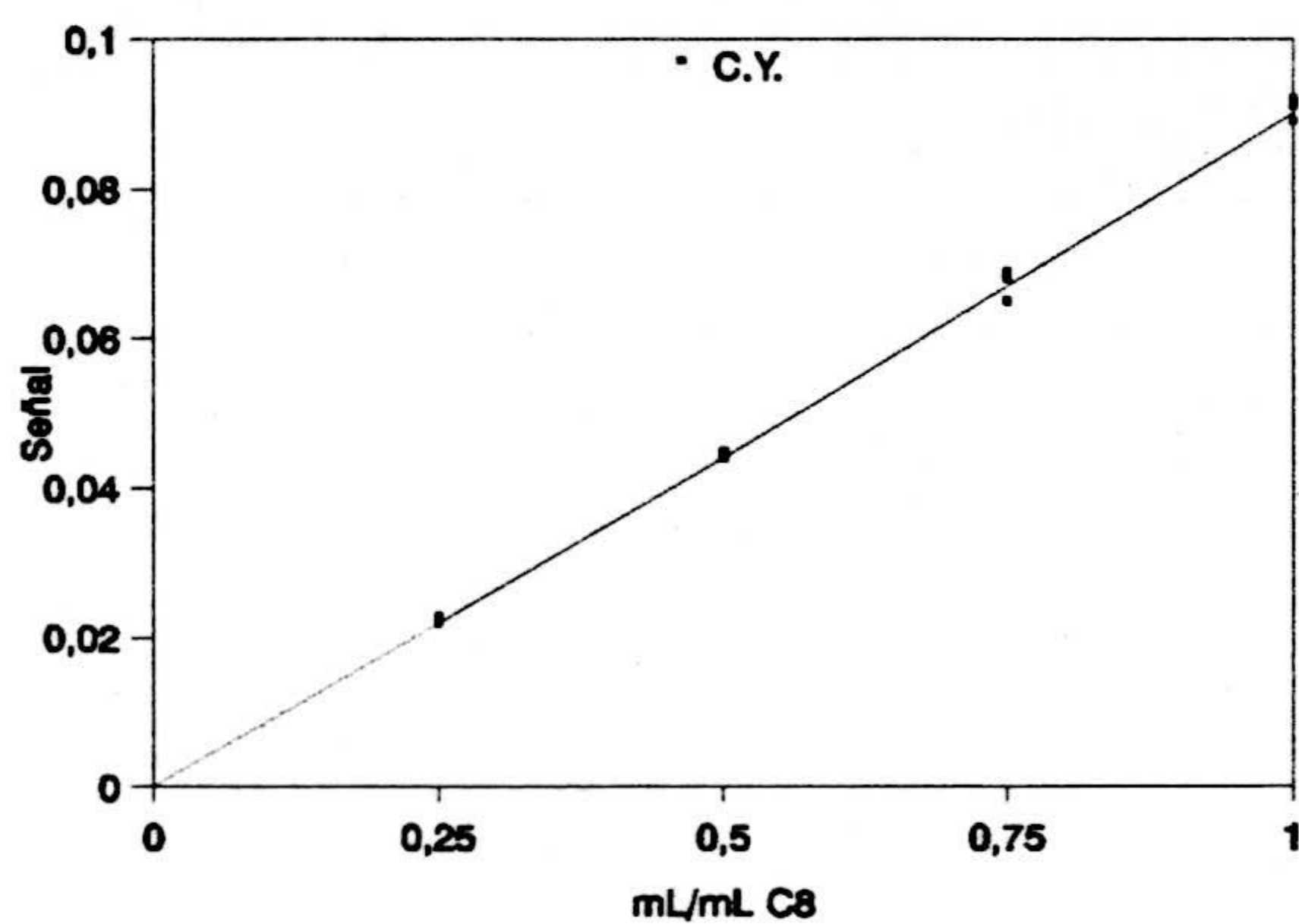


Figura IV.59.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>8</sub>.

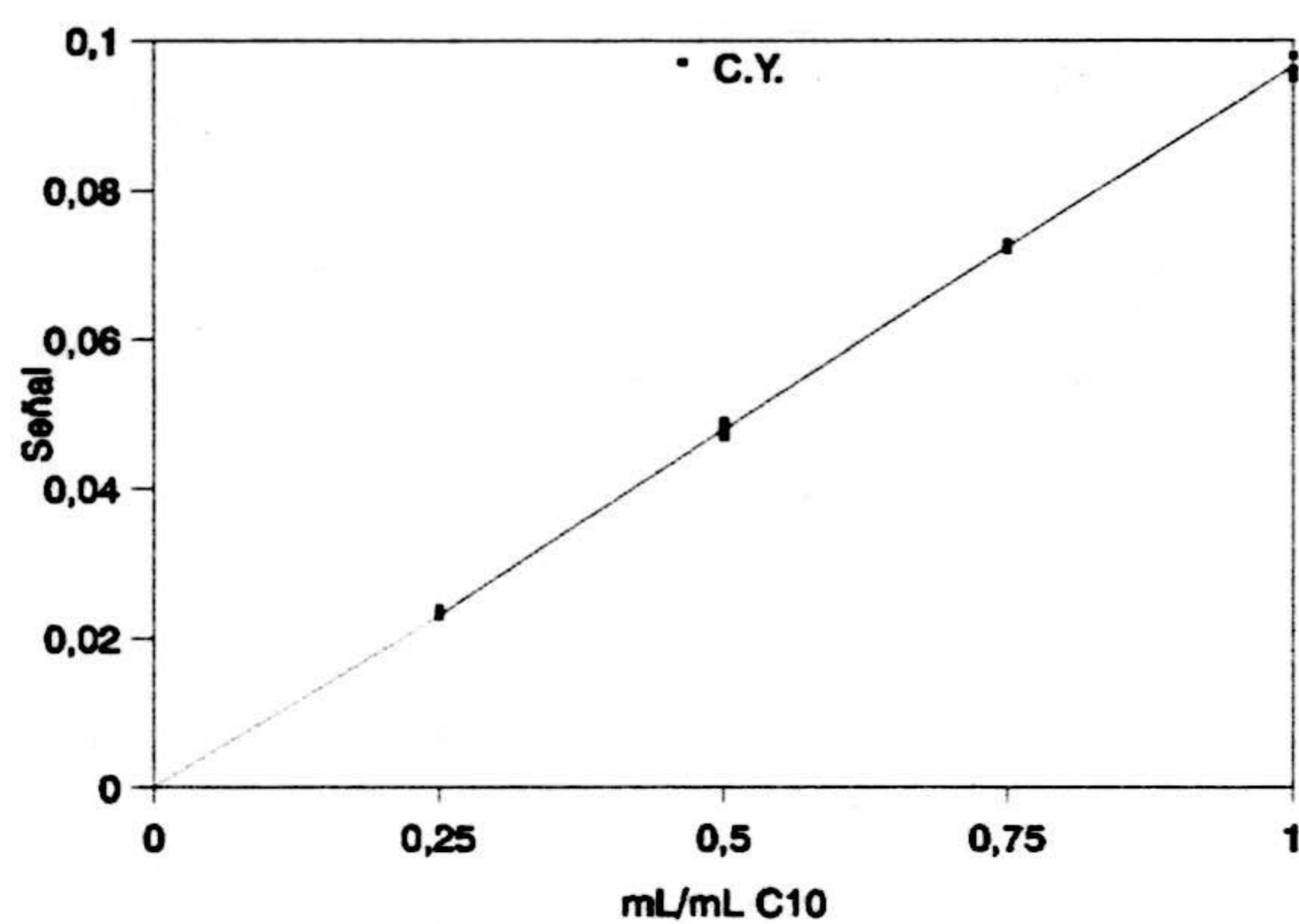


Figura IV.60.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>10</sub>.

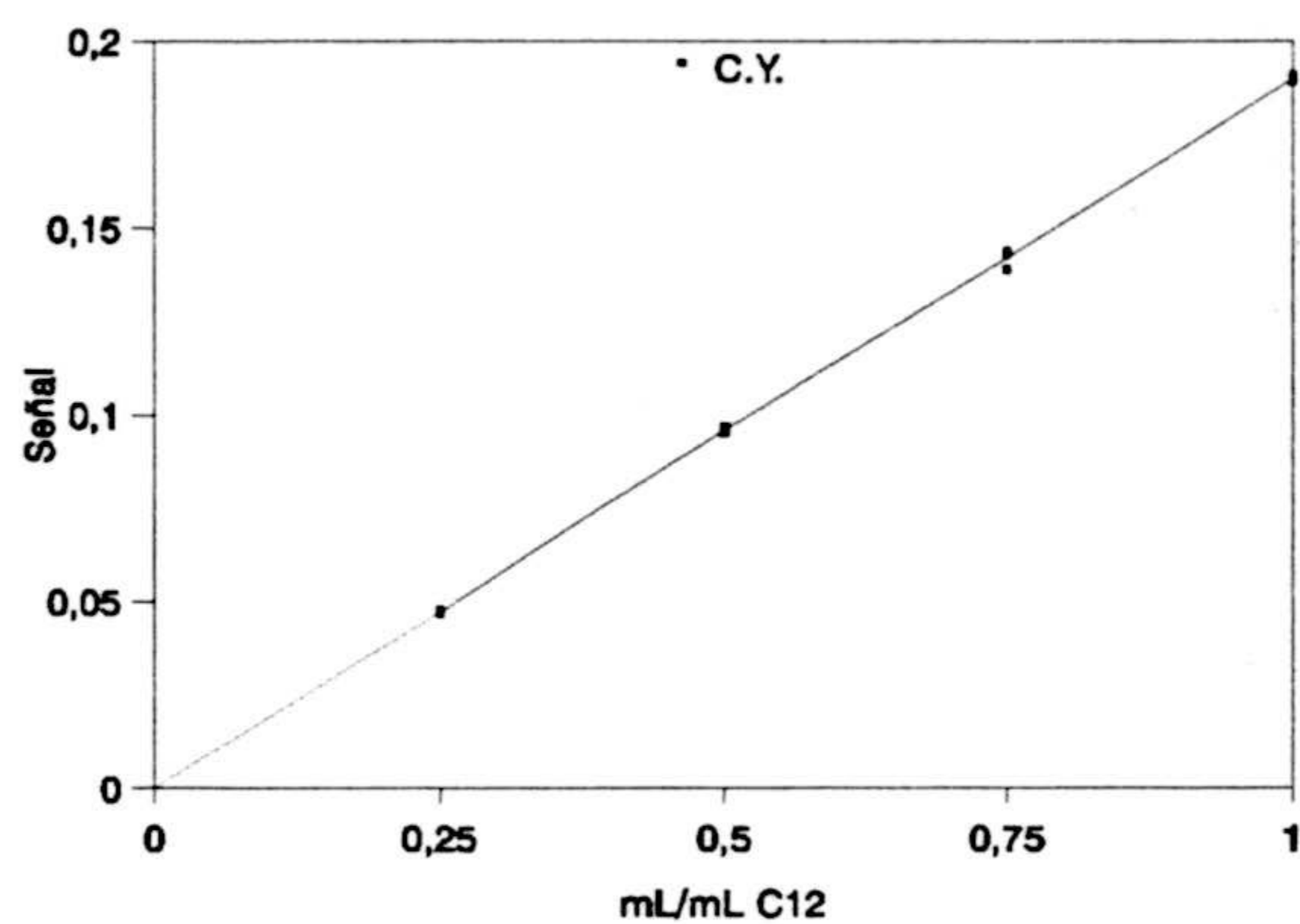


Figura IV.61.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>12</sub>.

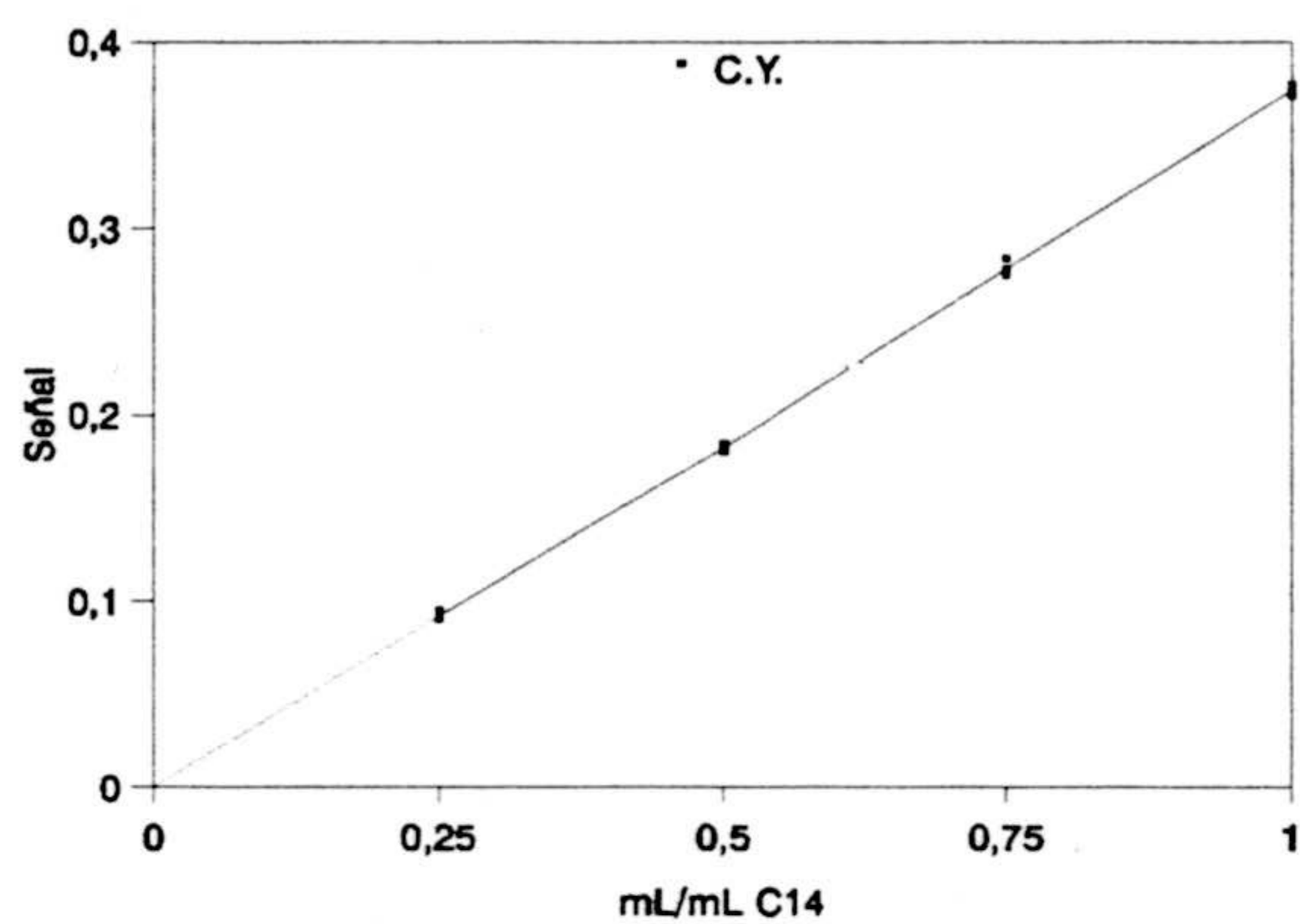


Figura IV.62.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>14</sub>.

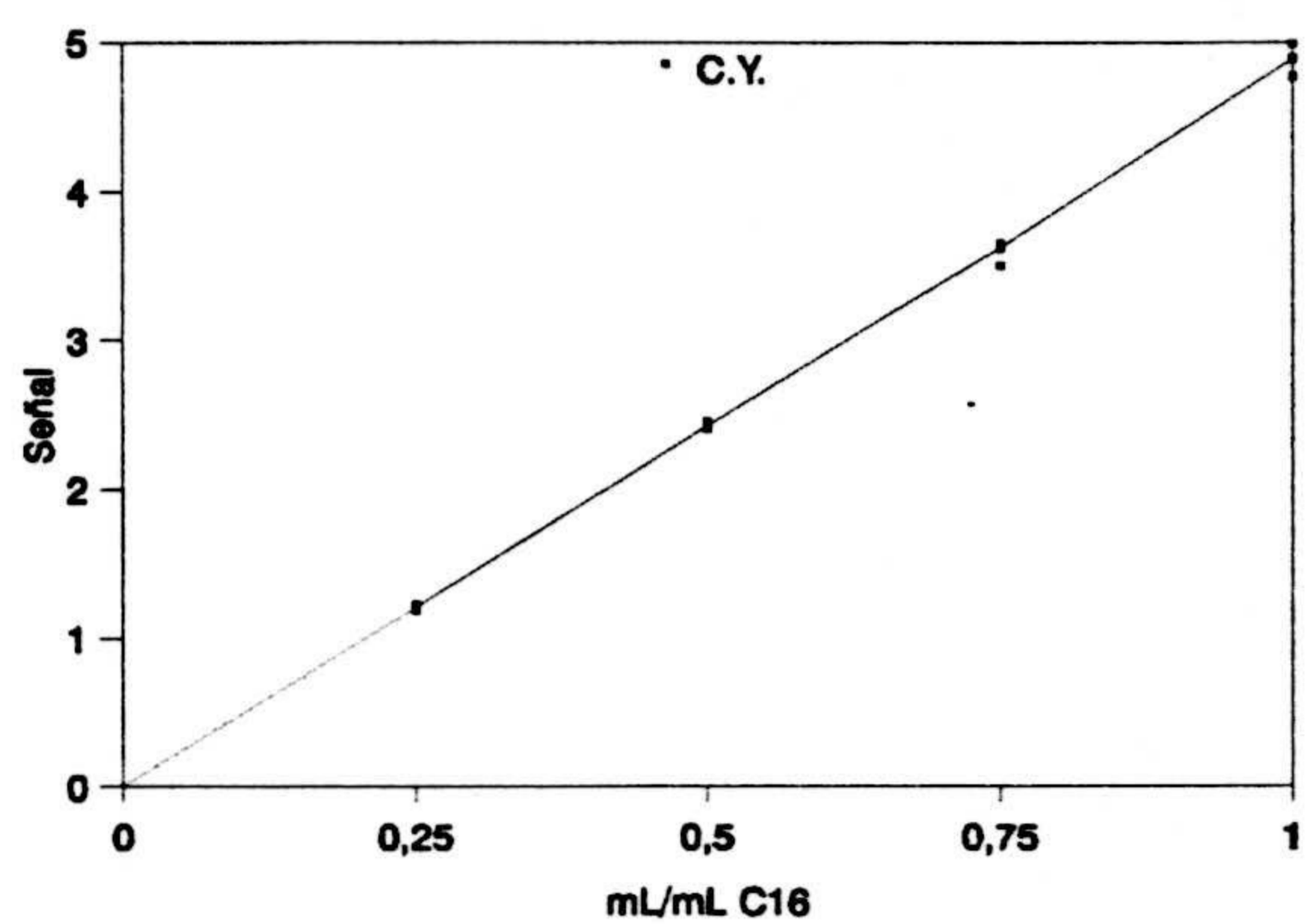


Figura IV.63.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>16</sub>.

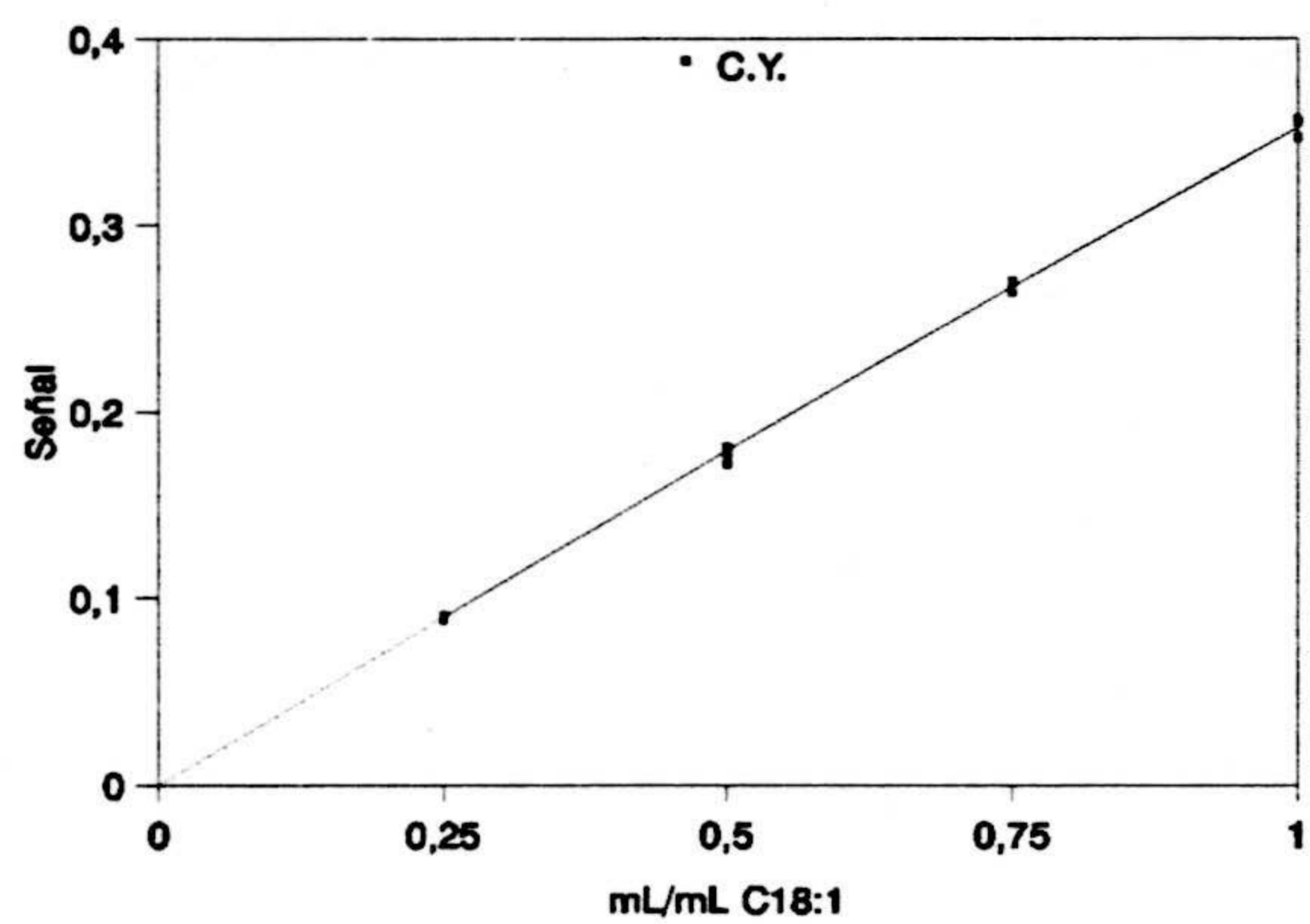


Figura IV.64.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>18:1</sub>.

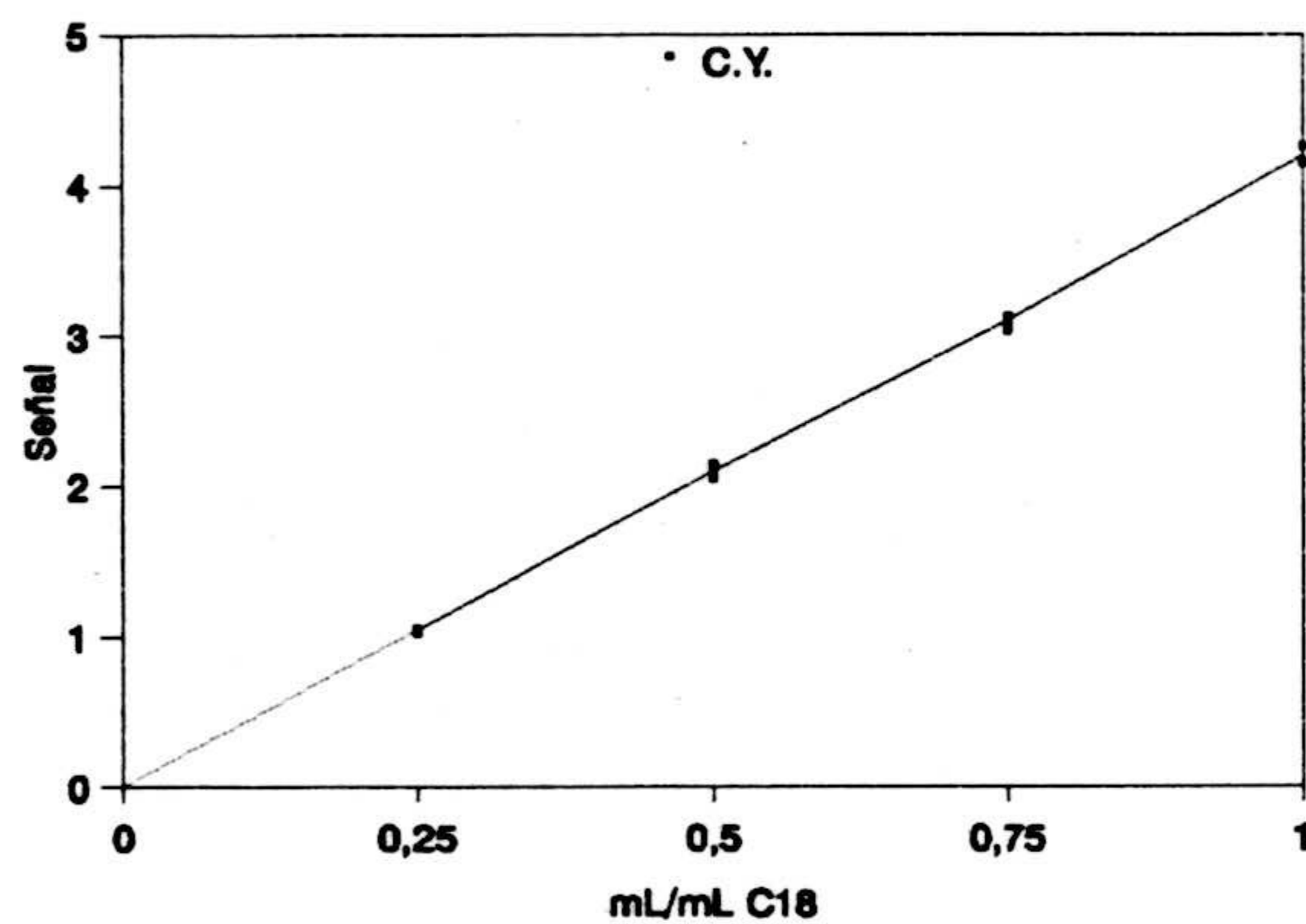


Figura IV.65.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>18</sub>.

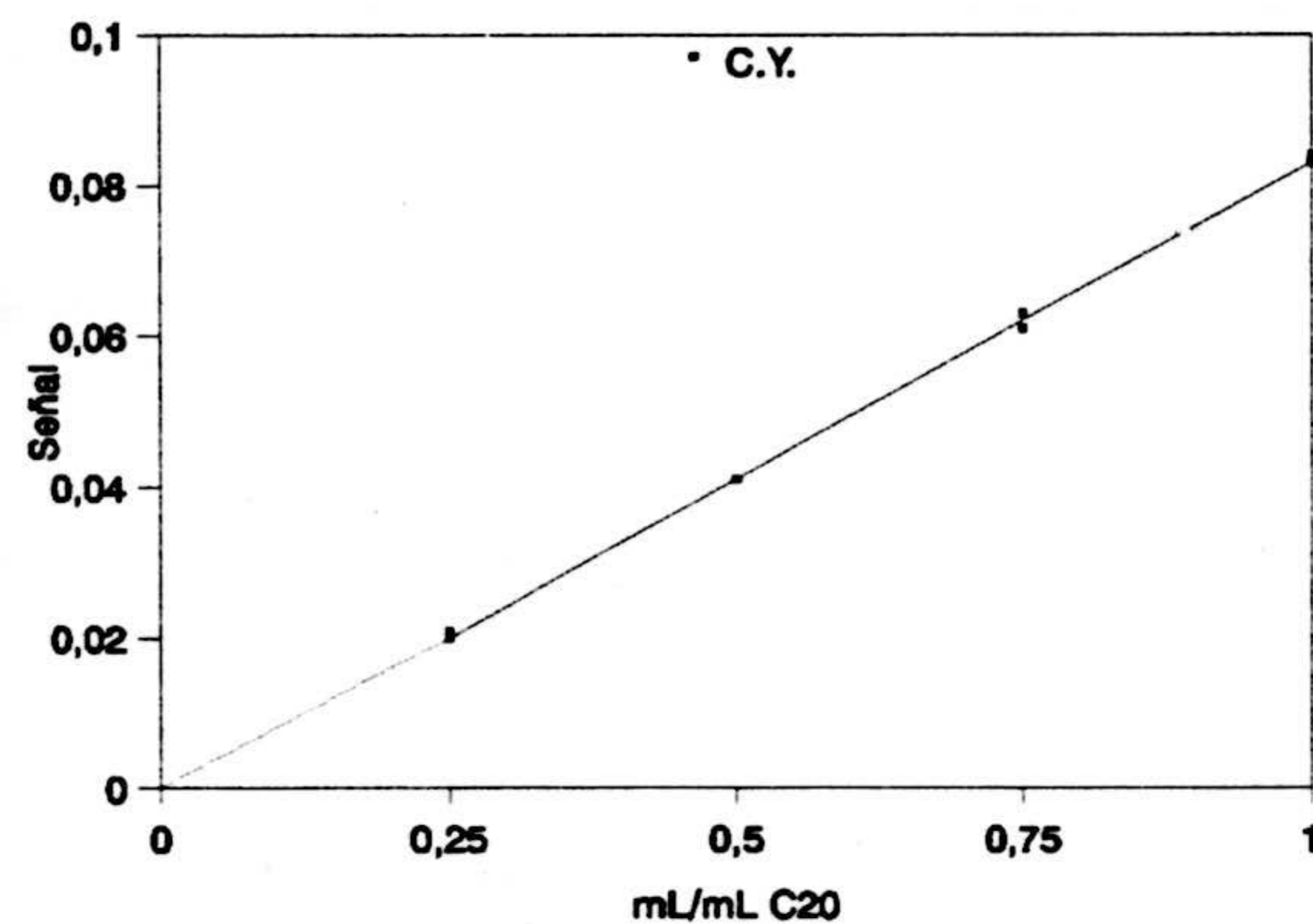


Figura IV.66.- Calibrado de youden C.Y. del éster C<sub>20</sub>.

En todos los casos  $a_y$  está incluida en el intervalo calculado para  $a_s'$ .

**2.2.3.2.- Análisis de la muestra.**

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de formulación LEL. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se lleva directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis a una muestra de formulación LEL, las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla IV.43.-** Contenido en ácidos grasos del polvo de acción intensa LEL.

	[A] mg/g			[A] mg/g	$s_{[A]}$ mg/g	$\Delta[A]$ $t_{0.05,28-2.048}$	Ácidos grasos mg/g
	1	2	3				
C <sub>8</sub>	0.09	0.11	0.09	0.10	7E-3	0.014	0.10±0.01
C <sub>10</sub>	0.04	0.04	0.04	0.04	6E-3	0.012	0.04±0.01
C <sub>12</sub>	0.17	0.20	0.18	0.18	0.02	0.041	0.18±0.02
C <sub>14</sub>	0.40	0.45	0.41	0.42	0.03	0.061	0.42±0.06
C <sub>16</sub>	5.00	5.11	4.76	4.96	0.18	0.369	5.0±0.2
C <sub>18</sub>	4.27	4.41	4.36	4.35	0.07	0.143	4.35±0.07
C <sub>18:1</sub>	0.40	0.37	0.38	0.38	0.02	0.041	0.38±0.04
C <sub>20</sub>	0.10	0.07	0.10	0.09	0.01	0.020	0.09±0.02





Las aguas residuales presentan un contenido importante en ácidos grasos, cuyo principal origen reside en los vertidos domésticos de las diferentes formulaciones comerciales: jabones de mano, polvos de acción intensa, etc, como ya se indicó en la introducción.

Para abordar el estudio de la aplicación del método propuesto a estos sistemas hemos distinguido los dos constituyentes principales de una E.D.A.R.: Agua residual bruta y fango digerido final.

### **3.- APLICACIÓN ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS A AGUAS RESIDUALES.**

#### **3.1.- Introducción.-**

En la tabla IV.44 se presenta la composición del agua residual utilizada. Experiencias preliminares han puesto de manifiesto que la aplicación directa del método propuesto a este tipo de matrices no conduce a resultados satisfactorios. Este hecho nos induce al estudio de nuevas variables para la aplicación del método a estos sistemas y a una satisfactoria validación. Estas variables fueron:

- Tiempo de agitación/sonicación.
- Dilución.

**Tabla IV.44.-** Composición del agua residual.

Parámetro	Contenido
pH	7.7
Conductividad	
DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	320
DQO (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	440
Sólidos Totales (mg.L <sup>-1</sup> )	735
Sólidos Suspensión (mg.L <sup>-1</sup> )	295
Aceites y grasas (mg.L <sup>-1</sup> )	88
Fósforo total (mg.L <sup>-1</sup> )	25
Ca <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	
Mg <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	

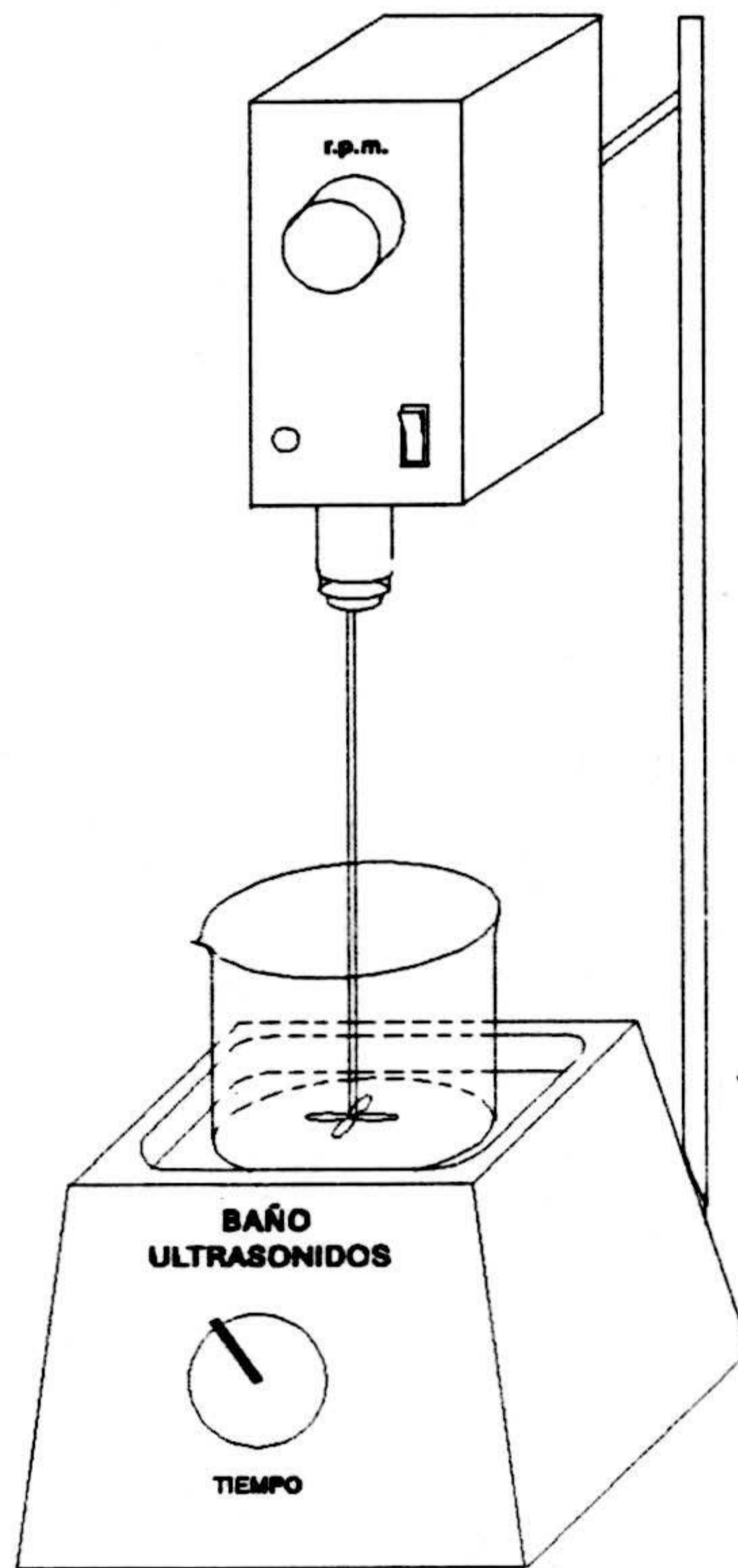
### 3.2.- Estudio de las variables para la aplicación del método al análisis a aguas residuales.

#### 3.2.1.- *Tiempo de agitación/sonicación.*

Parte de los ácidos grasos presentes en el agua residual bruta se encuentran formando parte de las partículas dispersas bien en forma de precipitado o bien adsorbidos sobre ellas. Uno de los problemas más importante en el análisis de los ácidos grasos reside en la extracción de los

mismos para ser adecuadamente analizados. En la literatura científica este problema es resuelto generalmente a través de una extracción sólido-líquido lo que origina elevados tiempos de análisis. El excelente resultado obtenido con el uso del ultrasonidos en otros estudios de extracción nos indujo a emplearlo en este sistema.

Para ello se realizó la siguiente experiencia: Se tomó un volumen de agua residual diluida 1:10 (agua residual:agua desionizada). Se le fijó el pH a un valor de 1, y fue sometida a una agitación mecánica en un baño de ultrasonidos, según se muestra en la figura IV.67, durante tiempos variables (3-24 horas). Al finalizar este proceso se les agregó 5 mL de diclorometano a cada una. Las mezclas se introducen en embudos de decantación de 250 mL y se agitan durante un minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro y a continuación la inyectamos en el cromatógrafo.



**Figura IV.67.-** Agitador de varilla acoplado a baño ultrasonidos.

**Tabla IV.45.-** Áreas obtenidas para diferentes tiempos de agitación/sonicación.

ÉSTERES METÁLICOS	Tiempo agitación/sonicación (horas)				
	3	6	12	18	24
	A	A	A	A	A
Ácido Caprílico	750	900	915	895	910
Ácido Cáprico	821	950	925	945	955
Ácido Láurico	1256	1500	1525	1480	1520
Ácido Mirístico	1120	1321	1350	1311	1327
Ácido Palmítico	5685	6258	6200	6298	6300
Ácido Oléico	725	850	865	855	860
Ácido Estearico	5230	5950	5868	5925	5995
Ácido Aráquico	523	610	602	615	630
Ácido Behénico	489	500	513	508	515

Como observamos en la tabla a partir de las 6 horas de sonicación se estabilizan las áreas medidas para los ácidos grasos contenidos en la muestra de agua residual estudiada. Por este motivo para experiencias posteriores someteremos a la muestra diluida a 6 horas de agitación/sonicación, antes de proceder a aplicarle el método de extracción completo.

### **3.2.2.- Dilución.**

La gran emulsión que origina el agua residual durante el proceso de agitación si pretendemos extraer directamente con diclorometano nos indujo a tratar de disminuir aquella mediante su dilución previa. Para ello se tomaron diferentes volúmenes de agua residual 5, 10, 20, 50, 75 mL, se enrasaron a 100 mL con agua desionizada y se fijó el pH a un valor de 1. Las muestras se sometieron a 6 horas de agitación/ sonicación. Al finalizar esta operación se les agregó 5 mL de diclorometano a cada una. Las mezclas se trasvasaron a embudos de decantación de 250 mL y se agitaron durante un minuto. Se dejó en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Se comprobó que a partir de la relación de dilución 1:20 (agua residual:agua desionizada) no se formaba la interfase que dificultaba el proceso de extracción.

### **3.2.3.- Establecimiento del método de extracción de ácidos grasos en aguas residuales.**

La optimización de las variables anteriormente descritas nos ha permitido proponer el siguiente método para la determinación de ácidos grasos en aguas residuales.

Se toman 5 mL de agua residual y se diluyen hasta 100 mL con agua

---

desionizada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168.

### **3.3.- Validación de la aplicación del método de extracción a aguas residuales.**

Para la validación de la extracción de ácidos grasos en aguas residuales vamos se aplicó el protocolo estadístico basado en la metodología del método de adición de patrón. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, una adición de patrón y otra con porciones crecientes de muestra.

Para desarrollar esta metodología se relizaron las experiencias que se describen a continuación:



### ***3.3.1.- Calibrado con patrones.-***

En el anterior capítulo se desarrolló este calibrado para todos los ácidos grasos, obteniéndose sus correspondientes parámetros estadísticos, así como sus parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón se empleó la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y la desviación estandar de la regresión  $S_{R,C}$ . Estos valores quedan indicados en la correspondiente tabla de validación para cada ácido graso.

### ***3.3.2.- Calibrado con adición de patrón.-***

Para establecer este calibrado se realizó la siguiente experiencia. Se tomaron cinco alícuotas de 100 mL de agua residual previamente diluida (1:20), a las cuales se les añadieron volúmenes crecientes de disolución patrón de los ácidos grasos, para obtener unas concentraciones finales de 0.0, 12.5, 25.0, 37.5 y 50 ng. mL<sup>-1</sup> de ácidos grasos individuales añadidos a la muestra. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se

esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168.

No son necesarias las réplicas del método, pero se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.

### ***3.3.3.- Calibrado de Youden.-***

Se toman volúmenes crecientes (25, 50, 75 y 100 mL) de agua residual diluida (1:20). Se enrasan a 100mL con agua desionizada. Se realizaron tres inyecciones de cada concentración ensayada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 5 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 250 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.47.

**3.3.4.- Comprobación de la exactitud del método.-**

Para verificar la exactitud del método hay que hacer el mismo desarrollo que se empleó en el caso del agua potable.

A continuación se presentan tabulados los valores obtenidos al aplicar este desarrollo a cada ácido graso.

**Tabla IV.46.-** Señales obtenidas en el calibrado por adición de patrón (CA).

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	9	0.630	16	1.014	22	1.40	29	1.78	36	2.16
	10	0.631	16	1.011	21	1.38	29	1.79	34	2.15
	10	0.629	17	1.019	23	1.41	29	1.78	36	2.16
C <sub>10</sub>	13	0.866	18	1.120	22	1.37	27	1.63	31	1.90
	14	0.867	18	1.117	21	1.38	26	1.61	30	1.89
	13	0.865	19	1.112	22	1.38	27	1.66	31	1.87
C <sub>12</sub> (*)	45	2.880	87	5.339	122	7.70	168	10.1	208	12.7
	46	2.881	83	5.271	120	7.80	165	10.2	202	12.6
	45	2.879	90	5.304	124	7.71	169	10.3	211	12.7

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.46.- Continuación

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )									
	0.0		0.25(*)		0.50(*)		0.75(*)		1.00(*)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>14</sub> (*)	33	2.130	72	4.430	107	6.80	152	9.19	188	11.5
	34	2.131	71	4.515	104	6.77	150	9.27	186	11.6
	33	2.129	76	4.488	110	6.84	151	9.12	187	11.3
C <sub>16</sub> (*)	72	4.610	112	6.869	144	9.097	188	11.5	224	13.6
	74	4.611	108	6.872	140	9.106	185	11.4	217	13.5
	72	4.609	117	6.912	147	9.137	188	11.3	223	13.4
C <sub>18</sub>	8.9	0.575	14	0.872	19	1.183	24	1.46	29	1.77
	9.3	0.576	13	0.883	18	1.178	23	1.47	29	1.81
	8.9	0.573	15	0.874	19	1.172	24	1.48	30	1.78
C <sub>18:1</sub> (*)	105	6.789	150	9.229	182	11.49	230	13.9	265	16.1
	110	6.791	144	9.157	181	11.81	225	13.9	263	16.4
	106	6.789	156	9.197	186	11.61	231	13.8	272	16.4
C <sub>20</sub>	3.8	0.247	7.5	0.464	11	0.690	15	0.88	18	1.10
	4.0	0.248	7.2	0.461	10	0.670	14	0.89	18	1.13
	3.8	0.245	7.8	0.460	11	0.678	15	0.89	19	1.11
C <sub>22</sub>	5.8	0.379	9.3	0.573	12	0.763	16	0.96	19	1.16
	6.1	0.381	9.0	0.575	11	0.777	15	0.96	18	1.15
	5.9	0.378	9.7	0.572	12	0.764	16	0.96	19	1.14

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

**Tabla IV.46-** Continuación.

	1 mgL <sup>-1</sup>				
	Áreas Patrón Interno (10 <sup>-4</sup> )				
C <sub>13</sub>	15.5	16.2	15.8	16.6	16.4
	16.1	15.7	15.4	16.2	16.1
	15.6	16.9	16.0	16.5	16.6

Tabla IV.47.- Señales obtenidas en el calibrado de youden (CY).

	Concentración (mL.mL <sup>-1</sup> )							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>8</sub>	5	0.323	11	0.645	15	0.946	20	1.252
	5	0.314	10	0.632	14	0.940	20	1.253
	5	0.315	10	0.630	15	0.939	21	1.259
C <sub>10</sub>	7	0.424	14	0.864	21	1.314	27	1.755
	7	0.433	13	0.880	21	1.307	27	1.734
	7	0.433	14	0.885	20	1.320	28	1.710
C <sub>12</sub>	23	1.420	47	2.916	67	4.269	91	5.840
	22	1.411	45	2.849	68	4.222	92	5.855
	24	1.490	45	2.841	66	4.311	97	5.886
C <sub>14</sub>	17	1.055	34	2.083	50	3.177	67	4.280
	17	1.090	32	2.090	54	3.340	70	4.444
	16	1.057	33	2.119	48	3.154	70	4.206
C <sub>16</sub>	37	2.332	75	4.575	112	7.118	143	9.145
	36	2.350	73	4.644	109	6.703	140	8.932
	37	2.315	73	4.608	106	6.906	155	9.342
C <sub>18</sub>	5	0.289	9	0.571	13	0.849	18	1.155
	4	0.293	9	0.577	14	0.852	18	1.138
	4	0.284	9	0.574	13	0.869	19	1.152

A, área analito (10<sup>-3</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

Tabla IV.47.- Continuación.

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )							
	0.00		0.25		0.50		0.75	
	A	C	A	C	A	C	A	C
C <sub>18:1</sub>	55	3.413	109	6.672	161	10.19	217	13.87
	53	3.378	107	6.768	168	10.39	215	13.76
	55	3.467	109	6.880	155	10.08	224	13.56
C <sub>20</sub>	2.0	0.126	4.1	0.249	5.7	0.362	7.9	0.504
	1.9	0.124	3.8	0.241	6.0	0.373	7.6	0.483
	2.0	0.124	3.9	0.248	5.6	0.369	8.2	0.495
C <sub>22</sub>	3.0	0.187	6.2	0.381	8.9	0.565	11.8	0.755
	3.1	0.197	5.9	0.373	9.5	0.587	12.1	0.772
	2.9	0.186	6.1	0.385	8.6	0.563	12.1	0.731
C <sub>13</sub>	16.1		16.3		15.8		15.6	
	15.5		15.8		16.2		15.7	
	15.8		15.8		15.3		16.5	

A, área analito (10<sup>-4</sup>); C, cociente área analito entre área patrón interno.

**Tabla IV.48.-** Valores numéricos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido caprílico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0004	0.6319	0.0078
<b>b</b>	0.8991	0.8931	1.2489
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0056	0.0081	0.0062
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0067		
<b>t(b)</b>	1.8360 ( P = 71 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8974		
<b>a'</b>	0.0028	0.6282	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0050
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.6933	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.6913	-----
<b>t(c)</b>	0.7421 ( P = 46 %)		



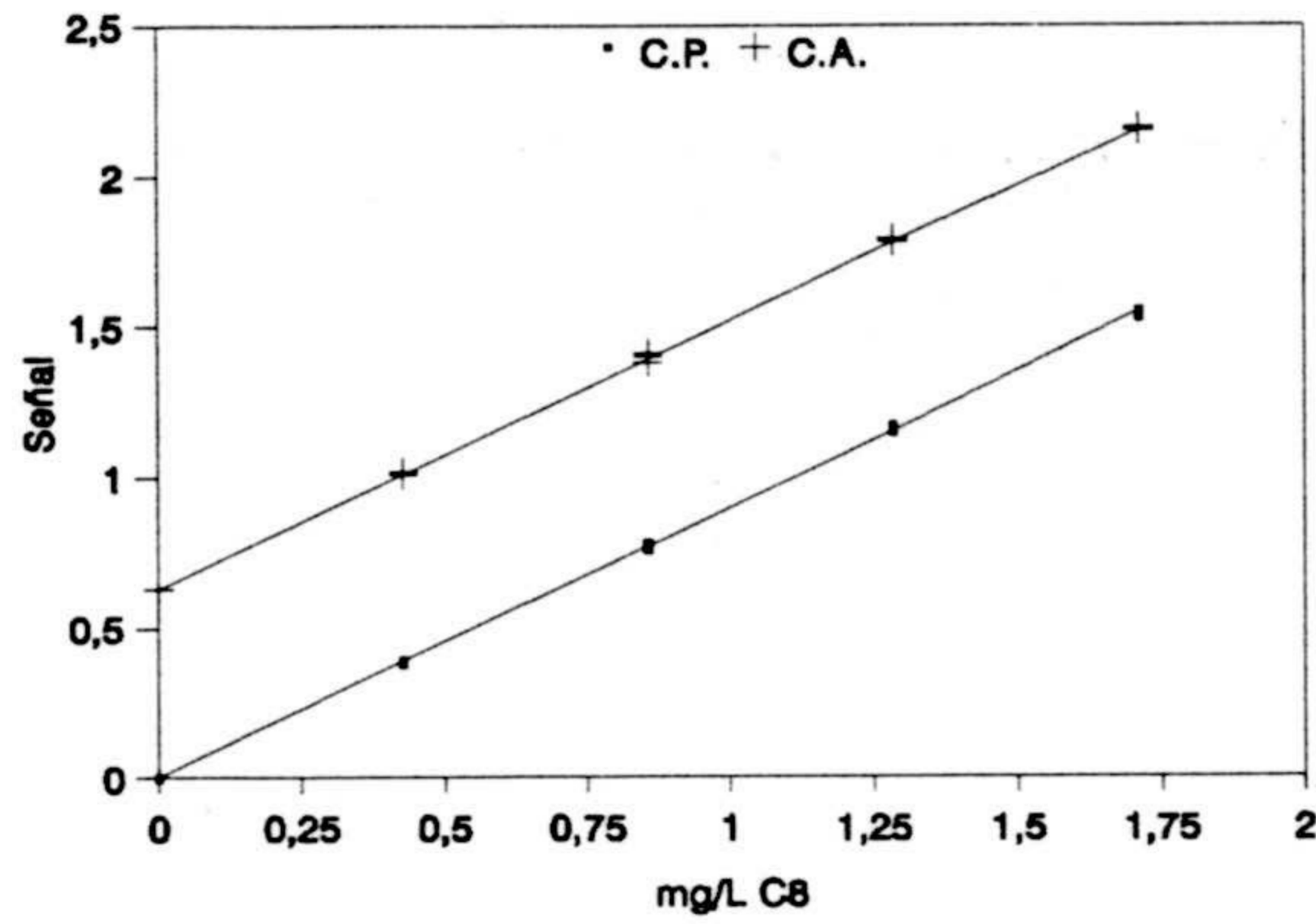


Figura IV.68.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>8</sub>.

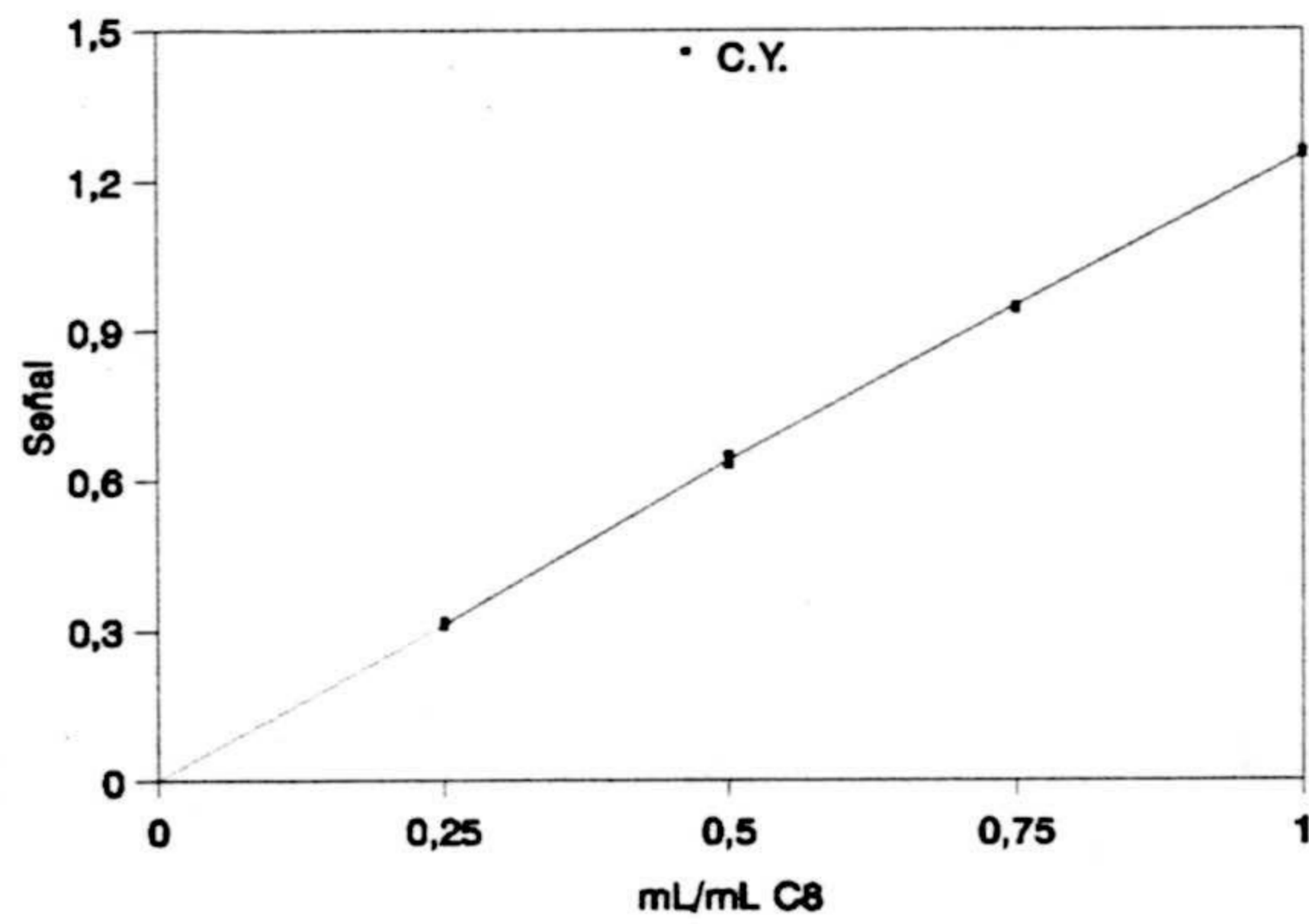


Figura IV.69.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>8</sub>.

**Tabla IV.49.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido cáprico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	0.8647	0.0017
<b>b</b>	0.9646	0.9692	1.7385
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0076	0.0117	0.0140
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0091		
<b>t(b)</b>	0.6207 ( P = 54 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9660		
<b>a'</b>	-0.0028	0.8664	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0045
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.8948	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.8951	-----
<b>t(c)</b>	0.0812 ( P = 90 %)		

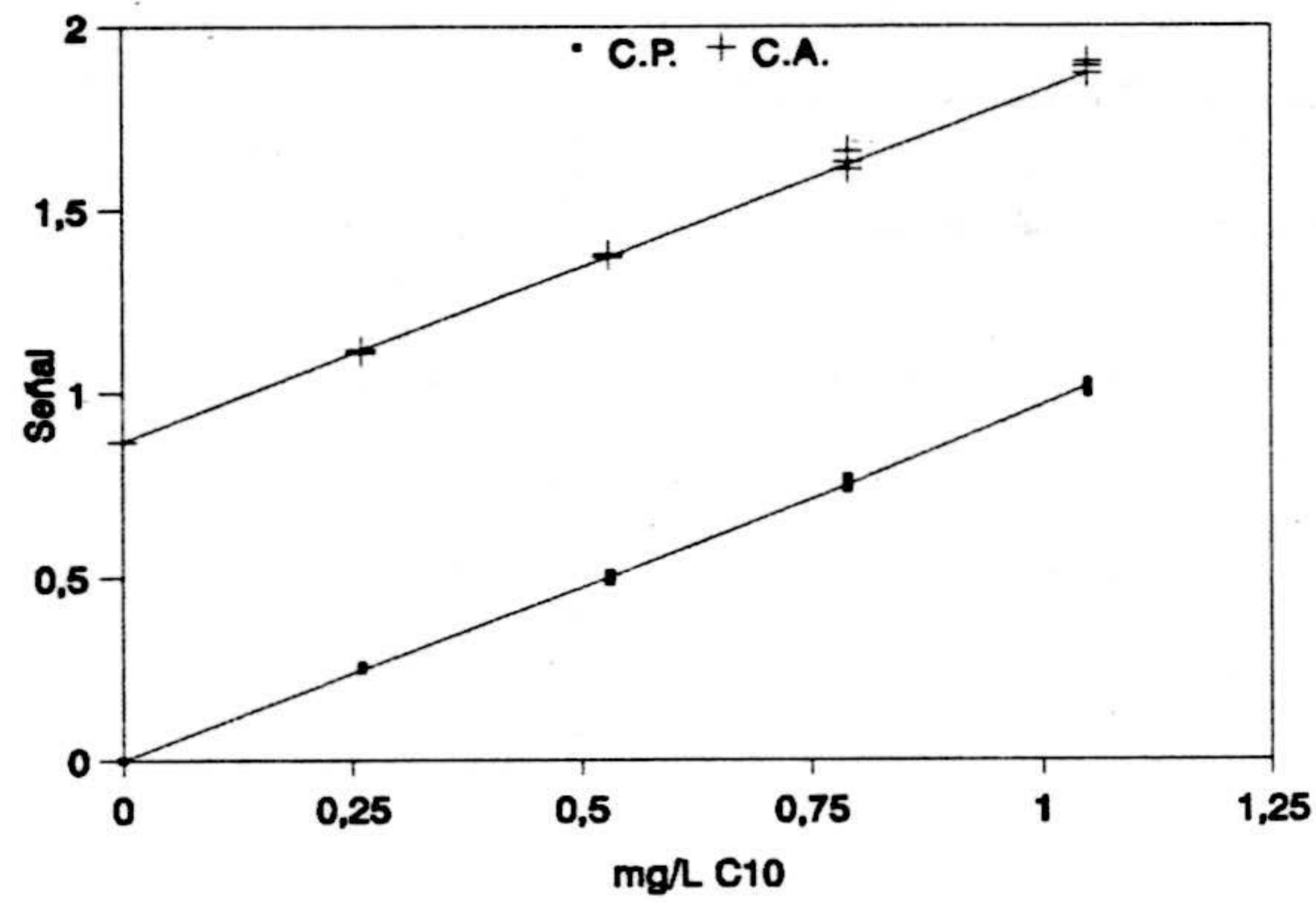


Figura IV.70.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>10</sub>.

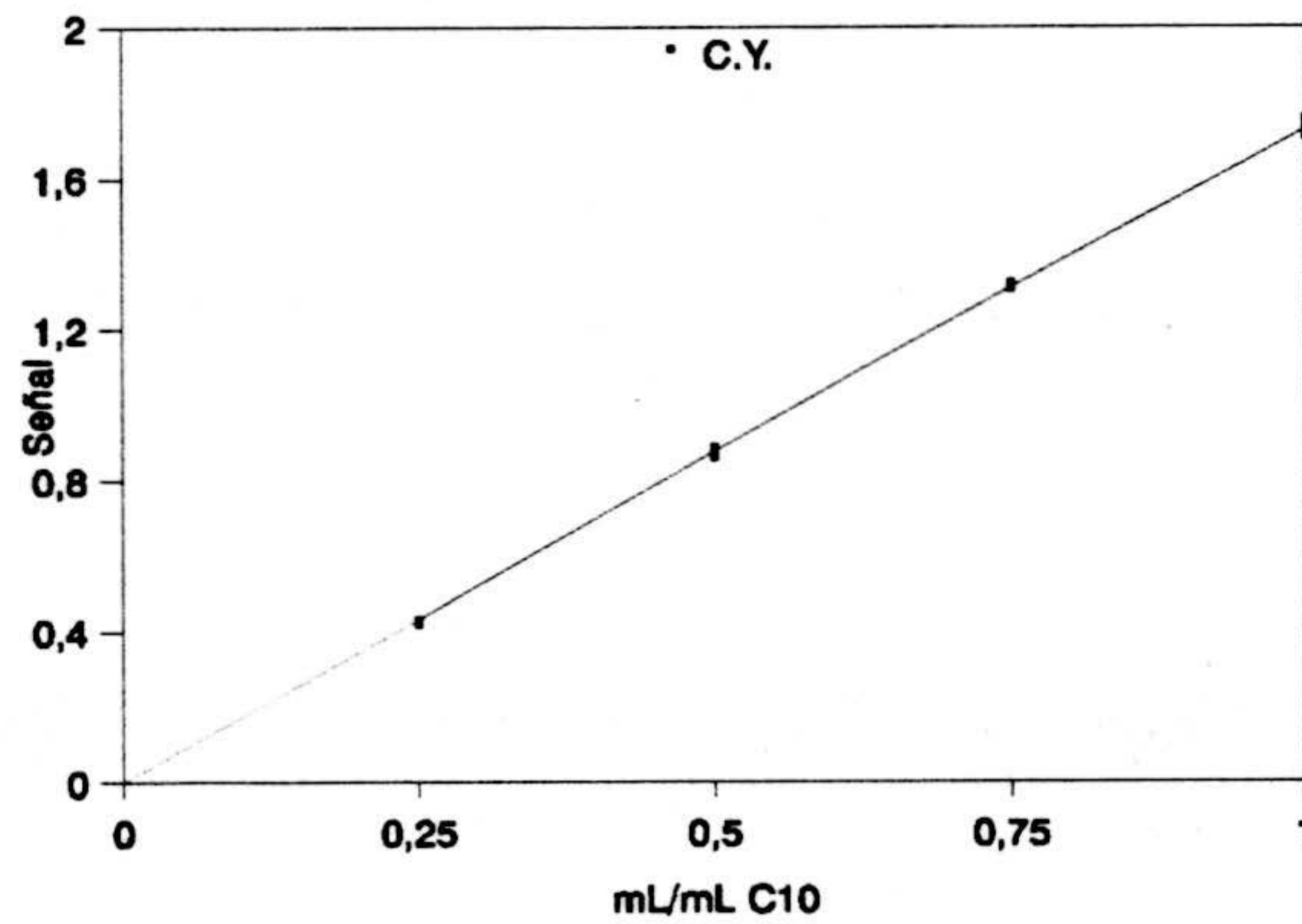


Figura IV.71.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>10</sub>.

**Tabla IV.50.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido láurico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0097	2.8647	-0.0550
<b>b</b>	0.8980	0.9059	5.8627
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0802	0.0421	0.0640
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0704		
<b>t(b)</b>	1.3558 ( P = 18 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9006		
<b>a'</b>	-0.0046	2.8931	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0504
<b>c<sub>x,S</sub></b>	3.2588	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	3.2734	-----
<b>t(c)</b>	0.5481 ( P = 58 %)		

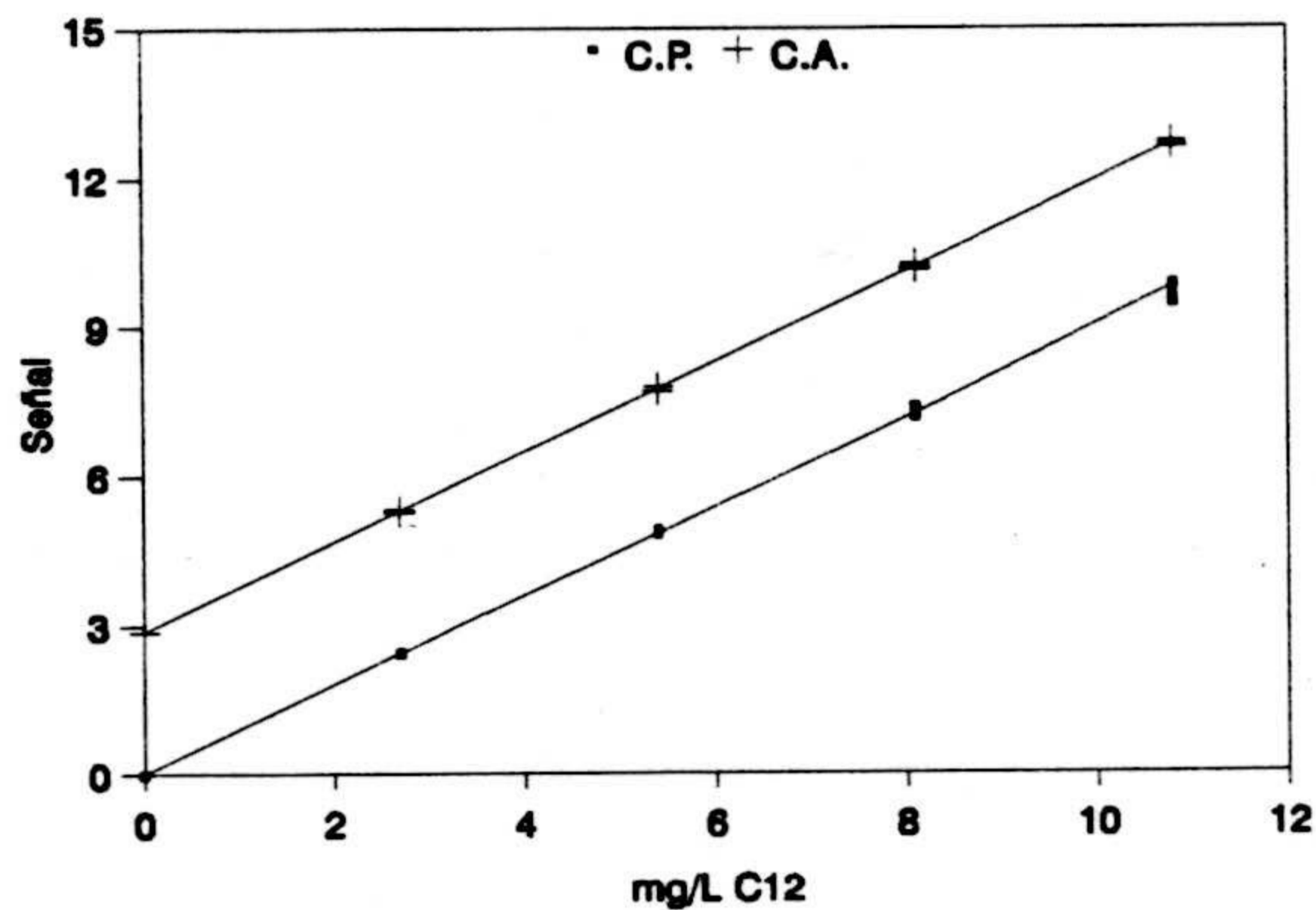


Figura IV.72.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>12</sub>.

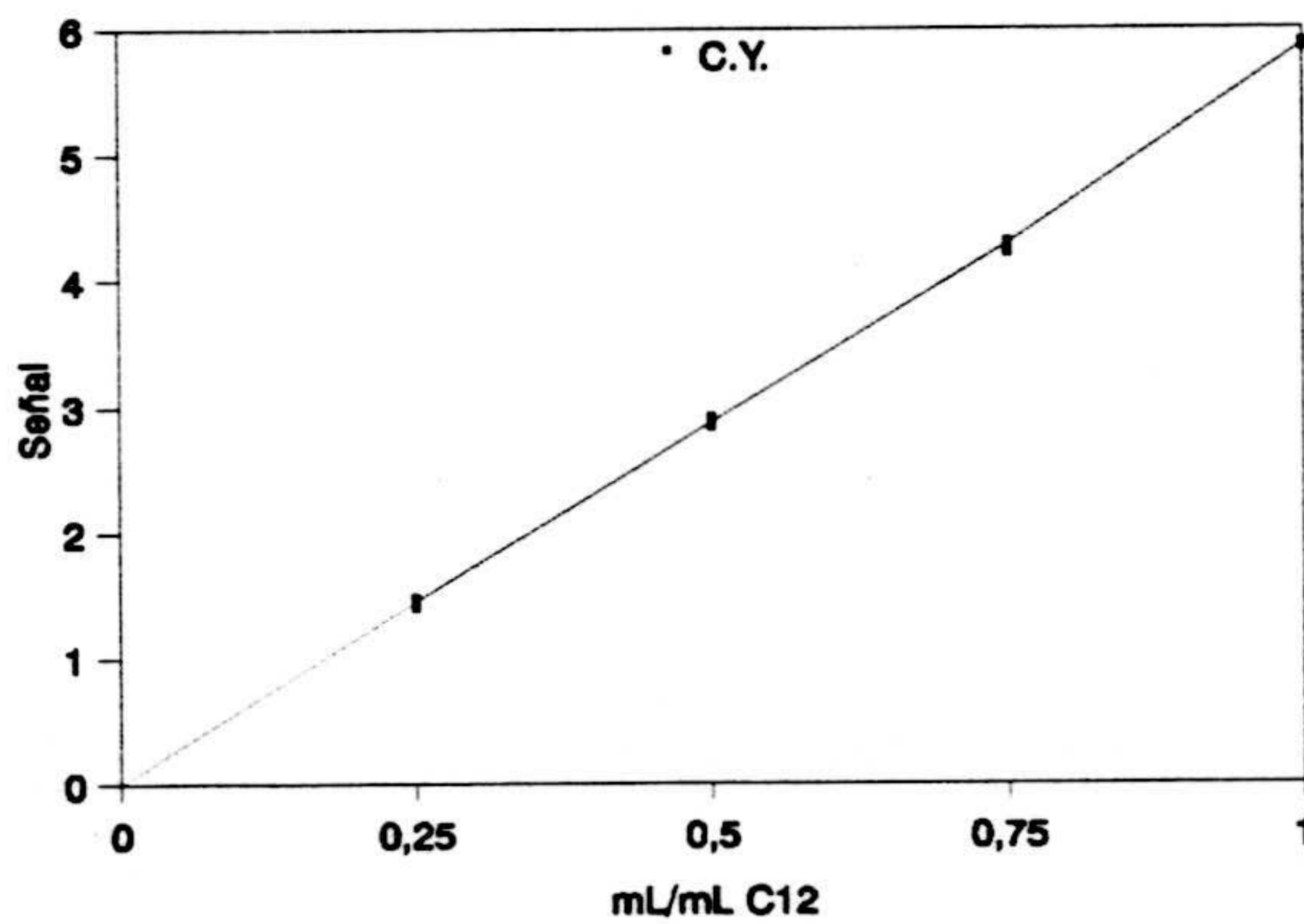


Figura IV.73.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>12</sub>.

**Tabla IV.51.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el ácido mirístico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0054	2.1469	-0.0367
<b>b</b>	0.9305	0.9276	4.3387
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0694	0.0669	0.0747
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0686		
<b>t(b)</b>	0.4756 ( P = 64 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9295		
<b>a'</b>	-0.0005	2.1372	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0361
<b>c<sub>x,S</sub></b>	2.3309	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	2.3387	-----
<b>t(c)</b>	0.3172 ( P = 75 %)		

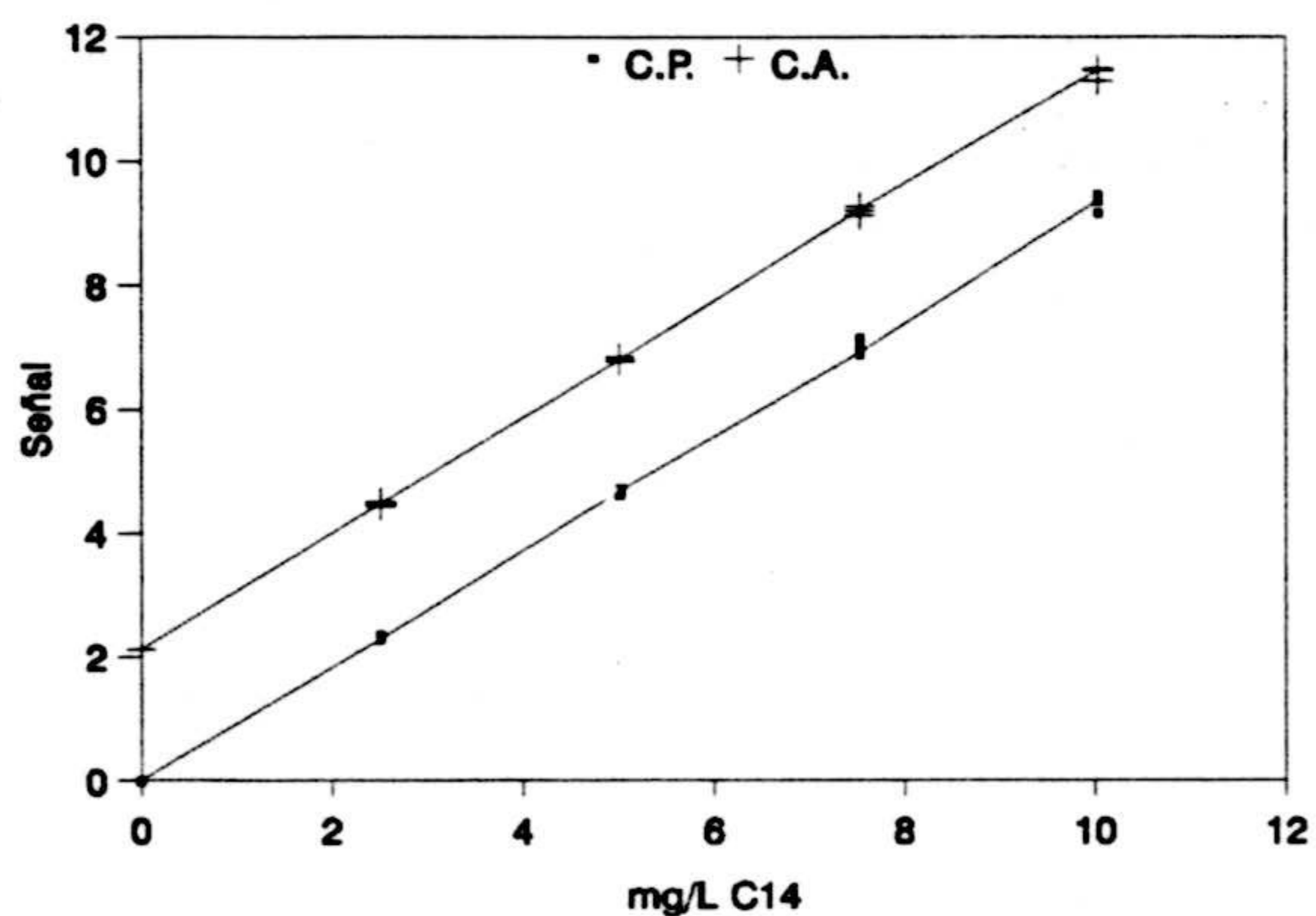


Figura IV.74.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>14</sub>.

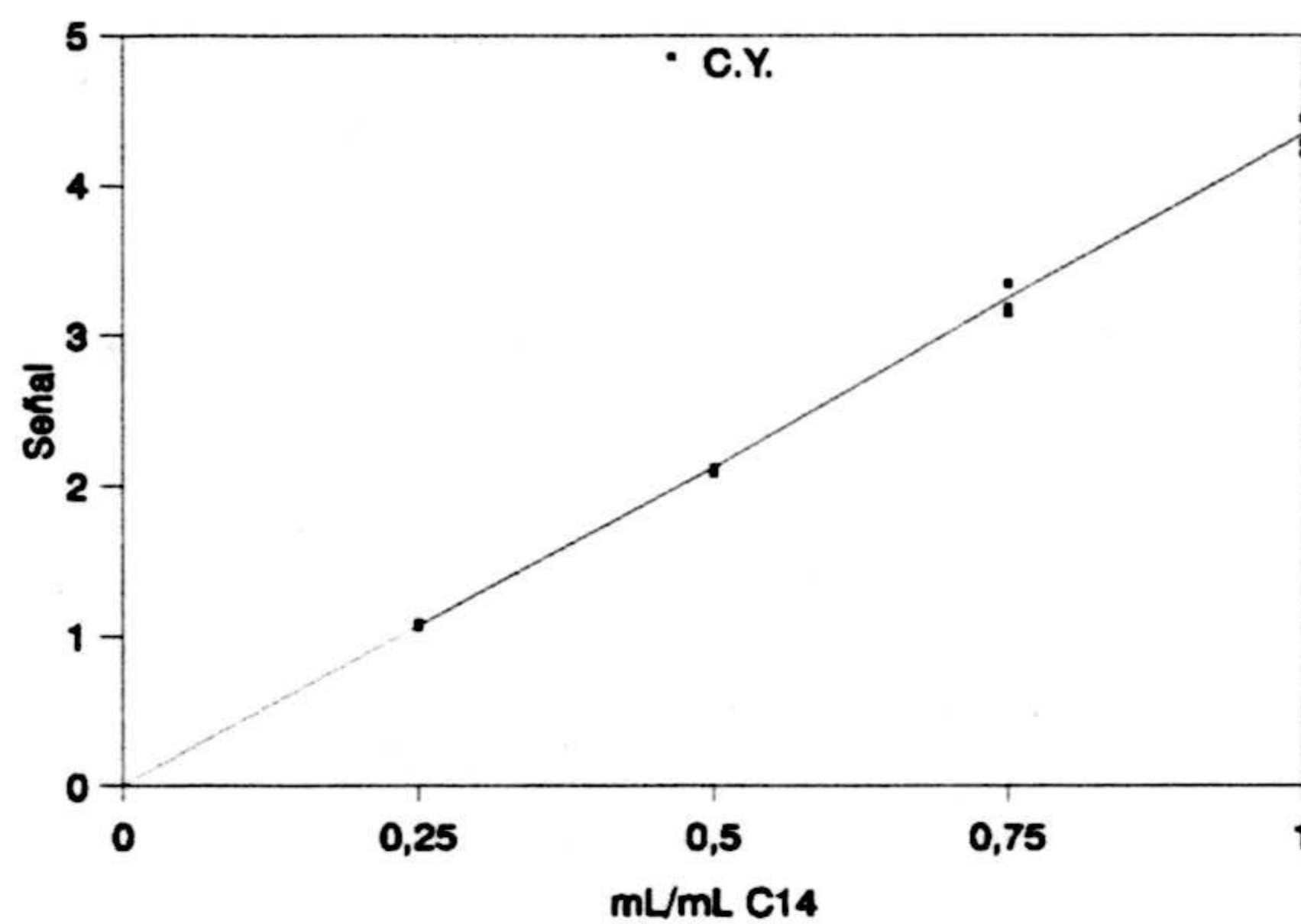


Figura IV.75.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>14</sub>.

**Tabla IV.52.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el **ácido palmítico**.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0021	4.6369	0.0683
<b>b</b>	0.9425	0.9304	9.0840
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0619	0.0437	0.1334
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0568		
<b>t(b)</b>	1.2976 ( P = 20 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9385		
<b>a'</b>	0.0173	4.5980	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0510
<b>c<sub>x,S</sub></b>	4.8394	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	4.8267	-----
<b>t(c)</b>	0.5512 ( P = 58 %)		



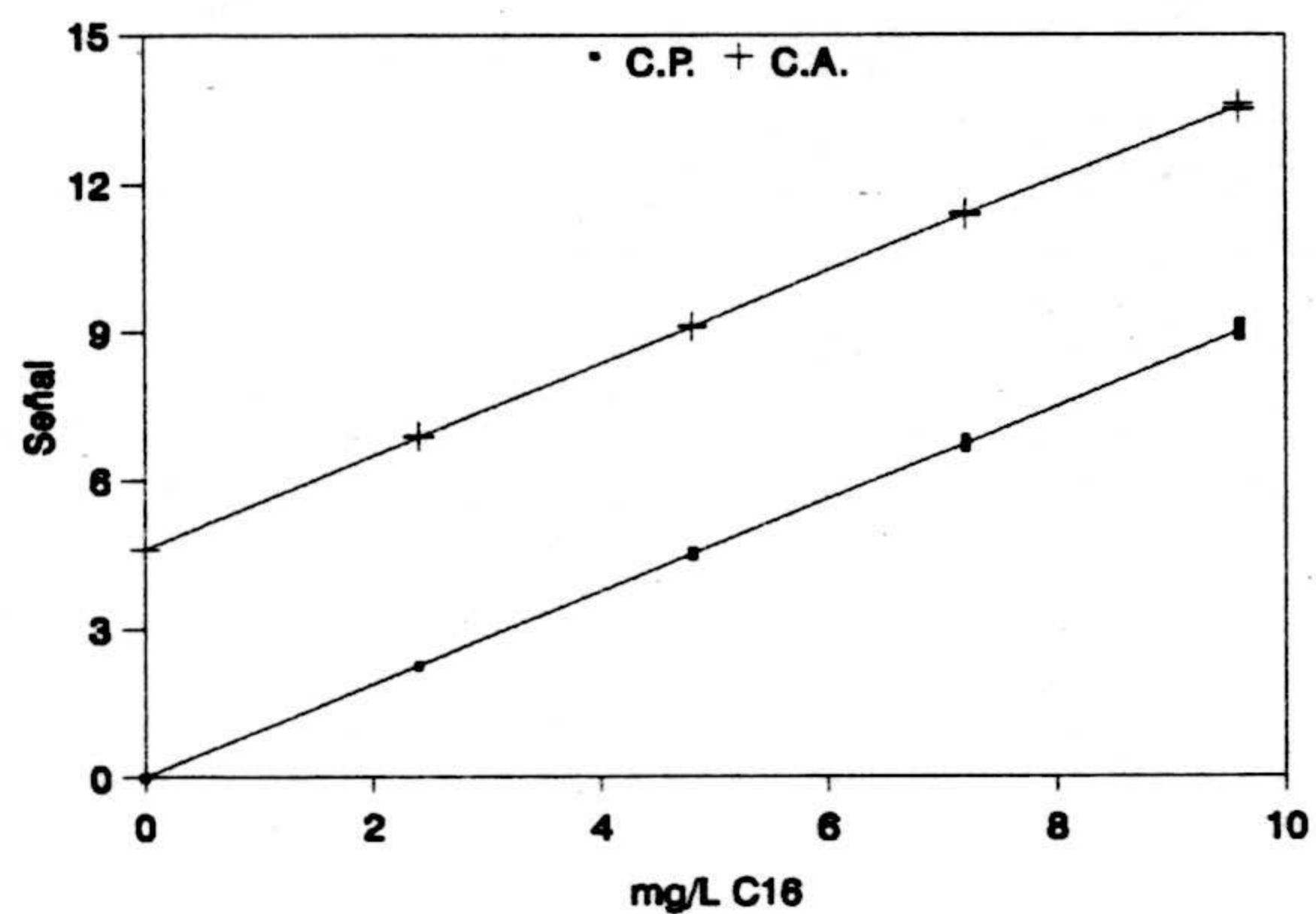


Figura IV.76.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>16</sub>.

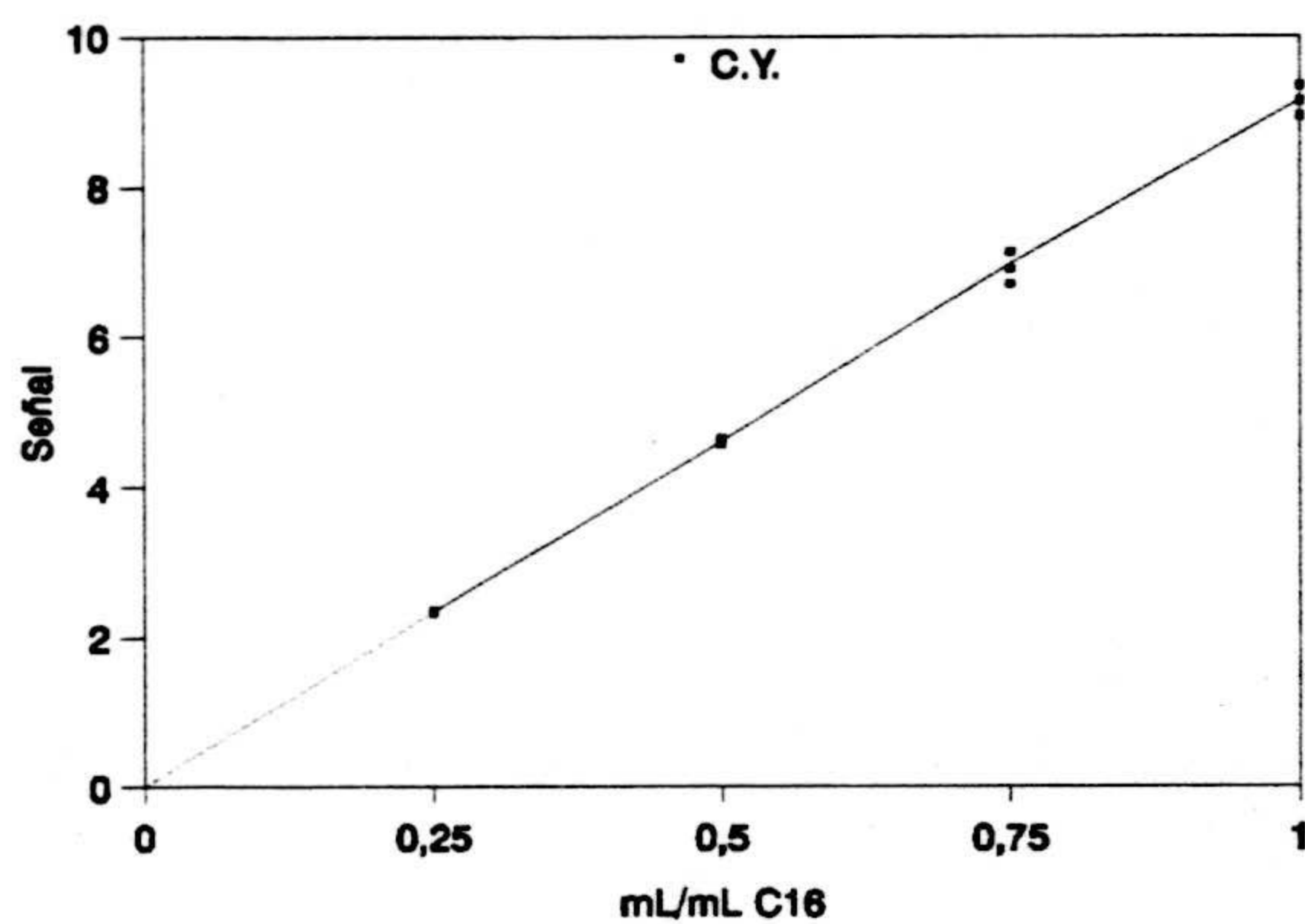


Figura IV.77.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>16</sub>.

**Tabla IV.53.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y YC. para el **ácido oléico**.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0047	6.8211	-0.0583
<b>b</b>	0.9175	0.9090	13.2707
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0535	0.1018	0.1198
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0724		
<b>t(b)</b>	1.3776 ( P = 18 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9146		
<b>a'</b>	0.0195	6.7913	-----
<b>BY</b>	-----	-----	-0.0779
<b>c<sub>x,S</sub></b>	7.4874	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	7.4888	-----
<b>t(c)</b>	0.0423 ( P = 95 %)		

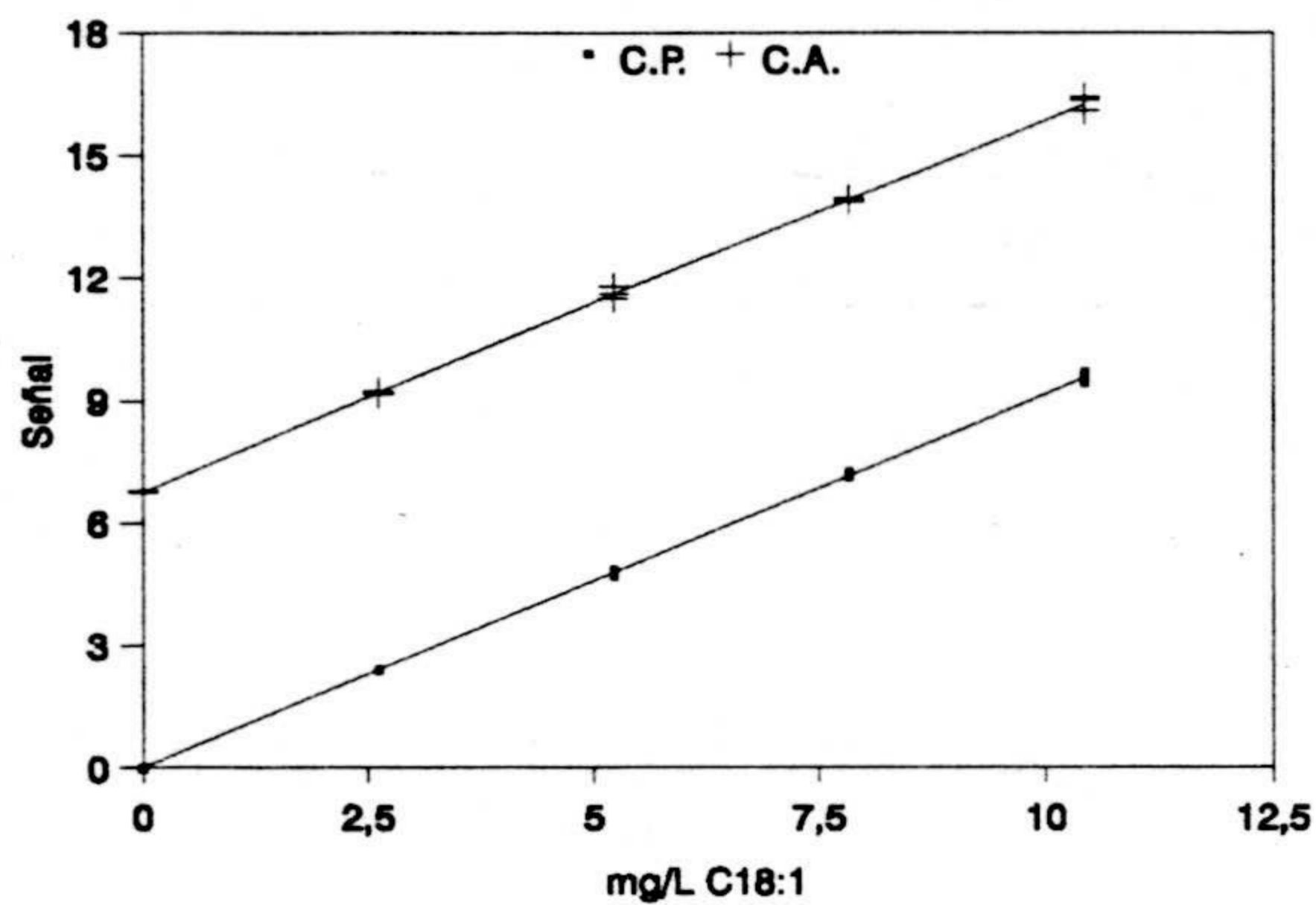


Figura IV.78.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18:1</sub>.

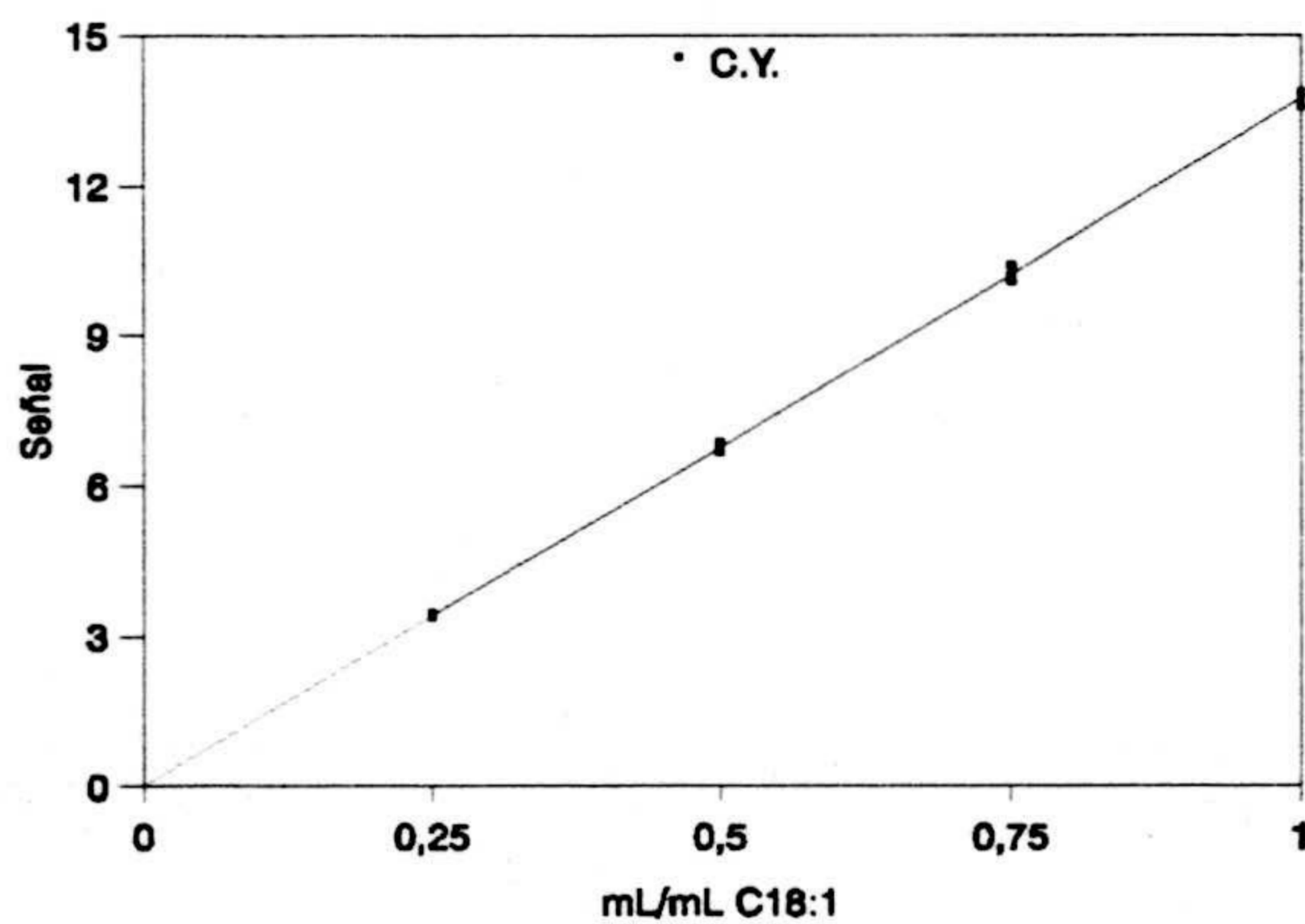


Figura IV.79.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18:1</sub>.

**Tabla IV.54.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y CY. para el ácido esteárico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0010	0.5735	0.0013
<b>b</b>	0.9574	0.9621	1.1451
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0072	0.0101	0.0072
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0082		
<b>t(b)</b>	0.7517 ( P = 46 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.9592		
<b>a'</b>	-0.0002	0.5754	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0015
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.5981	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.5985	-----
<b>t(c)</b>	0.1219 ( P = 90 %)		

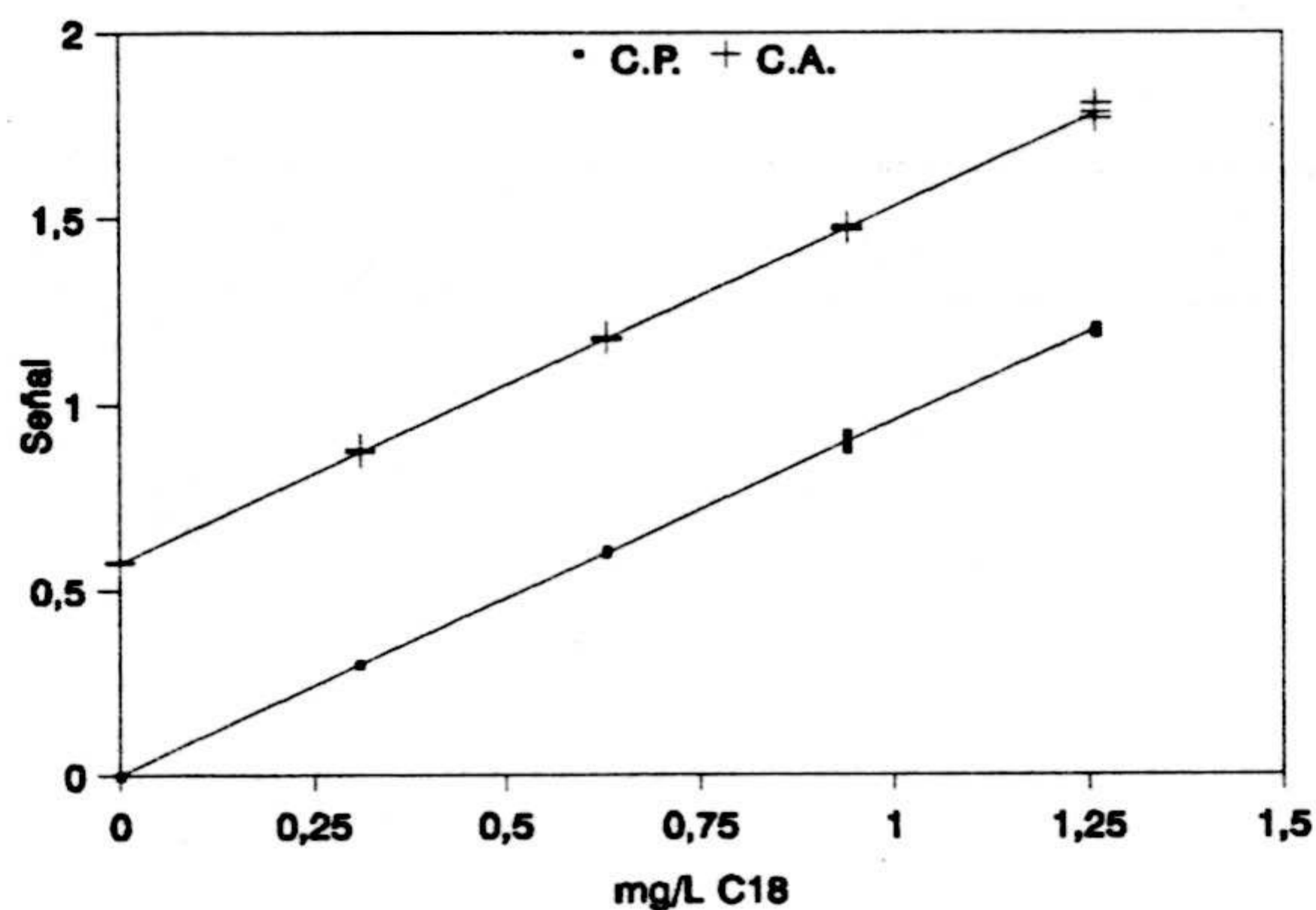


Figura IV.80.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>18</sub>.

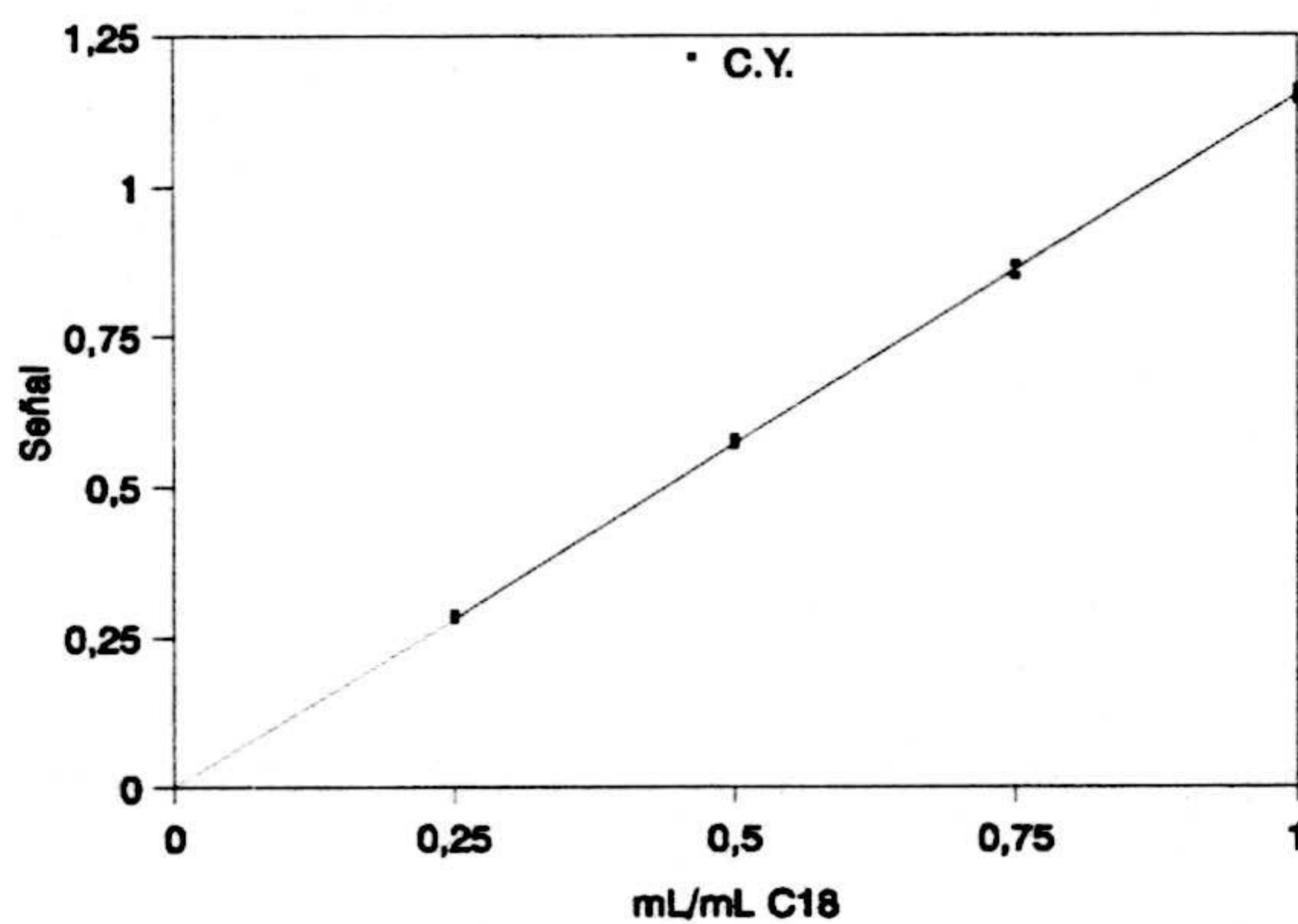


Figura IV.81.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>18</sub>.

**Tabla IV.55.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y CY. para el ácido aráquico.

PARÁMETROS	CP	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	-0.0014	0.2458	0.0007
<b>b</b>	0.8295	0.8319	0.4920
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0065	0.0078	0.0059
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0069		
<b>t(b)</b>	0.4252 ( P = 66 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.8302		
<b>a'</b>	-0.0018	0.2467	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0025
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.2967	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.2963	-----
<b>t(c)</b>	0.1374 ( P = 98 %)		

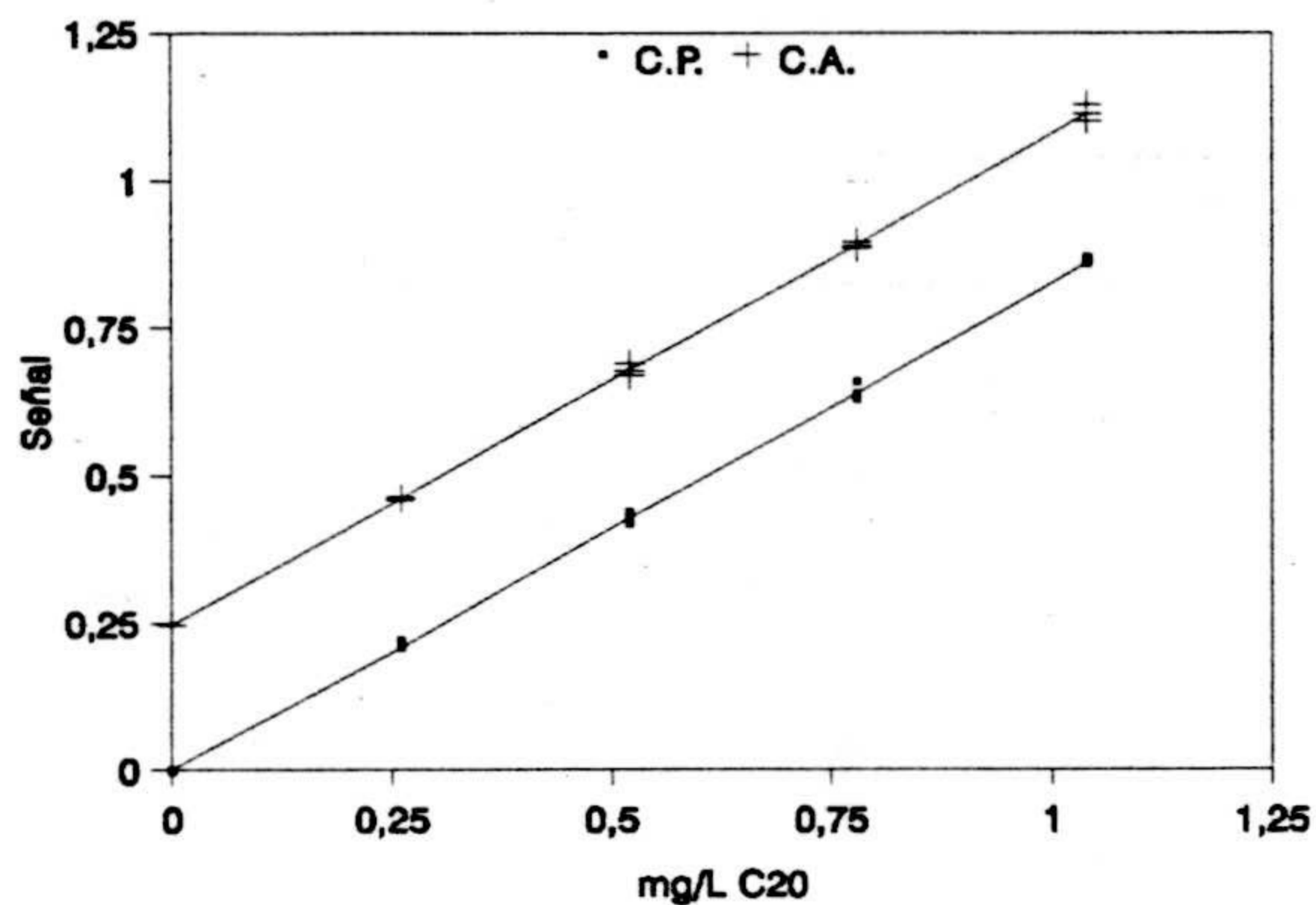


Figura IV.82.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>20</sub>.

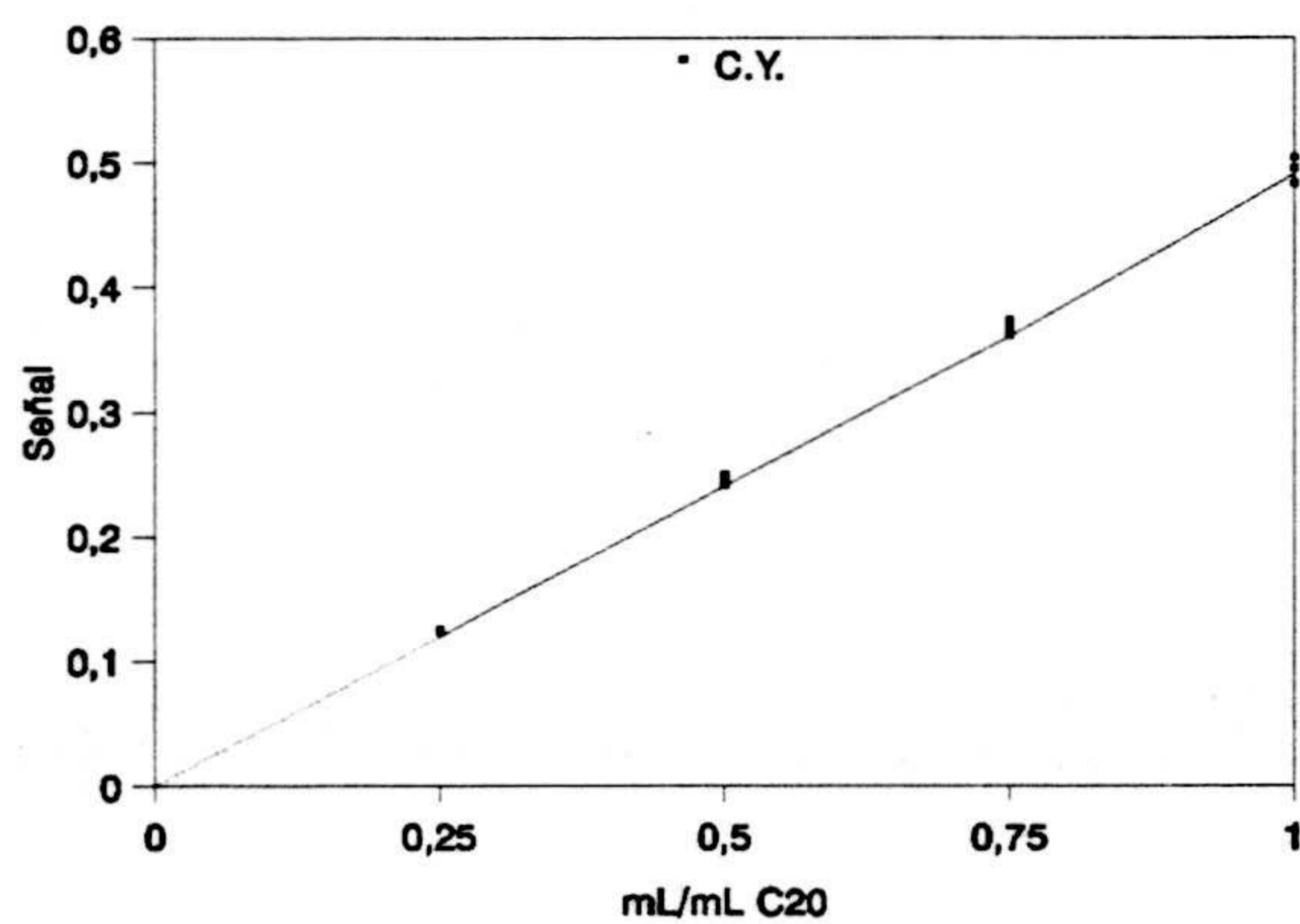


Figura IV.83.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>20</sub>.

**Tabla IV.56.-** Valores numericos de los parámetros correspondientes a los calibrados CP, AC y CY. para el ácido behénico.

PARÁMETROS	CS	CA	CY
<b>n</b>	30	15	12
<b>a</b>	0.0006	0.3813	0.0035
<b>b</b>	0.7585	0.7599	0.7519
<b>S<sub>yx</sub></b>	0.0064	0.0061	0.0120
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0063		
<b>t(b)</b>	0.2694 ( P = 78 %)		
<b>b<sub>p</sub></b>	0.7589		
<b>a'</b>	0.0004	0.3818	-----
<b>BY</b>	-----	-----	0.0031
<b>c<sub>x,S</sub></b>	0.4961	-----	-----
<b>c<sub>x,A</sub></b>	-----	0.4984	-----
<b>t(c)</b>	0.7413 ( P = 54 %)		



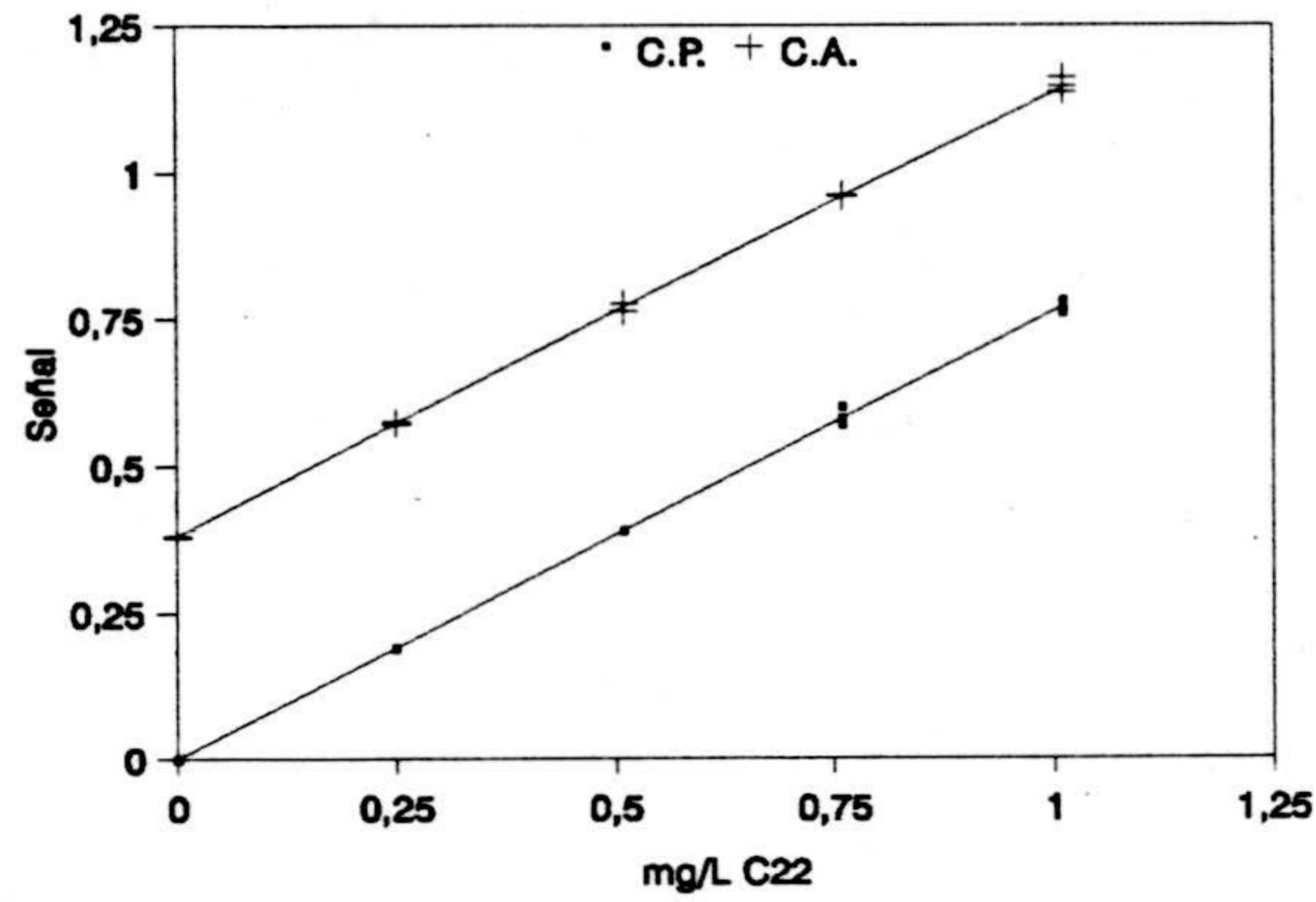


Figura IV.84.- Calibrado con patrones C.A. y calibrado con adición de patrón C.A. para el éster C<sub>22</sub>.

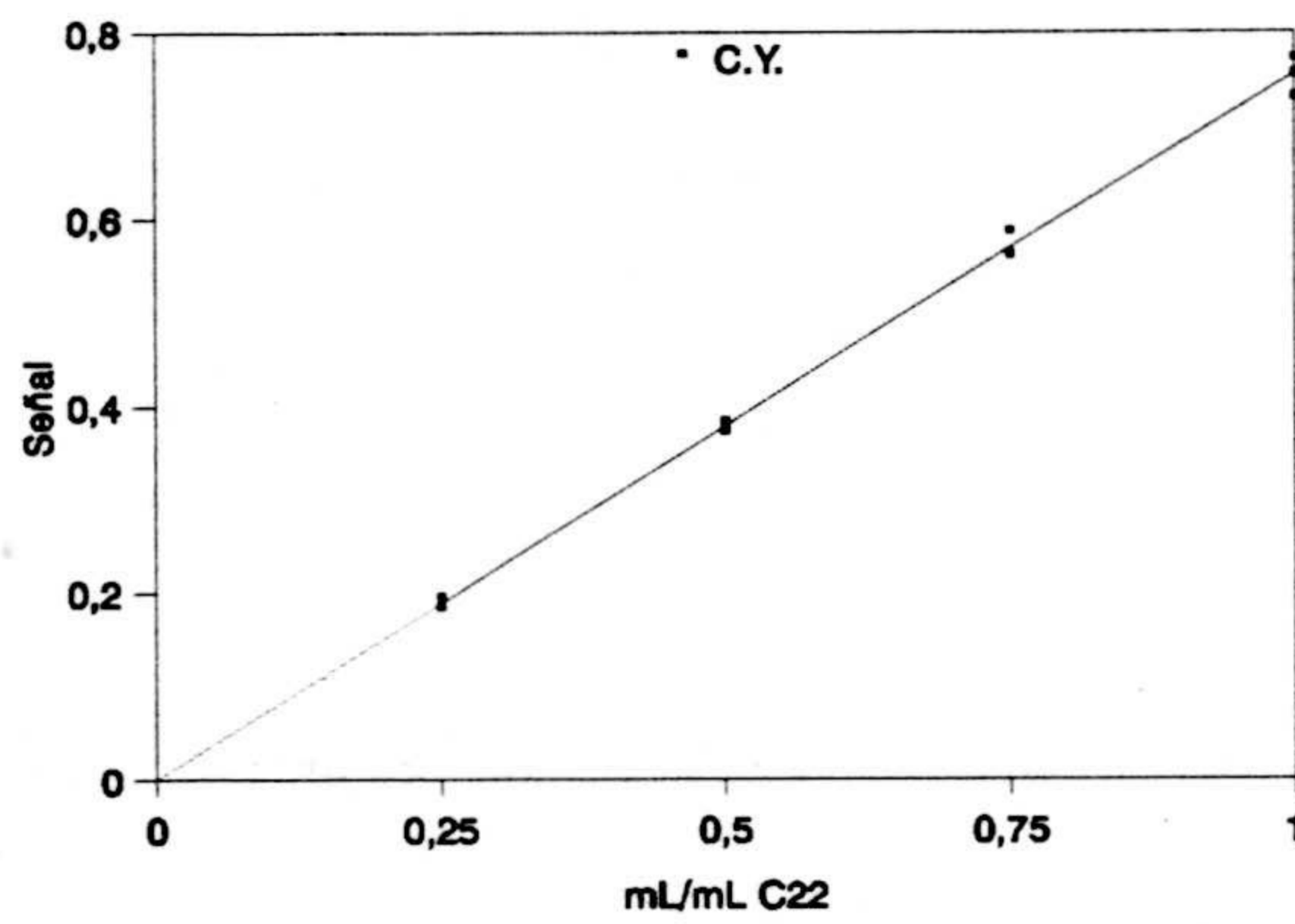


Figura IV.85.- Calibrado de youden C.Y. para el éster C<sub>22</sub>.

### 3.3.5.- *Comentario de los resultados obtenidos.-*

3.3.5.1- Comparación de pendientes. Se observó que en todos los casos obtenemos una conclusión no significativa, o sea al concluir por  $H_0$  ( $P > 10\%$ ) las pendientes son iguales. Se comprobó la existencia de una ordenada en el origen positiva por lo que la adición de patrón provoca un error sistemático constante.

3.3.5.2.- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a_S'$ .

3.3.5.3.- Comprobación de la exactitud del método analítico. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), o sea el método es exacto para todos los ácidos grasos con un nivel de significación mayor del 5%.

3.3.5.4.- Conclusión. El método queda validado para la extracción de los ácidos grasos presentes en agua potable de la ciudad de Granada..

### 3.4.- Análisis de la muestra.

Una vez validado el método se procedió a realizar el análisis de una muestra de agua residual bruta de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de la ciudad de Granada. Para realizar esta experiencia se aplicó el método analítico a la muestra y la señal obtenida se llevó directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizaron tres análisis de agua residual bruta. Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla IV.57.

**Tabla IV.57.-** Contenido en ácidos grasos en el agua residual bruta de una EDAR de la ciudad de Granada.

	[A] mg/L			$\bar{[A]}$ mg/L	$s_{[A]}$ mg/L	$\Delta[A]$ $t_{0.05,28}=2.048$	Ácidos grasos mg/L
	1	2	3				
C <sub>8</sub>							±
C <sub>10</sub>							±
C <sub>12</sub>							±
C <sub>14</sub>							±
C <sub>16</sub>							±
C <sub>18</sub>							±
C <sub>18:1</sub>							±
C <sub>20</sub>							±
C <sub>22</sub>							±



## **4.- APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS A FANGOS DE DEPURADORA.**

### **4.1.- Introducción.**

En la tabla IV.58 se muestra la composición de un fango final digerido de la EDAR seleccionada para su estudio, en ella puede apreciarse la complejidad de la matriz estudiada. Generalmente poseen un alto contenido en ácidos grasos debido al bajo rendimiento que presenta la degradación de éstos en las distintas etapas de tratamiento de la EDAR. Hemos abordado la aplicación del método propuesto a la determinación de ácidos grasos en esta matriz, llevando a cabo un estudio similar al desarrollado en el caso de las aguas residuales.

Tabla IV.58.- Composición del fango de E.D.A.R.

Parámetro	Contenido
pH	7.2
Materia seca (%)	19
Materia orgánica (%)	60
Nitrógeno total, N (%)	3.7
Fósforo total, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	7.8
Potasio total, K <sub>2</sub> O (%)	0.2
Sodio total, Na <sub>2</sub> O (%)	0.1
Calcio total, CaO (%)	8.6
Magnesio total, MgO (%)	2.7
Hierro, Fe (mg/Kg)*	6150
Zinc, Zn (mg/Kg)*	614
Cobre, Cu (mg/Kg)*	260
Plomo, Pb (mg/Kg)*	175
Niquel, Ni (mg/Kg)*	32
Cromo, Cr (mg/Kg)*	44
Cadmio, Cd (mg/Kg)*	2
Mercurio, Hg (mg/Kg)*	3

\* referido a peso de matriz seca.

## 4.2.- Aplicación del método al análisis de Fangos de EDAR.

### 4.2.1.- Preparación de la muestra.-

Los fangos de depuradora se someten a una deshidratación final dentro de la EDAR mediante el proceso descrito en la página. Esta deshidratación es incompleta por lo que es necesario someterlos a un proceso de desecación previa mediante una adecuada calefacción. El procedimiento es el que se describe a continuación.

Se pesa una cantidad conocida de fango húmedo dentro de una cápsula de porcelana. A continuación se introduce en una estufa a 105°C hasta constancia de peso. Una vez esté el fango seco, se pulveriza finamente para aumentar la superficie del fango. Para la pulverización se ha empleado un molino de bolas.

En este punto calculamos la humedad del fango según la expresión:

$$\frac{M_{F.H.} - M_{F.S.}}{M_{F.H.}} \times 100 = \% \text{ HUMEDAD}$$

F.H., fango EDAR húmedo

F.S., fango EDAR seco

Con este fango de EDAR seco se desarrollaran todas las experiencias posteriores.

#### *4.2.2.- Tiempo de agitación/sonicación.*

El problema más importante en el análisis de los ácidos grasos en matrices sólidas reside en la extracción de los mismos para ser adecuadamente analizados. Este problema es resuelto en general a través de una extracción sólido-líquido lo que origina elevados tiempos de análisis (ref). Los resultados satisfactorios obtenidos con el ultrasonidos para el caso del agua residual nos indujo a emplearlo en este sistema también. Para ello se dispersó el fango seco con agua desionizada y se le aplicó la agitación mecánica junto con el baño de ultrasonidos.

Para ello se realizó la siguiente experiencia: Se tomaron 30 mg de fango seco, se le agregaron 500 mL de agua desionizada. Se le fijó el pH a un valor de 1, y fue sometida a una agitación mecánica en un baño de ultrasonidos durante tiempos variables (3-24 horas). Al finalizar este proceso se les agregó 50 mL de diclorometano a cada una. Las mezclas se introducen en embudos de decantación de 1000 mL y se agitan durante un minuto. Se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Una vez separadas las fases se toma la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro y a continuación la inyectamos en el cromatógrafo. En la tabla IV.59 se muestran los resultados obtenidos.



**Tabla IV.59.-** Áreas obtenidas para diferentes tiempos de agitación/sonicación.

ÉSTERES METÍLICOS	Tiempo agitación/sonicación (horas)				
	3	6	12	18	24
	A	A	A	A	A
Ácido Caprílico	1720	2100	2153	2005	2200
Ácido Cáprico	1835	2350	2450	2391	2295
Ácido Láurico	1354	1890	1935	2001	1897
Ácido Mirístico	2134	2552	2598	2456	2601
Ácido Palmítico	9876	11253	11523	11356	11126
Ácido Oléico	1535	1998	2065	2110	2000
Ácido Esteárico	7456	9890	10068	9675	9950
Ácido Aráquico	1234	1620	1702	1585	1630
Ácido Behénico	1459	1863	1798	1880	1852

---

Como observamos en la tabla a partir de las 6 horas de sonicación se estabilizan las áreas medidas para los ácidos grasos contenidos en la muestra de fango estudiada. Por este motivo para experiencias posteriores someteremos a la dispersión (fango-agua desionizada) a 6 horas de agitación/sonicación, antes de proceder a aplicarle el método de extracción completo.

#### ***4.2.3.- Relación volumen masa fango/agua de ósmosis.***

Experiencias previas nos indicaron que si se trata una masa de fango superior a 100 mg se origina una emulsión en el proceso de extracción. Para evitar este hecho se procedió de la siguiente manera. Se tomaron diferentes masas de fango 20, 30, 40 y 50 mg, se enrasaron a 500 mL con agua desionizada y se fijó el pH a un valor de 1. Las muestras se sometieron a 6 horas de agitación/sonicación. Al finalizar esta operación se les agregó 50 mL de diclorometano a cada una. Las mezclas se trasvasaron a embudos de decantación de 1000 mL y se agitaron durante un minuto. Se dejó en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen. Se comprobó que a partir de 40 mg de fango se formaba una emulsión persistente que dificultaba el proceso de extracción. Para experiencias posteriores se tomaran 30 mg de fango seco.

#### **4.2.4.- Establecimiento del método de extracción de ácidos grasos en fangos de depuradora.**

La optimización de las variables anteriormente descritas nos ha permitido proponer el siguiente método para la determinación de ácidos grasos en fangos de EDAR.

Se toman 10 g de fango deshidratado de EDAR. Se secan a 105°C hasta pesada constante y se pulveriza el fango. Se toman 30 mg y se completan hasta 500 mL con agua desionizada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 50 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 1000 mL y se agita durante un minuto. A continuación se deja en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168.

### **4.3.- Validación del método de extracción de los ácidos grasos de fangos de depuradora.**

La verificación de la exactitud del método propuesto se realizó mediante la comparación con un método de referencia. Los resultados obtenidos en la aplicación de ambos métodos se contrastan mediante un test de comparación de dos medias independientes.

Como método de referencia vamos a utilizar el que fue propuesto por a. Moreno y col.(ref), los cuales emplean una extracción sólido-líquido Soxhlet para la extracción de los ácidos grasos contenidos en fangos de depuradora.

#### ***4.3.1.- Método de referencia.***

Este método ha sido propuesto por G. Almendros y col. Se pesaron 2 g de fango seco y se les extrajeron todos los lípidos presentes mediante un Soxhlet usando eter de petróleo (40-60°C) durante 70 horas. Se tomaron 0.5g de extracto seco del fango, se mezclaron con 0.3 g de  $K_2CO_3$  y 0.1 g de EDTA-3K. La mezcla se diluyó en 2.5 mL de agua desionizada, se calentó hasta ebullición, durante 5 minutos. A continuación se secó a 60°C en un horno adecuado. La reacción que producida es la siguiente:



La sal potásica formada (R-COOK) se extrae en un Soxhlet usando 200 mL de metanol durante 24 horas. Al extracto metanólico obtenido está listo ya para la determinación de ácidos grasos.

#### ***4.3.2.- Desarrollo experimental de ambos métodos.***

Para aplicar la metodología estadística de la comparación de dos medias independientes se procedió de la siguiente manera:

##### ***4.3.2.1.- Método propuesto.***

Se tomaron 20 g de fango deshidratado de depuradora y se secaron en una estufa a 105°C hasta pesada constante. A continuación se pulverizó finamente, se pesaron 30 mg de éste y se suspendieron en 500 mL de agua desionizada. Mediante adición de HCl 1:1 se lleva el pH del medio a 1 y se somete a la muestra a una agitación mecánica acompañada de una agitación por ultrasonidos. Al finalizar este proceso se le agrega 50 mL de diclorometano. Se introduce en un embudo de decantación de 1000 mL y se agita durante un minuto. Se dejó en reposo el embudo de decantación para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las mismas se

separa la fase orgánica, se seca con sulfato sódico anhidro, se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página . Se repite la operación diez veces con el fango seco y pulverizado. Los resultados se muestran en la tablas IV.60 - IV.68.

#### *4.3.2.2.- Método de referencia.*

---

Se pesaron 2 g de fango seco y se les extrajeron todos los lípidos presentes mediante un Soxhlet usando eter de petróleo (40-60°C) durante 70 horas. Se tomaron 0.5g de extracto seco del fango, se mezclaron con 0.3 g de  $K_2CO_3$  y 0.1 g de EDTA-3K. La mezcla se diluyó en 2.5 mL de agua desionizada, se calentó hasta ebullición, durante 5 minutos. A continuación se secó a 60°C en un horno adecuado. Se extrajo en un Soxhlet usando 200 mL de metanol durante 24 horas. El extracto metanólico obtenido se esterifica y se inyecta en el cromatógrafo de gases siguiendo el método descrito en la página 168. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.60 - IV.68.

**Tabla IV.60.-** Resultados obtenidos para el ácido caprílico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	945	0.606	991	0.619	1106	0.685
	1017	0.739	1057	0.613	962	0.694
	993	0.619	790	0.677	1267	0.653
	1128	0.637	974	0.672	969	0.579
	935	0.744	1128	0.624	878	0.595
	839	0.637	933	0.590	969	0.558
	972	0.579	878	0.644	888	0.660
	943	0.548	941	0.651	1055	0.669
	944	0.590	928	0.514	902	0.625
	1187	0.695	994	0.689	1075	0.620
	<b>Cociente medio = 0.634; s = 0.054; DSR % = 8.45</b>					
<b>Método propuesto</b>	984	0.763	984	0.777	1010	0.768
	1009	0.745	979	0.761	1017	0.805
	935	0.739	978	0.765	1027	0.761
	1046	0.800	1012	0.803	971	0.757
	977	0.791	1009	0.768	1045	0.811
	1078	0.780	979	0.800	979	0.773
	1004	0.779	1085	0.805	970	0.798
	982	0.758	985	0.771	999	0.764
	1045	0.781	1037	0.803	972	0.770
	1077	0.796	1014	0.752	1069	0.785
	<b>Cociente medio = 0.778; s = 0.020; DSR % = 2.55</b>					

Tabla IV.61.- Resultados obtenidos para el ácido cáprico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	1020	0.768	1176	0.899	1106	0.887
	983	0.742	1330	0.988	883	0.705
	1071	0.817	1048	0.830	1023	0.750
	1270	0.977	1097	0.872	1145	0.877
	911	0.707	1088	0.807	1167	0.889
	1014	0.746	914	0.736	1111	0.893
	1111	0.836	1081	0.808	1126	0.880
	1186	0.897	1163	0.884	1182	0.894
	976	0.762	1168	0.943	1024	0.791
	1363	0.996	964	0.753	1125	0.828
<b>Cociente medio = 0.839; s = 0.054; DSR % = 9.80</b>						
<b>Método propuesto</b>	1337	1.036	1273	1.005	1324	1.006
	1413	1.043	1376	1.069	1287	1.019
	1269	1.003	1236	0.966	1410	1.044
	1396	1.067	1263	1.003	1331	1.039
	1261	1.020	1354	1.031	1304	1.012
	1400	1.013	1275	1.043	1258	0.993
	1305	1.012	1391	1.033	1195	0.984
	1316	1.017	1321	1.035	1271	0.972
	1327	0.992	1274	0.987	1277	1.012
	1433	1.058	1403	1.041	1401	1.029
<b>Cociente medio = 1.020; s = 0.020; DSR % = 2.55</b>						



Tabla IV.62.- Resultados obtenidos para el ácido láurico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	7761	5.845	6749	5.156	6876	5.516
	6678	5.041	7082	5.257	7597	6.068
	8187	6.246	6123	4.850	7435	5.447
	6853	5.272	6322	5.028	8213	6.288
	5993	4.648	8223	6.100	6546	4.989
	6512	4.787	7193	5.794	6032	4.849
	7109	5.350	8706	6.512	7606	5.942
	6653	5.030	7141	5.432	8817	6.671
	6571	5.136	5932	4.794	6292	4.864
	7582	5.543	7408	5.781	7852	5.783
	<b>Cociente medio = 5.467; s = 0.559; DSR % = 10.233</b>					
<b>Método propuesto</b>	8487	6.578	8595	6.783	8423	6.398
	8455	6.239	8246	6.410	8291	6.566
	7726	6.108	8558	6.691	8291	6.139
	8594	6.568	8211	6.518	8211	6.408
	7499	6.068	8344	6.350	8489	6.590
	8555	6.189	7879	6.443	8284	6.542
	8397	6.517	8764	6.505	7895	6.501
	8088	6.247	8041	6.299	8181	6.257
	8213	6.138	8315	6.443	8310	6.585
	8396	6.203	9082	6.738	8595	6.314
	<b>Cociente medio = 6.411; s = 0.192; DSR % = 3.01</b>					

Tabla IV.63.- Resultados obtenidos para el ácido mirístico.

	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.
<b>Método</b>	9076	6.838	8983	6.861	8097	6.495
<b>Referencia</b>	7741	5.844	9112	6.764	8779	7.012
	10022	7.646	8430	6.677	8629	6.322
	8888	6.837	8623	6.858	10349	7.924
	8119	6.296	8902	6.604	8516	6.491
	8673	6.375	7209	5.807	7566	6.083
	10705	8.056	9288	6.947	9090	7.101
	10035	7.587	8705	6.622	10407	7.875
	9285	7.257	8322	6.726	10581	8.180
	10471	7.655	9932	7.750	10074	7.420
<b>Cociente medio = 6.964; s = 0.648; DSR % = 9.31</b>						
<b>Método</b>	11169	8.657	10993	8.676	11606	8.816
<b>propuesto</b>	11303	8.341	10962	8.521	10367	8.210
	10216	8.077	10784	8.431	11184	8.282
	9825	7.510	10904	8.655	10708	8.357
	10203	8.255	11110	8.455	10905	8.465
	11468	8.296	10001	8.179	10703	8.452
	10507	8.155	11030	8.187	9523	7.841
	10899	8.418	10632	8.329	10660	8.153
	10686	7.986	10551	8.176	10321	8.179
	11359	8.391	11277	8.366	10840	7.963
<b>Cociente medio = 8.293; s = 0.265; DSR % = 3.20</b>						

**Tabla IV.64.-** Resultados obtenidos para el ácido palmítico.

	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	6706	5.052	6962	5.317	6275	5.033
	7239	5.465	7269	5.396	6558	5.239
	8935	6.817	7546	5.977	8673	6.354
	6063	4.665	7774	6.182	6977	5.342
	7986	6.193	8177	6.066	8207	6.255
	7592	5.580	6845	5.514	7502	6.031
	6953	5.233	6759	5.055	6272	4.900
	8779	6.638	7378	5.612	8175	6.186
	6779	5.299	6589	5.326	8611	6.657
	6578	4.809	7030	5.485	7129	5.251
<b>Cociente medio = 5.631; s = 0.585; DSR % = 10.38</b>						
<b>Método propuesto</b>	8432	6.536	8104	6.396	8726	6.628
	9097	6.713	8484	6.595	8530	6.755
	8993	7.109	8735	6.829	8752	6.481
	8169	6.243	8439	6.699	8703	6.793
	8659	7.006	8869	6.749	8804	6.834
	9089	6.575	7894	6.456	8543	6.746
	8582	6.661	9463	7.024	8225	6.772
	9141	7.060	8558	6.705	8855	6.773
	8712	6.511	8652	6.704	7841	6.214
	8676	6.409	8949	6.640	9192	6.753
<b>Cociente medio = 6.679; s = 0.219; DSR % = 3.26</b>						

Tabla IV.65.- Resultados obtenidos para el ácido esteárico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método</b>	7613	5.736	7028	5.368	7982	6.402
<b>Referencia</b>	6017	4.542	7514	5.578	6635	5.300
	7151	5.456	7088	5.614	7858	5.757
	8313	6.395	6742	5.362	7197	5.510
	8069	6.258	6237	4.627	7482	5.703
	7092	5.213	6864	5.529	6874	5.526
	7084	5.331	8839	6.611	6702	5.236
	6928	5.238	7977	6.068	6053	4.580
	8238	6.438	6437	5.202	6633	5.128
	8226	6.014	6148	4.797	7314	5.387
<b>Cociente medio = 5.530; s = 0.546; DSR % = 9.87</b>						
<b>Método</b>	8455	6.554	8672	6.844	8634	6.558
<b>propuesto</b>	9369	6.914	7859	6.109	7865	6.228
	8316	6.574	8002	6.256	8969	6.641
	8658	6.617	8091	6.422	8384	6.544
	8176	6.615	7911	6.020	8349	6.481
	8809	6.372	8397	6.867	8306	6.559
	8250	6.403	8736	6.484	7196	5.925
	8753	6.761	8546	6.695	8798	6.729
	8802	6.578	8461	6.557	8122	6.437
	9052	6.687	8652	6.419	9056	6.652
<b>Cociente medio = 6.517; s = 0.234; DSR % = 3.60</b>						

**Tabla IV.66.-** Resultados obtenidos para el ácido oléico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método</b>	14812	11.159	13504	10.314	12312	9.876
<b>Referencia</b>	11343	8.563	11674	8.666	13396	10.700
	12033	9.180	11208	8.879	11983	8.779
	10981	8.448	12113	9.633	11280	8.636
	12330	9.562	11699	8.678	14763	11.253
	11888	8.738	12323	9.927	11123	8.942
	12487	9.397	13120	9.813	12053	9.416
	13871	10.488	13198	10.040	12340	9.337
	12216	9.548	12636	10.213	10995	8.500
	12199	8.918	13062	10.192	11499	8.469
<b>Cociente medio = 9.476; s = 0.811; DSR % = 8.55</b>						
<b>Método</b>	14704	11.397	14768	11.655	15360	11.668
<b>propuesto</b>	15899	11.732	14724	11.445	14910	11.807
	14835	11.728	15554	12.159	14922	11.050
	14264	10.902	14909	11.835	14713	11.483
	13921	11.264	15661	11.917	15310	11.884
	16703	12.083	14263	11.664	14795	11.684
	14509	11.260	15496	11.502	13219	10.884
	14999	11.585	14725	11.536	15057	11.516
	15024	11.228	14734	11.417	14515	11.504
	14986	11.070	15760	11.693	15829	11.628
<b>Cociente medio = 11.539; s = 0.314; DSR % = 2.73</b>						

Tabla IV.67.- Resultados obtenidos para el ácido aráquico.

	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.	Área ( $\times 10^4$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	1081	0.814	1035	0.791	1113	0.893
	1012	0.764	1009	0.749	1041	0.832
	1085	0.828	1132	0.896	1219	0.893
	975	0.750	1074	0.854	892	0.683
	993	0.770	1135	0.842	1072	0.817
	1218	0.895	964	0.776	1018	0.818
	1155	0.869	1049	0.785	1179	0.921
	1124	0.850	936	0.712	1020	0.771
	885	0.692	888	0.718	1098	0.849
	1030	0.753	1101	0.859	1053	0.776
<b>Cociente medio = 0.807; s = 0.065; DSR % = 8.00</b>						
<b>Método propuesto</b>	1297	1.005	1175	0.927	1253	0.952
	1294	0.955	1193	0.927	1201	0.951
	1168	0.923	1249	0.976	1323	0.980
	1233	0.942	1226	0.973	1192	0.931
	1146	0.927	1359	1.034	1241	0.963
	1309	0.947	1187	0.970	1179	0.931
	1271	0.986	1260	0.935	1145	0.943
	1240	0.958	1250	0.979	1220	0.933
	1343	1.003	1176	0.912	1119	0.886
	1267	0.936	1323	0.982	1294	0.951
<b>Cociente medio = 0.954; s = 0.031; DSR % = 3.25</b>						

**Tabla IV.68.-** Resultados obtenidos para el ácido behénico.

	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.	Área ( $\times 10^{-4}$ )	Coc.
<b>Método Referencia</b>	957	0.721	887	0.677	669	0.537
	1083	0.818	932	0.692	969	0.774
	985	0.751	859	0.681	1267	0.928
	961	0.739	940	0.748	814	0.623
	1025	0.795	1145	0.849	935	0.712
	1031	0.758	1175	0.946	972	0.782
	1148	0.864	965	0.721	956	0.747
	978	0.739	690	0.525	992	0.750
	1079	0.844	930	0.751	902	0.698
	993	0.726	919	0.717	1029	0.758
<b>Cociente medio = 0.745; s = 0.092; DSR % = 12.27</b>						
<b>Método propuesto</b>	1163	0.901	1069	0.843	1137	0.864
	1182	0.872	1090	0.847	1067	0.845
	1168	0.923	1152	0.901	1129	0.836
	1124	0.859	1101	0.874	1110	0.867
	1072	0.867	1149	0.874	1142	0.886
	1194	0.864	1145	0.937	1132	0.894
	1105	0.858	1198	0.889	1044	0.860
	1192	0.920	1134	0.888	1146	0.876
	1199	0.896	1101	0.853	1107	0.877
	1143	0.844	1149	0.852	1134	0.833
<b>Cociente medio = 0.873; s = 0.026; DSR % = 3.00</b>						

**Tabla IV.69.-** Resultados obtenidos con ambos métodos de extracción.

	<b>Método empleado</b>	
	Método propuesto	Soxhlet
	mg g <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>
Ácido Caprílico	0.288 ± 0.003	0.282 ± 0.009
Ácido Cáprico	0.353 ± 0.003	0.349 ± 0.013
Ácido Laurico	5.76 ± 0.06	5.89 ± 0.23
Ácido Mirístico	2.97 ± 0.04	2.99 ± 0.10
Ácido Palmítico	7.09 ± 0.09	7.17 ± 0.28
Ácido Esteárico	2.25 ± 0.03	2.29 ± 0.08
Ácido Oleico	12.58 ± 0.13	12.40 ± 0.40
Ácido Aráquico	0.384 ± 0.005	0.390 ± 0.012
Ácido Behénico	0.384 ± 0.004	0.393 ± 0.018

#### **4.3.3.- Comparación de los resultados de ambos métodos.**

Para la comparación de las medias obtenidas con ambos métodos siguió el siguiente proceso:

**4.3.3.1.- Contraste de varianzas.-** Test de Snedecor (distribución F de Fisher).

Es necesario hacer previamente este test, ya que dependiendo de los



resultados de éste (varianzas iguales o distintas), se seleccionará el test de comparación de medias adecuado, así:

- Varianzas iguales, test de Student.
- Varianzas distintas, test de Welch.

Las hipótesis planteadas en el test de Snedecor son:

$H_0 \equiv \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  (las varianzas no difieren significativamente)

$H_1 \equiv \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$  (ambas son significativamente distintas)

El estadístico de contraste calculado es :  $F_{\text{cal}} = s_1^2 / s_2^2$  ( $s_1^2 > s_2^2$ )

El estadístico de contraste tabulado es :  $F_{\text{tab}} \alpha = 0.05$  ( $n_1 - 1, n_2 - 1$  g. l.)

Si  $F_{\text{cal}} \geq F_{\text{tab}} \equiv H_1$

Si  $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}} \equiv H_0$

#### 4.3.3.2.- *Contraste de medias.-*

Una vez comprobada la igualdad o no de varianzas se procede a realizar el correspondiente test de comparación de medias independientes.

Las hipótesis planteadas son:

$H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$  (las medias no difieren significativamente)

$H_1 \equiv \mu_1 \neq \mu_2$  (ambas son significativamente distintas)

A) Para varianzas iguales se aplica el test de Student.

Se calcula la varianza conjunta mediante la expresión:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Para  $n_1, n_2 \leq 30$ , se calcula el estadístico de contraste t de Student:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$t_{tab} \alpha = 0.05 (n_1 + n_2 - 2 \text{ g. l.})$$

B) Para varianzas distintas se aplica el test de Welch.

En esta ocasión no se puede calcular la varianza promedio al ser

ambas distintas. El estadístico de contraste calculado viene dado por la expresión:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

$t_{tab}$   $\alpha = 0.05$ , con los grados de libertad dados por la siguiente expresión:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)}{n_2 - 1}}$$

C) Conclusiones para ambos test:

$$\text{Si } t_{cal} \geq t_{tab} \equiv H_1$$

$$\text{Si } t_{cal} < t_{tab} \equiv H_0$$

#### 4.3.3.3.- Empleo de STATGRAPHICS.

El desarrollo de todo este cálculo para cada una de las nueve parejas de valores que tenemos se ha hecho mediante STATGRAPHICS.

**Tabla IV.70.-** Parámetros estadísticos obtenidos al realizar el test de comparación de dos medias independientes.

	$F_{cal}$	I.C.R.V.	D.M.	I.C.D.M.	g.l.	$t_{cal}$	P %
$C_8$	0.10	0.05-0.20 (D)	0.006	-0.003-0.015	34.5	1.37	21
$C_{10}$	0.07	0.03-0.15 (D)	0.004	-0.009-0.017	33.0	0.67	51
$C_{12}$	0.08	0.04-0.17 (D)	-0.135	-0.367-0.098	33.7	1.17	25
$C_{14}$	0.12	0.06-0.24 (D)	-0.023	-0.132-0.086	35.7	0.43	67
$C_{16}$	0.10	0.05-0.20 (D)	-0.083	-0.372-0.206	34.5	0.58	56
$C_{18}$	0.13	0.06-0.27 (D)	-0.041	-0.130-0.048	36.3	0.94	35
$C_{18:1}$	0.10	0.05-0.22 (D)	0.184	-0.229-0.597	35.0	0.90	37
$C_{20}$	0.16	0.08-0.34 (D)	-0.006	-0.018-0.007	38.0	0.99	33
$C_{22}$	0.06	0.03-0.12 (D)	-0.009	-0.028-0.009	32.3	1.03	31

$F_{cal}$ , estadístico de contraste calculado para el test de Snedecor; I.C.R.V., intervalo de confianza para la relación de varianzas; D, varianzas distintas; D.M., diferencia de medias; I.C.D.M., intervalo de confianza para la diferencia de medias; g.l., grados de libertad;  $t_{cal}$ , estadístico de contraste calculado para el test de Welch; P %, nivel de significación para el test de comparación de medias.

STATGRAPHICS no proporciona el valor P para el test de Snedecor, pero en su lugar aplica un test de intervalo para la relación de varianzas que viene dado por la siguiente expresión:

$$\left(\frac{s_1^2}{s_2^2}\right)\left(\frac{1}{F_{\alpha/2}(n_1 - 1; n_2 - 1)}\right) < \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} < \left(\frac{s_1^2}{s_2^2}\right)(F_{\alpha/2}(n_1 - 1; n_2 - 1))$$

dando el intervalo de confianza para la relación de varianzas (I.C.R.V.). Las varianzas serán iguales cuando el mismo contenga al uno (ya que si  $s_1^2/s_2^2 = 1$ ), y si no contiene al uno las varianzas serán distintas.

En la tabla observamos que aparece otro término, intervalo de confianza para la diferencia de medias (I.C.D.M.). Este término no es necesario para realizar el test pero STATGRAPHICS lo calcula mediante la expresión, (para varianzas distintas):

$$\mu_1 - \mu_2 \in \left[ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \right] \pm t_\alpha \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

A la vista de los resultados expresados en la tabla anterior, podemos concluir diciendo que las varianzas de ambos métodos son distintas, siendo mayor la variabilidad presentada por el método de referencia. Por otra parte

podemos concluir diciendo también que nuestro método es exacto ya que los valores de P obtenidos en el test de comparación de medias para cada ácido graso, son todos mayores del 5 %.

## CONCLUSIONES





1.- Se ha propuesto una nueva metodología para la medida de la señal correspondiente al blanco cromatográfico y su posterior aplicación al cálculo del límite de detección según el criterio recomendado por la IUPAC.

Así para la medida del área correspondiente al blanco cromatográfico se calcula la anchura de pico a concentración cero  $W_b$  mediante la expresión:

$$W_b = 2.548 W_{0.5h}$$

donde la anchura de pico a mitad de altura  $W_{0.5h}$  a concentración cero se calcula representando este parámetro en función de la concentración y extrapolando a concentración cero. Una vez calculada la anchura de pico a concentración cero ( $W_b$ ) integramos ese intervalo del cromatograma centrado en el tiempo de retención específico del analito, obteniendo así la correspondiente señal del blanco cromatográfico. Su estudio estadístico nos permitirá calcular la desviación estándar y poder establecer el límite de detección del método.

2.- Se ha comprobado bajo que condiciones de respuesta el calibrado mediante patrón interno cumple los requisitos estadísticos necesarios para poder realizar un ajuste por mínimos cuadrados.

Así se ha observado que para un valor de desviación estándar relativa del patrón interno mayor del 10 %, el cociente de áreas no se ajusta a una distribución normal, por lo que no es recomendable establecer un calibrado por mínimos cuadrados. Sin embargo el valor de desviación estándar relativa del analito no afecta a la normalidad de los cocientes de áreas.

3.- Se ha desarrollado un método para la determinación de ácidos grasos en diferentes matrices por cromatografía de gases-espectrometría de masas, para lo cual se han optimizado tanto las variables instrumentales como las variables químicas específicas para cada matriz.

Ante la necesidad de derivar los analitos se ha seleccionado la reacción de esterificación con  $F_3B$  en medio metanol.

4.- Se han estudiado los diferentes parámetros instrumentales que influyen en el proceso cromatográfico. Así la optimización de las variables que afectan a la inyección cromatográfica nos ha permitido proponer los siguientes valores óptimos:

<b>Variable</b>	
Flujo de purga del septum	3 mL/min
Flujo total	100 mL/min
Presión cabeza columna	15 psi
Tiempo de purga	2 min
Temperatura del bloque de inyección	200 °C

5.- El estudio de las variables asociadas a la separación cromatográfica nos ha permitido establecer como óptimos los siguientes valores de las mismas:

<b>Variable</b>	<b>Valor óptimo</b>
Flujo volumétrico del gas portador	1.23 mL/min
Velocidad lineal del gas portador	45.3 cm/s
Temperatura inicial de la columna	75 °C
Gradiente de temperatura	30 °C/min
Temperatura final	270 °C

6.- Del estudio realizado sobre la influencia de las distintas variables asociadas al detector de masas, nos ha permitido seleccionar los siguientes valores óptimos:

Variable	Valor óptimo
Temperatura de la interfase	280 °C
<b>MODO SCAN</b>	
Rango m/z del espectro de masas	50-400 m/z
Número de medidas de cada ion	3
Valor umbral de detección	250
Voltaje del electrón-multiplicador	Automático
Tiempo de borrado del disolvente	3 min
<b>MODO SIM</b>	
Iones seleccionados	55 y 74 m/z
Iniciación del análisis de cada ión	7,5 y 3 min
Tiempo de medida de cada ión	100 ms

7.- La optimización de todas las variables anteriores nos ha permitido establecer un método cromatográfico para la determinación de los ácidos grasos caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, aráquico y behénico válido en el rango de concentración 0.02 - 10 mg.L<sup>-1</sup>.

8.- Para la aplicación del método propuesto a disoluciones acuosas se ha estudiado el proceso de extracción líquido-líquido comprobándose como más idoneas las siguientes condiciones operatorias:

Variable	Valor óptimo
Disolvente orgánico	diclorometano
Razón de fases	1:10
Efecto salino	no influye
Tiempo de agitación	1 min
pH	1

9.- Para verificar la exactitud del método se han realizado estudios de recuperación de ácidos grasos en muestras de agua potable de la ciudad de Granada. la validación se ha realizado mediante la metodología de adición de patrón.

10.- Se ha aplicado el método propuesto a la extracción de ácidos grasos en las formulaciones comerciales: NIVEA, TOJADERMO (jabones) y MICOLOR, LEL (polvos de acción intensa), validándose satisfactoriamente, mediante la metodología de adición de patrón.

11.- Para la aplicación del método a la determinación de ácidos grasos en aguas residuales, se ha seleccionado la Estación Depuradora de Aguas Residuales de la ciudad de Granada por presentar baja contaminación en residuos industriales. Se ha comprobado que operando a pH 1 y empleando el baño de ultrasonidos basta con 6 h para que la extracción de los ácidos grasos sea cuantitativa. Este hecho contrasta con lo expuesto en bibliografía

que necesita un periodo de extracción al menos de 72 h.

12.- El método propuesto es así mismo validado para la determinación de estos analitos en fangos EDAR. En este caso el proceso de extracción se realizó sobre una suspensión de la muestra en agua desionizada a pH uno y durante 6 h en baño de ultrasonidos. El método ha sido validado mediante comparación con la extracción sólido-líquido Soxhlet.