



T
664.36
MOR

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE

TECNOLOGO EN ALIMENTOS

REALIZADO EN:

LA FABRIL S. A.

AUTOR:

Shone Ramiro Morales Parrales

Profesora Guía:

Profesor Segunda Revisión:

Mae. Gloria Bajaña Jurado MSc. Carlos Poveda Loor

AÑO LECTIVO

2010 - 2011

GUAYAQUIL - ECUADOR

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRÁCTICAS PROFESIONALES

Previo a la obtención del Título de Tecnólogo en Alimentos

Realizado en :

LA FABRIL S.A.

Autor:

SHONE RAMIRO MORALES PARRALES

Profesor Guía


Mae. Gloria Bajaña Jurado

Profesor Segunda Revisión


MSc. Carlos Poveda Loo

AÑO LECTIVO

2010 · 2011

GUAYAQUIL · ECUADOR

Manta, 06 de Mayo de 2010.



Señor
MSc. Ing. Carlos Poveda Loor
Coordinador del Protal
En su despacho.-

Yo, **SHONE RAMIRO MORALES PARRALES** con número de cédula 1711145084 me dirijo a usted cordialmente para solicitarle me conceda su debida autorización para presentar mi trabajo de Práctica Profesional para la Obtención del título de Tecnólogo en Alimentos, el mismo que fue ya presentado, revisado pero por inconvenientes en la demora del mismo, luego de empastar ya no se le dio la acogida respectiva aduciendo que el tiempo de sustentación había pasado y además argumentando que los profesores para la sustentación no tenían ya tiempo y que sus agendas eran muy apretadas no daba cabida a mi trabajo, además por no residir ya en la ciudad de Guayaquil porque la oportunidad de trabajo se me presentó en la ciudad de Manta no pude seguir con el trámite respectivo, pues como es de su conocimiento la obtención y conservación de un puesto de trabajo es muy complicado, y este fue el motivo que me impidió seguir con el trámite.

Ruego a usted también por medio de la presente se me designe un **TUTOR** para así concluir con los requisitos legales que ameriten, sin otro particular.

De antemano agradezco por la acogida a la misma.

Atte.

Shone R. Morales
C.I 1711145084



10 de mayo del 2010.- Considerando lo expuesto por el estudiante Shone Morales Parrales, esta Coordinación designa a los siguientes Docentes para la supervisión de su informe final.

Primera Revisión: Mae. Gloria Bajaña Jurado
Segunda Revisión: MSc. Carlos Poveda Loor

Una vez concluido con la revisión de este Informe, definir inmediatamente la fecha de sustentación para que el estudiante pueda estar listo para la próxima graduación.

Atentamente

MSc. CARLOS POVEDA LOOR
Coordinador de PROTAL.

Archivo



EVALUACIÓN DEL PRACTICANTE
Práctica Profesional

Nombre del Practicante: Shonel Romiro Morales Porrales
Denominación del cargo: Ayudante de laboratorio de Análisis

a) Asigne una calificación del 01 al 10 en cada una de los siguientes aspectos. Si alguno no es aplicable, por favor sólo coloque N/A:

1. Interés en el trabajo	<u>9</u>
2. Conocimientos	<u>10</u>
3. Organización	<u>9</u>
4. Habilidad para aprender	<u>10</u>
5. Creatividad	<u>10</u>
6. Puntualidad	<u>9</u>
7. Cumplimiento de las normas de seguridad	<u>9</u>
8. Cantidad de trabajo (rendimiento)	<u>10</u>
9. Relaciones con el personal	<u>10</u>
10. Habilidad para comunicarse	<u>10</u>
11. Responsabilidad	<u>10</u>
12. Trabajo bajo presión	<u>10</u>

b) Marque con una cruz

- Durante el desarrollo de la práctica el estudiante acogió favorablemente críticas y sugerencias?
Siempre A menudo Rara vez Nunca
- De los 90 días hábiles, qué porcentaje no asistió?
0 - 10% Más del 10%
- La jornada de trabajo semanal fue de:
5 días 6 días
- El promedio de horas trabajadas/día fue de:
Menos de 6 horas 6 - 8 horas

c) Comentarios adicionales

Cumplió con todas las tareas recomendadas.

d) Información proporcionada por:

Nombre: Ivan Zambrano H.
Cargo: Jefe de laboratorio Nombre Empresa: La Fabril
Teléfono: 052920091 E. 5618 Fecha: 16 de Octubre 2009
Firma y Sello:

SÓLO PARA USO EXCLUSIVO DEL ESTUDIANTE PRACTICANTE:

- Qué porcentaje de la formación recibida fue puesta en práctica? 75%
(Del 0 al 100%)



LA FABRIL S.A
DEP. INVEST & DESARROLLO

AREA: ANALISIS INSTRUMENTAL

Manta, 15 de Octubre del 2009

CERTIFICACIÓN

Por medio de la presente certifico que el Sr. SHONE RAMIRO MORALES PARRALES portador de la cédula de identidad No. 1711145084 ha realizado sus pasantías en el Área de Laboratorio de Análisis Instrumental, sección Aceites y Grasas, de nuestra empresa, desde 02 Marzo del 2009 hasta 14 Octubre del 2009, donde ha demostrado ser responsable y cumplidor en las tareas encomendadas.

Por tanto autorizo al Sr. Shone Morales Parrales, para que haga uso del presente certificado como estime conveniente.

Responsable

Ing Ivan Zambrano H

Jefe Lab. Análisis Instrumental

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
DETALLES DEL TRABAJO REALIZADO.....	5
ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA.....	6
Breve historia de la Empresa	
Localización de la misma	
Mercado al que se Destina el Producto	
Tamaño de Producción	
Organigrama de la Empresa	
DIAGRAMA DE FLUJO.....	9
DESCRIPCION DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN.....	10
Recepción	
Refinación Química o Alcalina – Neutralización	
Refinación Física	
Desodorización	
Fraccionamiento	
Almacenamiento	
METODOS DE ANALISIS INSTRUMENTAL.....	13
DETERMINACION FAME POR CROMATOGRAFIA DE GASES	13
Fundamento de la Técnica	
Equipos	
Procedimiento del Análisis	
Condiciones Cromatográficas.	
Gráficos de Análisis.....	17
Teoría: Cromatografía de Gases	

DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS POR HPLC.....	38
Fundamentó de la Técnica	
Equipos	
Reactivos	
Preparación de la Muestra	
Teoría: Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia (HPLC)	
Gráficos de Análisis.....	59
 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
 BIBLIOGRAFIA.....	72
 ANEXOS.....	73



RESUMEN

La Fabril S.A. es una empresa que invierte en lo que se refiere a investigación, pues lo hace en su campo como lo es en la producción de Aceites y Grasas, para lo cual el control y desarrollo de nuevos productos, tiene algunos equipos especializados en lo que se refiere a análisis instrumental.

En el presente informe se pone a consideración la teoría del método de separación cromatográfica gaseosa que sirve para el análisis Fame (Determinación de ácidos grasos libres por GC), dado por la AOCS Ce d5-86, y el empleo del HPLC (cromatografía líquida de alta presión).

Se presenta el proceso de refinación de palma cruda, para obtención de los diferentes tipos de grasas y aceites comercializados por la empresa.

Se pone a consideración una teoría sobre cromatografía tanto gaseosa y líquida como método de separación, se esquematiza los dos tipos de equipos con sus partes se ponen ejemplos de cromatogramas como guía en el proceso de separación de los esteres de ácidos grasos.

La interpretación de datos es muy compleja pues se debe además de ser diestro en el manejo del equipo y de su software el conocimiento químico del analito a estudiar o analizar.



INTRODUCCIÓN

La composición de los ácidos grasos de los aceites, de las grasas comestibles y los lípidos extraídos de los alimentos es un indicio importante de calidad, una de las metas fundamentales que la empresa Fabril cumple en las especificaciones para sus clientes.

La Química Analítica se ocupa de los métodos de determinación de la composición química de la materia. Un método cualitativo informa sobre identidad de las especies atómicas o moleculares de la muestra o de los grupos funcionales que hay en ella, por otra parte un método cuantitativo aporta información numérica de la cantidad relativa que hay de uno o varios de estos componentes.

A todo método más moderno para la separación y determinación de especies químicas se los conoce, en conjunto como Métodos Instrumentales. Un instrumento para el análisis químico transforma la información relacionada con las propiedades físicas o químicas del analito en información que pueda ser manipulada e interpretada por un ser humano.

Por tanto, un instrumento analítico puede considerarse como una herramienta de comunicación entre el Objeto de estudio y la persona que lo estudia que es el investigador.

El empleo de equipos tan costosos por su funcionamiento y su manutención son empleados por lo general para la confirmación de un producto terminado pero aun así pueden ser utilizados para el mejoramiento de un proceso de producción.



DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO

El horario de las prácticas profesionales fue de 8h00 a 16h00 de lunes a viernes, bajo la supervisión Jefe del Laboratorio de Análisis Instrumental. Dentro de ese tiempo se a recibido capacitación en las siguientes tareas:

- Manejo de Cromatógrafo de Gases
- Análisis FAME (Metilación de ácidos grasos) de grasas y aceites y otros de productos, generalmente lo relacionado con Control de Calidad y Producción. Preparación de muestras, metilación y corridas cromatográficas.
- Interpretación y Manejo de Datos FAME,
- Mantenimiento de Generador de Hidrógeno para GC.
- Elaboración de Reportes de Análisis Instrumental para el jefe del laboratorio
- Mantenimiento de Datos de Análisis Instrumental.
- Logística de Laboratorio: Preparación de Reactivos, Transporte de Solventes, Recolección y Desecho de Muestras, etc.

ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

BREVE HISTORIA

La Fabril se inicio en 1968 comercializando algodón y en tan solo una década logró convertirse en una de las desmotadoras más importantes del país.

En 1978 se estableció como extractora y refinadora de aceites y grasas vegetales extraídas del algodón y de la soya, llegando a procesar 3 toneladas al día.

En décadas de 1980 se puso en marcha la primera planta continua de refinación física incrementando la producción a 33 toneladas al día. Se adquiere la primera hacienda de palma africana. Se lanza al mercado mantecas 100% vegetales, sin sabor y en empaques reutilizables. Se crea una nueva línea de jabones. Se amplió las plantaciones a 4.000 hectáreas de palma africana.

En 1990 se crea el centro de Investigación y Desarrollo e inicia trabajos en la nueva planta de refinación y fraccionamiento, se empieza a producir margarinas en la planta original para, luego de pocos años, poner en marcha una nueva planta con tecnología avanzada. A finales de año se compra las marcas de OLEICA y se juntan con grasas UNICOL para la distribución de dichos productos.

Se inicia PROMTO “Proceso de Mejoramiento Continuo Todos hacia la Calidad y la Productividad”, para conseguir la certificación ISO 9000.

En el 2002, se adquiere la planta La Favorita a la transnacional UNILEVER juntos con la marca de Aceite: Favorita, Favorita Light, Criollo, Favorita Achiote, Margarinas Marva y Hojaldrina.

Actualmente se contribuye al desarrollo de la sociedad ecuatoriana a través de la generación de más de 1300 plazas de trabajo directas y a la provisión de productos y servicios de alta calidad que impulsan actividades comerciales secundarias que dinamizan la economía ecuatoriana.

LOCALIZACIÓN DE LA MISMA

Su ubicación es en la Provincia de Manabí el Km 5 ½ vía Manta - Montecristi.

MERCADO AL QUE SE DESTINA EL PRODUCTO

Es la única empresa de aceite y grasa del Ecuador que está presente en el mercado Internacional con productos terminados. Se exporta a Chile, Perú Colombia, Venezuela y Panamá. En el campo industrial. La Fabril S.A. es líder en el mercado con más del 80

% de participación. En la industria pesquera posee el 98% de participación.

Desde el punto de vista del mercado nacional e Internacional, la Fabril se convierte en una de las más grande Industria del País. A nivel nacional, el producto está destinado a las diferentes industrias como son: Inepeca, Nutrinisa, Econsa, Pronaca, Confiteca, Guss, Ecuamaís, Empesec, Frigomar, Fresmar, Impesca, Oriental del Ecuador, Isabel, etc.

CIBT

TAMAÑO DE PRODUCCIÓN

Sección Blanqueo: 4000 Tn/mes

Sección de Refinería 2 y 3: 1039 Tn/mes

Sección de Refinería 5: 4900 Tn/día

Sección de Desodorizado: 1870 Tn/mes.



ORGANIGRAMA

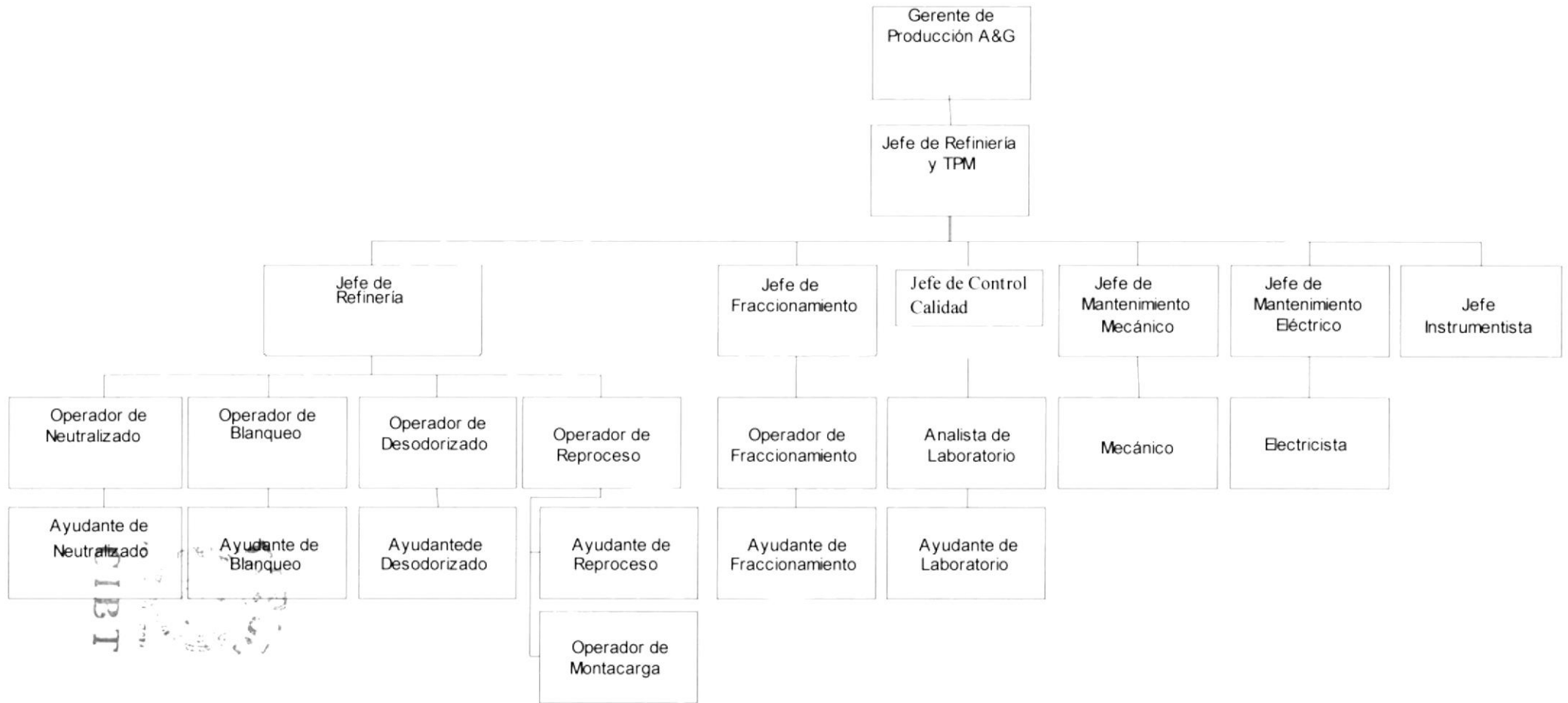
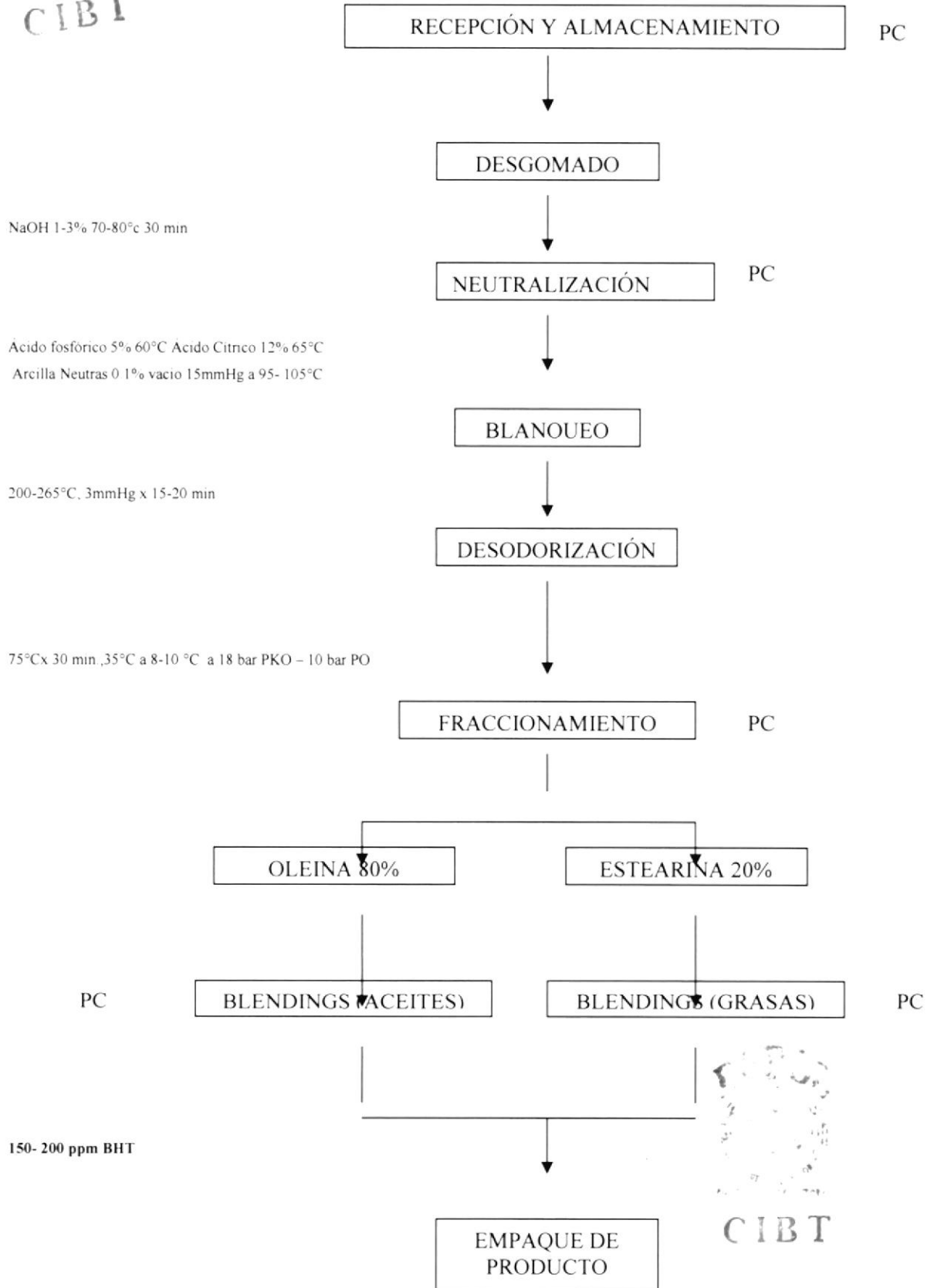




DIAGRAMA DE FLUJO ACEITE DE PALMA



DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

RECEPCIÓN

El aceite de palma o palmiste ingresa a la fábrica transportado por grandes tanqueros, los mismos que son conducidos hacia la báscula en donde son pesados, se realiza toma de muestra para el departamento de Control de Calidad, que servirá para realizar los análisis correspondientes como acidez, color, impurezas. El aceite crudo es depositado en tanques de almacenamiento con capacidad de 18000tn, para luego ser procesado. Posteriormente el tanquero es pesado nuevamente después del descargue, para confirmar si realmente es el peso declarado en la hoja de registro.

Proveedores de materia prima:

Río Manso, Palma del Río, Teobroma, Quevepalma, Agro sexta, Palesema, Unipal, Palcien, Pexa, Agroparaiso, Danayma, Palmisa, Agroaceites, Palmera de los Ríos.

REFINACIÓN QUÍMICA O ALCALINA

NEUTRALIZACIÓN

En esta etapa se eliminan los ácidos grasos libres contenidos en el aceite mediante el tratamiento con hidróxido de sodio o soda cáustica (reacción de Saponificación), formándose de esta manera los jabones insolubles en aceite. Posteriormente se procede a centrifugar la mezcla para obtener el subproducto denominado Borra. A continuación el aceite se trata con ácido Fosfórico a 60 °C durante 15 – 30 minutos, con el fin de que las gomas (fosfátidos) se vuelvan cada vez más insolubles en el aceite de manera que se facilite su eliminación. Luego se procede a agregar hidróxido de sodio entre 1 – 3 %, se mezcla en frío y se calienta por un período de 20 a 30 minutos a 70 – 80 °C formándose entonces dos fases: jabonosa que sedimenta por simple gravedad y la fase ligera que se lava con agua o soluciones ácidas por varias veces para reducir el contenido de jabón a menos de 50 ppm. El aceite ya refinado es entonces secado hasta que se obtenga 0,001 % de humedad.

REFINACIÓN FÍSICA

BLANQUEO

Esta es una etapa en donde el aceite refinado anteriormente es tratado con el fin de mejorar sus características de color. El aceite es conducido hacia el reactor de blanqueo, en donde se adiciona ácido Fosfórico en una concentración de 5.8 % y a una

temperatura de 60 °C con el objetivo de que los fosfátidos presentes en el aceite se transformen en compuestos hidrosolubles y tengan mayor reactividad química.

A continuación se adiciona ácido cítrico en una concentración de 12.8 % y a una temperatura de 65 °C (se diluye en 3.2 litros de agua). Conjuntamente se agrega la tierra filtrante constituida a base de arcillas neutras o ácido activados en una concentración de 0.1 – 2.0 %. Se aplica condiciones de vacío (15 – 20 mmHg) y 95-105 °C por media hora. El blanqueo elimina un alto nivel de compuestos colorantes, así como impurezas químicas del producto crudo, que en la operación de desodorización no pueden derretirse, mejorando de esta manera el sabor, la estabilidad, removiendo también jabones residuales e iones metálicos. Se almacenan en tanques de blanqueo a 80 °C luego se filtran por medio de filtros prensas, en donde una vez realizada esta operación se procede a introducir aire a presión entre el sistema de placas con el objeto de secar las tierras filtrantes facilitando la limpieza.

DESODORIZACIÓN

En esta etapa, el aceite pasa hacia el equipo de desodorizador, donde se elimina en forma condensada los compuestos odoríferos volátiles como son ácidos grasos libres responsables del sabor y olor en los aceites, los mismos que se condensan y acumulan en diversas alturas de la columna del equipo por donde son destilados lateralmente.

El equipo opera aplicando elevadas temperaturas 200 – 265 °C y presiones reducidas 3 mmHg durante 15 a 20 minutos. Es un proceso de destilación al vapor. Dando como resultados aceites decolorado, totalmente desodorizados, donde se obtienen aceites neutros los mismos que son conocidos como aceites refinados.

FRACCIONAMIENTO.

Es un proceso termomecánico en donde se eliminan del aceite fracciones con alto punto de fusión y que son sólidos a temperaturas ambientales.

Tiene como objetivo separar la parte líquida denominada Oleína de la fracción sólida Estearina. Este proceso se realiza aplicando temperaturas bajas 8 – 10 °C, en donde se logra cristalizar los triglicéridos presentes en la estructura química de los aceites de un modo selectivo, separándose después la fracción líquida por filtración.

Consta de tres Etapas.

CIBT

La primera es el acondicionamiento, en la cual el aceite RBD (refinado, blanqueado y desodorizado) es conducido desde los tanques de almacenamiento hacia el tanque báscula donde se registra la cantidad de producto que entrará al proceso para luego alimentar el tanque pulmón y así bombear el contenido hacia los cristalizadores en donde es sometido a calentamiento al rededor de 75 °C con el objeto de fundir los cristales presentes en la estructura del aceite y lograr de esta manera la homogeneidad.

En la segunda etapa denominada cristalización el aceite es sometido a un enfriamiento progresivo aplicando temperaturas de 35°C por medio de agua helada que proviene de las torres de enfriamiento y circula a través de la chaqueta que posee el cilindro cristizador a la vez que se aplica agitación lenta para así no destruir los cristales que se van formando.

La tercera etapa se denomina filtración y es aquí donde se va a lograr la separación de la fase sólida y líquida por medio de filtración aplicando alta presión del pistón de placas. Entre 6 – 12 bar Palma y 18 bar palmiste. Una vez obtenidas las fracciones oleína y estearina con puntos de fusión más bajo que las oleinas son bombeadas hacia los tanques de almacenamiento respectivos.

ALMACENAMIENTO

Aquí son almacenados los productos resultantes de la filtración a la vez que se filtran las impurezas que pudieran contener en suspensión y se les agrega antioxidantes entre 150 – 200 ppm. BHT.



METODOS DE ANALISIS INSTRUMENTAL

DETERMINACIÓN DE FAME POR CROMATOGRAFO DE GASES

FUNDAMENTO

Una muestra o mezcla de sustancias (grasa) se volatiliza y es arrastrada por un gas transporte a través de una Columna Capilar de entre 10 a 60 metros de longitud y de diámetro de 0.2 a 1.0 mm. Entre menor sea la masa molecular y menor la interacción con la película, más rápido saldrá el componente de la Columna Capilar. Dando como resultados picos de diferentes longitudes correspondiendo a los ácidos grasos de la muestra. Pueden ser determinados por esta metódica todos los ácidos grasos desde C4:0 hasta C26:0. También se pueden determinar los isómeros trans, y los isómeros por posición del doble enlace. Las reacciones de trans esterificación y de desplazamiento del doble enlace características de los procesos de hidrogenación pueden ser monitoreadas por este método.

EQUIPOS

El sistema de Cromatografía de la Fabril está compuesto de los siguientes elementos:

- Cuerpo del Cromatógrafo Gaseoso, dotados de dos cuerpos de inyección de muestra y dos detectores.
- Un procesador, que ordena los datos, integra y envía reportes automáticamente gracias a un software.
- Un Interfase que permite el intercambio de información entre el Cromatógrafo y el procesador.
- Un generador de Hidrógeno.
- Una impresora.
- Software de procesamiento de datos.
- Tanque y tuberías de gases para helio y aire
- Fuente de poder interrumpido (UPS).

PROCEDIMIENTO

Se toman 2 gotas (20 a 60 mg) de muestra con pipetas desechables de vidrio o plásticas, se la ponen en tubo de ensayo de 10 ml con tapas enroscable, se le adiciona 1 ml de solución metanólica de hidróxido de Sodio de concentración 0.5 N. Se cierra el tubo y

se lo somete a baño maría durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se lo retira y se lo deja enfriar.

Se le adiciona 2 ml de Tricloruro de Boro en forma de solución Metanólica. Se tapa el tubo de ensayo y nuevamente se lo somete a baño maría durante 15 minutos, luego de lo cual se lo deja enfriar. Posteriormente se le adiciona 2 ml de Isoctano cromatográfico y 2 ml de solución saturada de cloruro de sodio. Entonces se cierra el tubo de ensayo y se lo agita intensamente por un período mínimo de 1 minuto, una vez en reposo se formarán dos capas, una inferior acuosa (conteniendo Cloruro de Sodio, Hidróxido de Sodio) y otra superior grasa (conteniendo Esteres Metílicos de Ácidos Grasos en Isoctano). Con una jeringa de 10 μ m, se toma 1 μ m de isoctano, seguido de otro microlitro de aire y finalmente 1-2 μ m de la capa de tubo de ensayo teniendo Esteres Metílicos; y se lo introduce por el puerto de inyección del cromatógrafo.

Las condiciones cromatográficas para este análisis (las cuales deben verificarse desde el tablero y display de control del GC) son las siguientes:

Method 1

Temp 1=150°C

Temp 2=200°C

Time 1= 5 min

Time 2= 10min

Rate 1 =5 °C/min

Inj Temp =250 °C

Det Temp =250 °C

Atten : 4

Autozero : 0.07-0.15

Gas Carrier Pressure : 25 Psi

Columna Capilar : Rtx-2330 ,30 m x 0.25 mm i.d.



TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA

Los métodos para el análisis químico son selectivos, pocos son específicos, en consecuencia la separación del analito de las posibles interferencias es una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos.

La mayoría de las técnicas instrumentales queda en una de las tres áreas principales: espectroscopia, electroquímica y cromatografía. Aunque varias técnicas importantes (incluyendo la espectrometría de masas y el análisis térmico) no se ajustan convenientemente a estas clasificaciones, las tres áreas proporcionan la base de un estudio sistemático de la instrumentación química.

La cromatografía es un conjunto de métodos que permite separar compuestos estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que resulta casi imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas o un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar por una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna, o una parte sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidas por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, por el contrario los componentes que se fijan débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de esta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente.

CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRÁFICOS

Se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero se basa en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho tiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel, en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o gravedad. Es importante señalar que los equilibrios en que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos, y que la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta igualmente a la cromatografía en plano.

Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y fase estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la

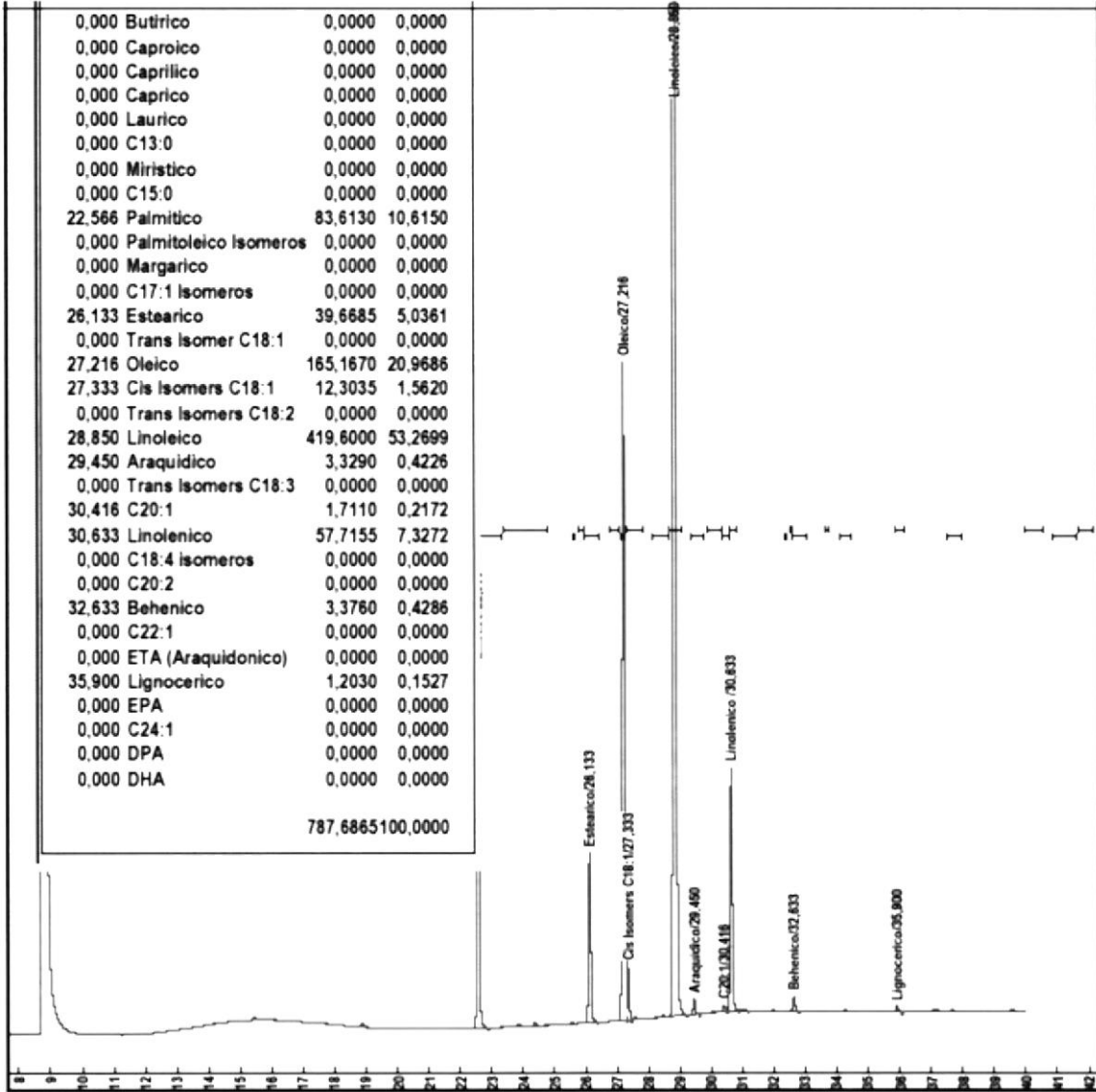
transferencia de los solutos entre las fases, así tenemos: cromatografía líquida, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos, como su nombre indica, las fases móviles son respectivamente líquidos, gases y fluidos supercríticos, para lo cual se puede mencionar que solamente la cromatografía de líquidos es la que se puede llevar a cabo en columna o sobre superficies planas y la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columnas, de tal manera que las paredes de las columnas contienen la fase móvil.

Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

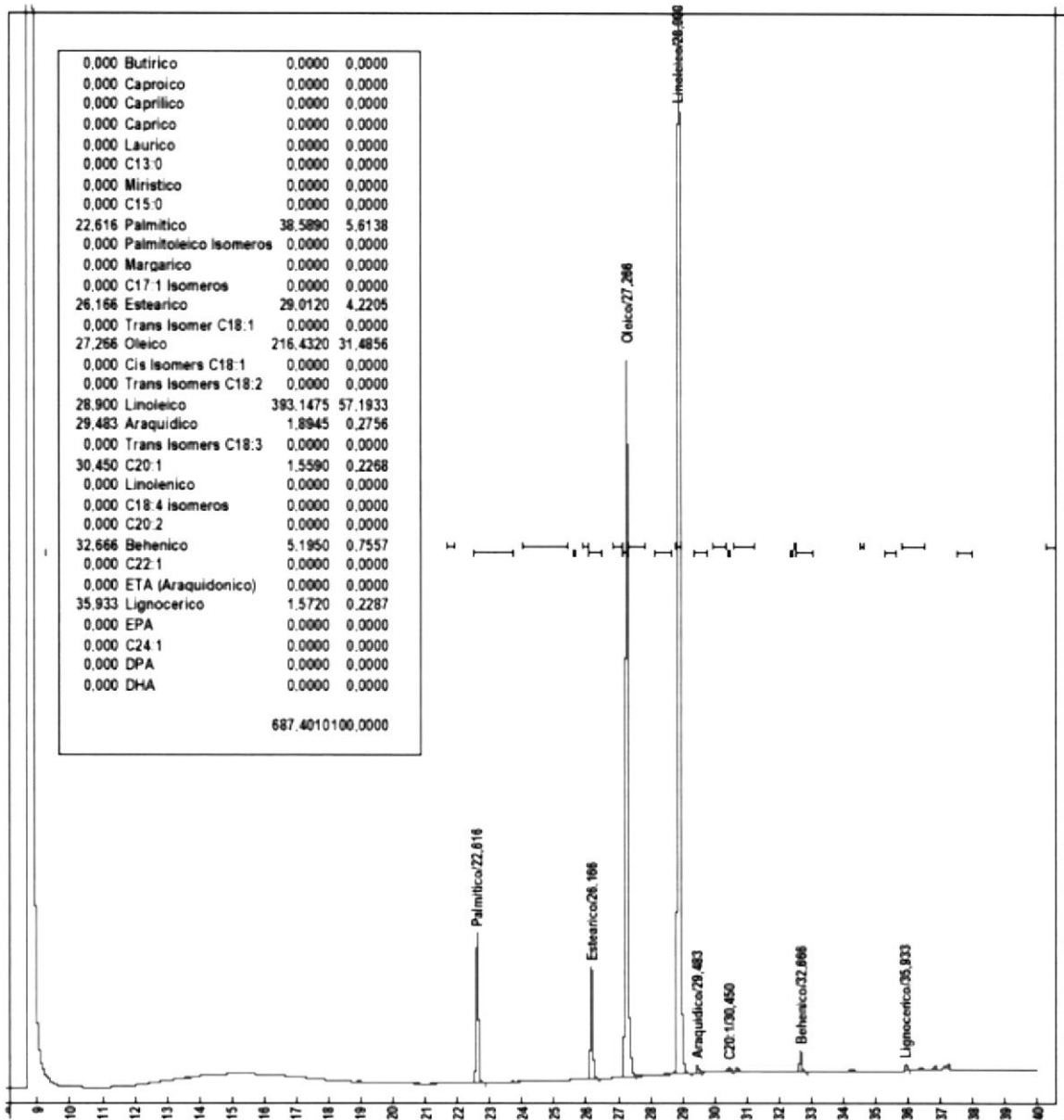
Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

GRAFICOS

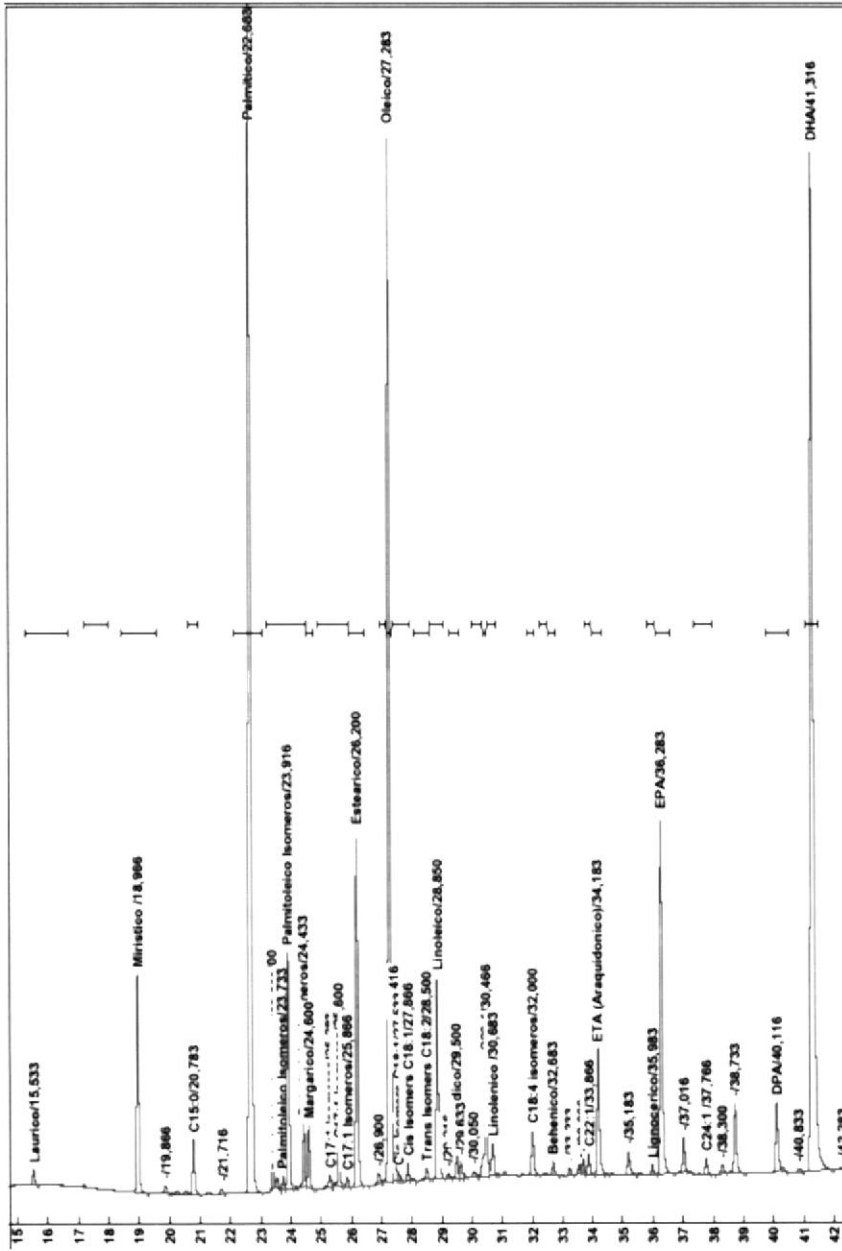
Soya Cruda con sus ácidos grasos característicos linoleico 53.26%, oleico 20.96%, palmítico 10.61%, linolenico 7.32%, esteárico 5.03%



Girasol Crudo con ácidos grasos característicos linoleico 57.19%, oleico 31.48%,
 palmítico 5.61% linoleico que se confunde con el C:201 en 0.22%.



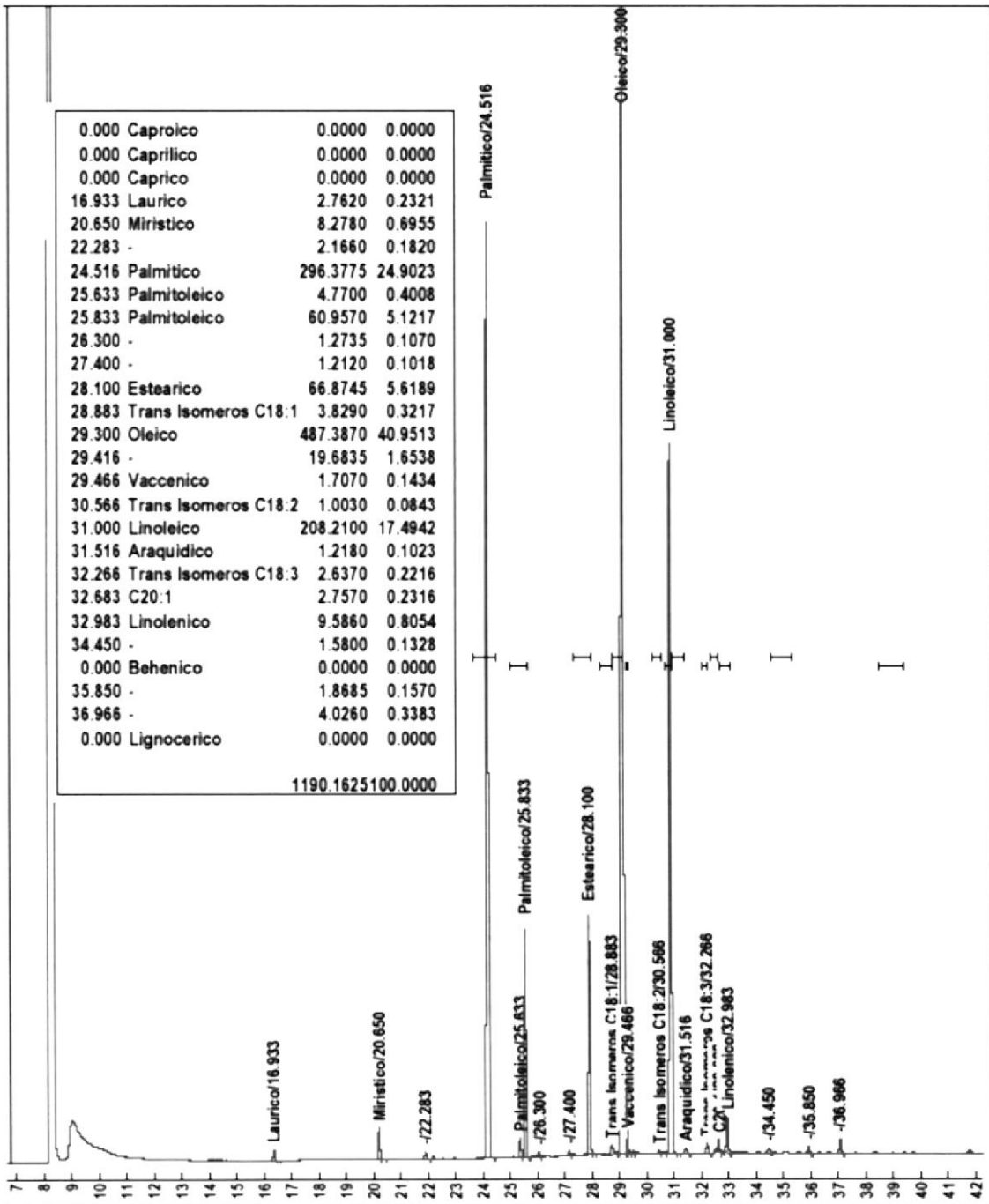
Aceite de Pescado, su acido graso caracteristico DHA 21.56%, EPA 5.94% y DPA 1.19 % los cuales van a cambiar su porcentaje de acuerdo a la grasa del tipo de pez.



0.000	Butirico	0.0000	0.0000
0.000	Caprico	0.0000	0.0000
0.000	Caprilico	0.0000	0.0000
0.000	Caprico	0.0000	0.0000
15.533	Laurico	3.2690	0.2393
0.000	C13:0	0.0000	0.0000
18.966	Mirístico	44.7480	3.2901
19.866	-	1.7320	0.1270
20.783	C15:0	11.1110	0.8146
21.716	-	1.2140	0.0891
22.683	Palmítico	293.5980	21.5213
23.400	Palmítico isómeros	5.0940	0.3734
23.533	Palmítico isómeros	1.6540	0.1212
23.733	Palmítico isómeros	2.5100	0.1840
23.916	Palmítico isómeros	46.9210	3.4394
24.433	Palmítico isómeros	11.7465	0.8610
24.600	Margarico	11.7500	0.8613
25.283	C17:1 isómeros	2.5130	0.1842
25.600	C17:1 isómeros	7.7830	0.5705
25.866	C17:1 isómeros	2.0970	0.1537
26.200	Estearico	71.6290	5.2505
26.900	-	2.2180	0.1626
0.000	Trans isómeros C18:1	0.0000	0.0000
27.283	Oleico	232.2960	17.9270
27.416	-	31.4090	2.3023
27.533	Cis isómeros C18:1	1.3480	0.0988
27.866	Cis isómeros C18:1	3.0510	0.2236
28.500	Trans isómeros C18:2	2.2720	0.1685
28.850	Linoleico	41.6670	3.0543
29.216	-	1.1345	0.0832
29.500	Araquídico	4.5760	0.3354
29.633	-	3.0880	0.2264
30.050	-	1.5890	0.1185
0.000	Trans isómeros C18:3	0.0000	0.0000
30.466	C20:1	27.4480	2.0121
30.683	Linoléico	8.4540	0.6197
32.000	C18:4 isómeros	10.5890	0.7782
0.000	C20:2	0.0000	0.0000
32.683	Behénico	2.5580	0.1875
33.233	-	1.6385	0.1216
33.550	-	1.3640	0.1000
33.666	-	2.5250	0.1851
33.866	C22:1	4.7110	0.3453
34.183	ETA (Araquídico)	28.0680	2.0574
35.183	-	6.1240	0.4489
35.983	Lignocérico	2.0610	0.1511
36.283	EPA	91.1090	6.8454
37.016	-	6.9020	0.5059
37.766	C24:1	3.6820	0.2699
38.300	-	2.0650	0.1514
38.733	-	16.7910	1.2308
40.116	DPA	16.2480	1.1910
40.833	-	1.1970	0.0877
41.316	DHA	294.2480	21.5890
42.283	-	1.3025	0.0955
		1363.1130	100.0000

Grasa de Pollo

Su acido graso caracteristico el oleico 40.95%, palmítico 24.90%, linolenico 17.49%, palmitoleico 5.12%.



TEORIA DE LA ELUCIÓN EN COLUMNA

La elución implícate transporte de una especie(muestra) a través de una columna por la adición continua de una fase móvil. Una porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna después de lo cual los componentes de las muestras se distribuyen entre las dos fases. La introducción de la fase móvil adicional (el eluyente) hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tiene lugar un posible reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de la fase estacionaria por las que atraviesa. Al mismo tiempo tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar que inicialmente se ubicaba la muestra. Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas del soluto por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fase estacionarias y móvil. Sin embargo debido a que el movimiento de los solutos sólo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra en la columna depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria, las diferencias de velocidades que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas o zonas, que se localizan a lo largo de la columna. El aislamiento de las especies separadas se lleva a cabo haciendo pasar suficiente cantidad de fase móvil a través de la columna hasta que las bandas individuales salen de ellas, pudiéndose así detectarse.

CROMATOGRAMAS.

Si un detector que responde a la concentración del soluto se coloca al final de la columna, y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido), se obtiene una serie de picos. Este gráfico denominado cromatograma, es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes en la muestra. El área bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

ANALISIS CUANTITATIVO

La cromatografía en columna cuantitativa se basa en la comparación de la altura, o del área del pico del analito con la del uno o más patrones. En cromatografía en plano, el área ocupada por las especies separadas sirve como parámetro analítico.

Análisis basados en la altura del pico.

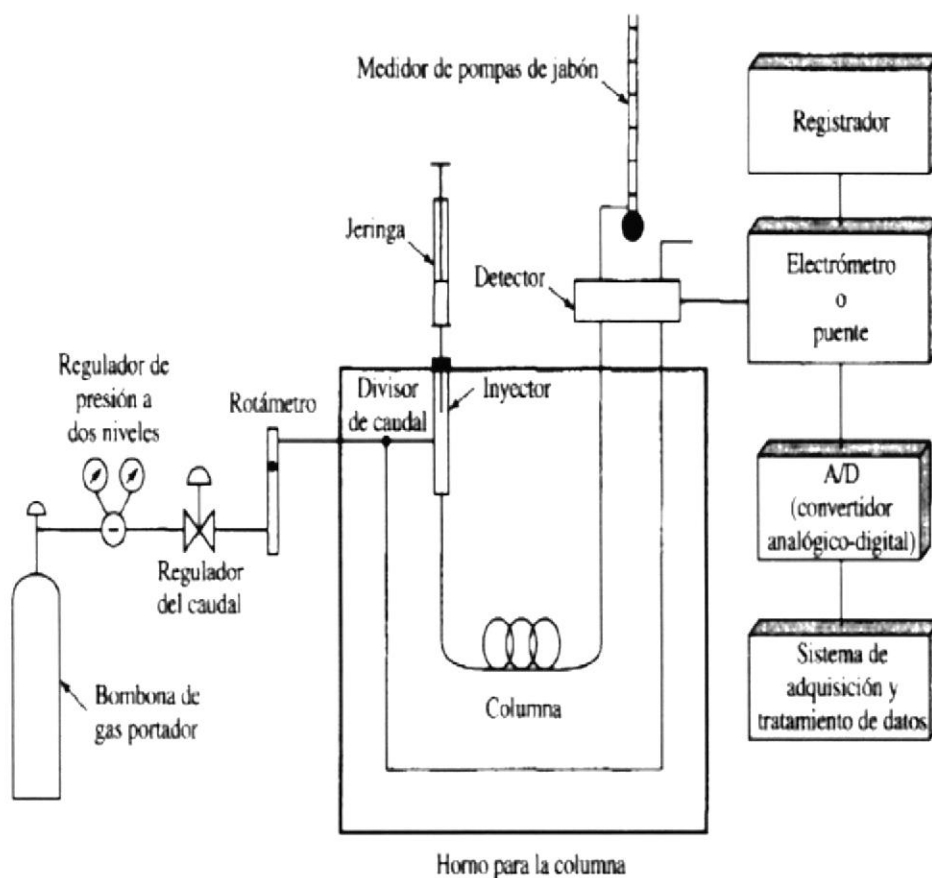
La altura de un pico cromatográfico se obtiene uniendo las líneas base a cada lado del pico por una línea recta, y midiendo la distancia vertical desde esta línea al pico. Esta

medida normalmente se puede hacer con una precisión razonablemente buena, sin embargo las alturas de pico están inversamente relacionadas con las anchuras de pico. Por ello, con las alturas de pico se obtienen resultados exactos sólo si las variaciones en las condiciones de la columna durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de las muestras y los patrones no alteran la anchura de los picos. Las variables que deben de cuidarse son la temperatura de la columna, el caudal del eluyente y la velocidad de inyección de la muestra.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

Aquí la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el fluido de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La cromatografía gas-sólido (GSC) se produce la retención de los analitos en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física, lo que la hace una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elusión con colas muy significativas, por tal motivo se la emplea para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. La cromatografía gas-líquido (GC) tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia, se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

INSTRUMENTOS PARA LA CROMATOGRAFÍA GAS-LIQUIDO



Gas Portador

Entre los gases portadores, que deben ser químicamente inertes se encuentran el helio, el nitrógeno y el hidrógeno, la elección de los gases está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. Con el suministro del gas se encuentran asociados los reguladores de presión, manómetros y medidores de caudal. Además, el sistema de gas portado contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua u otras impurezas. Los caudales se controlan normalmente mediante un regulador de presión de dos niveles colocado en el cilindro de gas, y algún tipo de regulador de presión o regulador de flujo instalado en el cromatógrafo. El intervalo de presión de entrada normalmente oscila entre 10 y 50 psi (por encima de la presión del entorno), lo que conduce a caudales de 25 a 150 ml/min con las columnas rellenas y de 25 a 150 mL/min en las columnas abiertas (columnas capilares). Los caudales pueden determinarse mediante un rotámetro situado en la cabeza de la columna, pero no es tan exacto, pero un simple medidor de pompas de jabón, se coloca al final de la columna. Cuando se aprieta una goma que contiene una disolución acuosa de jabón en el camino del gas, a continuación se mide el tiempo necesario para que esta película se desplace entre dos divisiones de la bureta, lo que permite calcular el caudal volumétrico. Los equipos modernos van equipados con medidores electrónicos del caudal, que están controlados por ordenador para mantener el caudal al nivel deseado.

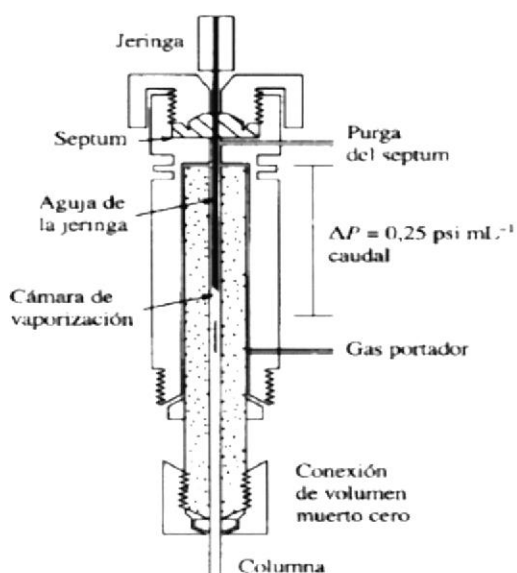
Medidor de pompas de jabón

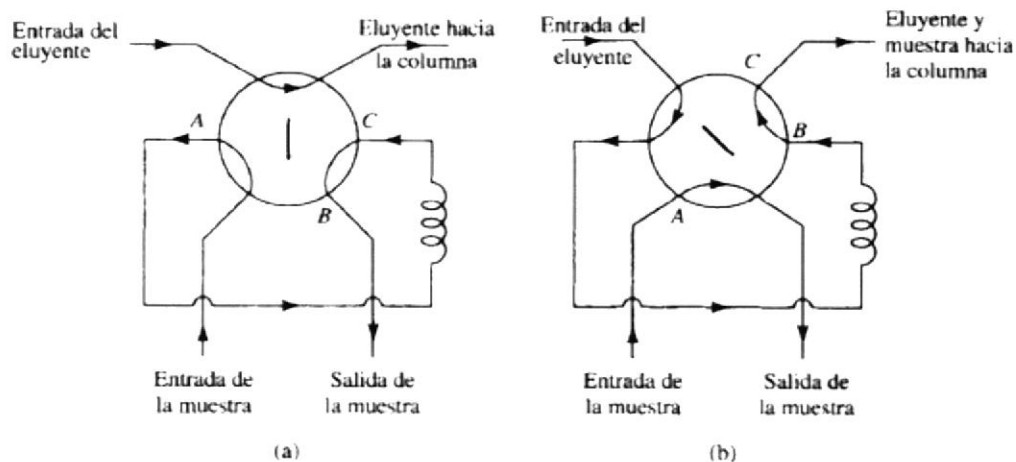


Sistema de Inyección de Muestra

La eficiencia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida como un tapón de vapor; El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o septum de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. Las columnas capilares exigen muestras entre 10^{-3} uL, donde hay un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechando el resto. El uso de una válvula rotatoria permite que los errores debido al tamaño de la muestra pueden reducirse hasta ser de un 0,5 a un 2 %, la válvula rotatorio de muestra se llena con un exceso de muestra, girando la válvula 45 grados se introduce un volumen reproducible, en la fase móvil.

Vista de la sección transversal de un inyector de vaporización instantánea.



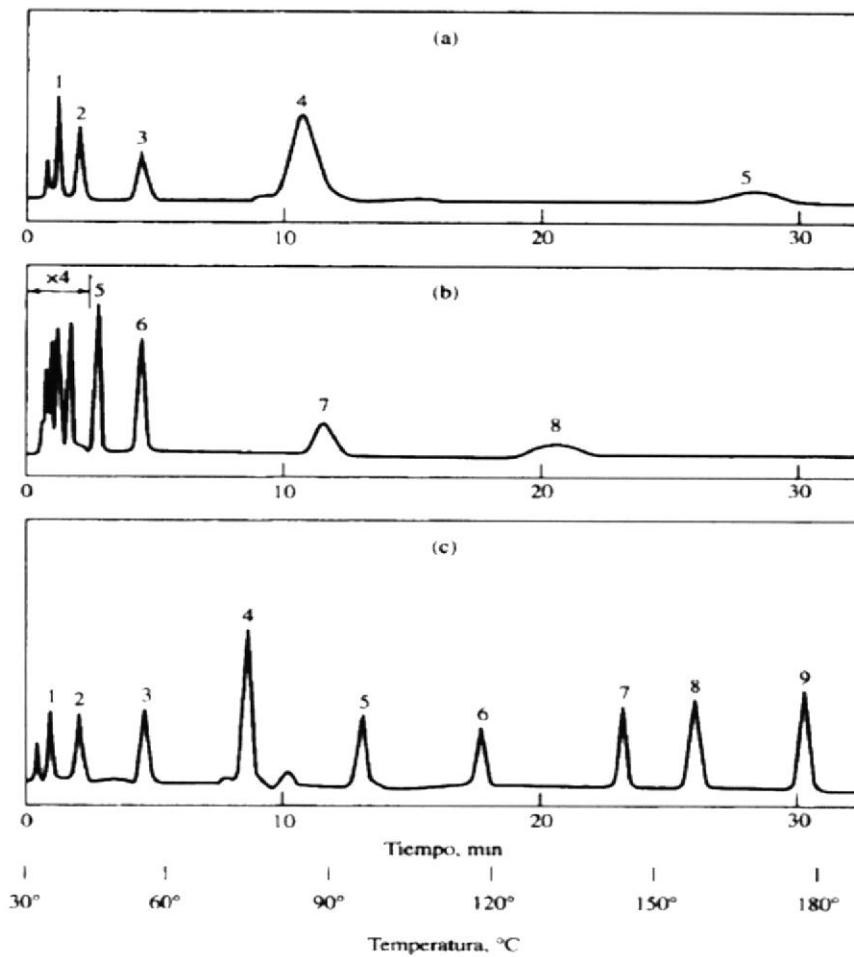


Válvula rotatoria de muestra en posición (a) se llena el bucle ABC con la muestra y en (b) la muestra se introduce en la columna.

CONFIGURACIÓN DE LA COLUMNA Y DEL HORNO PARA LA COLUMNA

En cromatografía de gases se usan dos tipos de columna, las rellenas, y las abiertas o capilares,. Las columnas cromatográficas varían desde menos de 2 hasta 50 m de longitud, o más. Están construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. A fin de poder colocarse en el interior de un horno termostatzado, normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm. La temperatura de la columna es una variable importante que para un trabajo preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello se introducen en un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerida. En la practica con una temperatura igual o ligeramente superior al punto de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elusión razonables (2 a 30 min).Para muestras cuyos componentes presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición, a menudo es conveniente emplear una programación de temperatura, con la que se aumenta la temperatura de la columna bien en forma continua o bien en forma por etapas.

Características de isotermas



Efecto de la temperatura sobre los cromatogramas de gases. (a) isotérmica a 45°C; (b) isotérmica a 145°C; (c) programada de 30 °c a 180°C.

SISTEMAS DE DETECCIÓN

En el desarrollo de la cromatografía de gases se han investigado y utilizado docenas de detectores. El detector ideal para cromatografía de gases tiene las siguientes características:

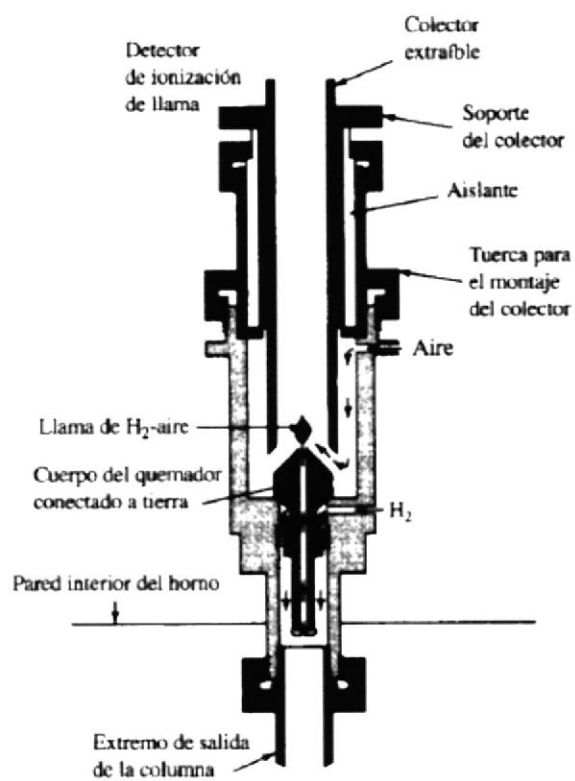
- 1.- Adecuada sensibilidad. Aquellos que constituye una adecuada sensibilidad no se puede evaluar de forma cuantitativa.. En general, las sensibilidades de los detectores actuales se encuentran en el intervalo de (10 a la -15 a 10 a la -8) g de soluto/s.
- 2.- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- 3.- Respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios ordenes de magnitud.
- 4.- Intervalos de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 °C.
- 5.- Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal.
- 6.- Alta fiabilidad y manejo sencillo.
- 7.- Respuesta semejante para todos los solutos o, una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
- 8.- No destructiva de la muestra.

Pero realmente no existe detector que cumpla todas estas características.

DETECTORES DE IONIZACION DE LLAMA (FID)

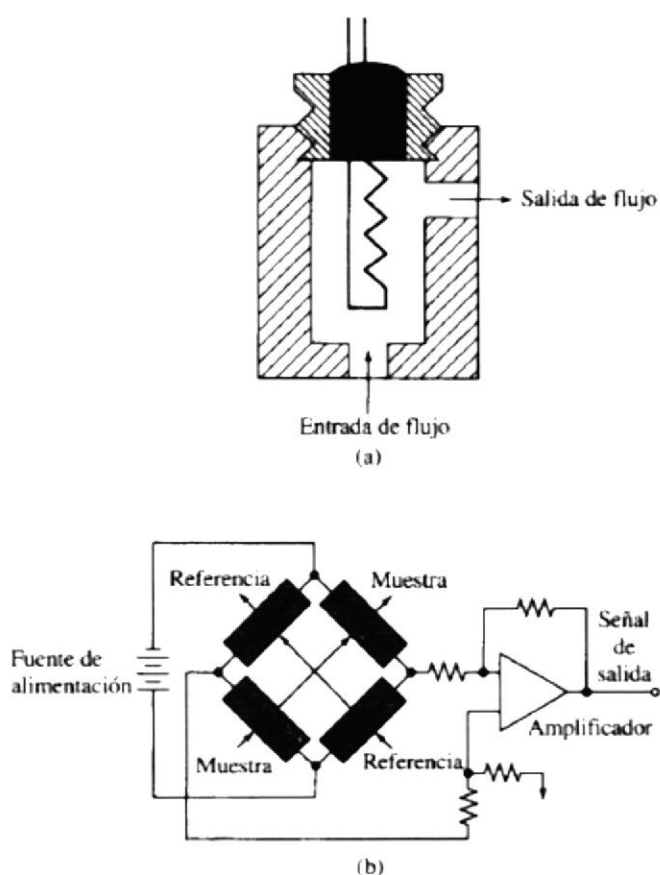
Es el más utilizado, y por lo general uno de los más aplicables en cromatografía de gases. En un quemador el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse electrónicamente. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama. Cuando se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, la corriente que resulta (10 a la -12 A) se dirige para su medida hacia un amplificador operacional de alta impedancia.

Diagrama de un FID



DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD)

Este detector se basa en los cambios en la conductividad térmica de la corriente de gas ocasionadas por la presencia de las moléculas de analito. Este dispositivo se denomina a veces catarómetro. El sensor de un catarómetro consiste en un elemento calentado eléctricamente cuya temperatura, a una potencia eléctrica constante, depende de la conductividad térmica del gas circundante. El elemento calentado puede ser un hilo fino de platino, oro o wolframio, o también, un termistor semiconductor. La resistencia del hilo o del termistor da una medida de la conductividad térmica del gas; a diferencia del detector de hilo, el termistor tiene un coeficiente de temperatura negativo.



Esquema de (a) celda de un detector de conductividad térmica y (b) configuración de dos celdas de muestras y de referencia de un detector.

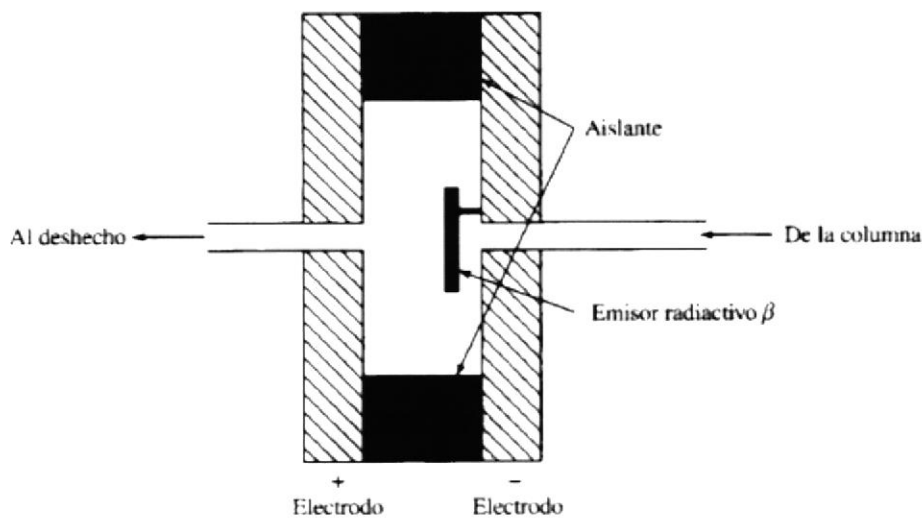
DETECTORES DE QUIMIOLUMINISCENCIA DEL AZUFRE (SCD)

Este detector se basa en la relación entre ciertos compuestos azufrados y el ozono, la intensidad de fluorescencia resultante es proporcional a la concentración de azufre. Este detector ha demostrado ser especialmente útil en la detección de contaminantes como mercaptanos. Aquí el eluyente se mezcla con hidrógeno y aire y se produce la combustión como en el detector de ionización de llama, los gases así obtenidos se mezclan con el ozono, y se mide la intensidad de emisión resultante.

DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES

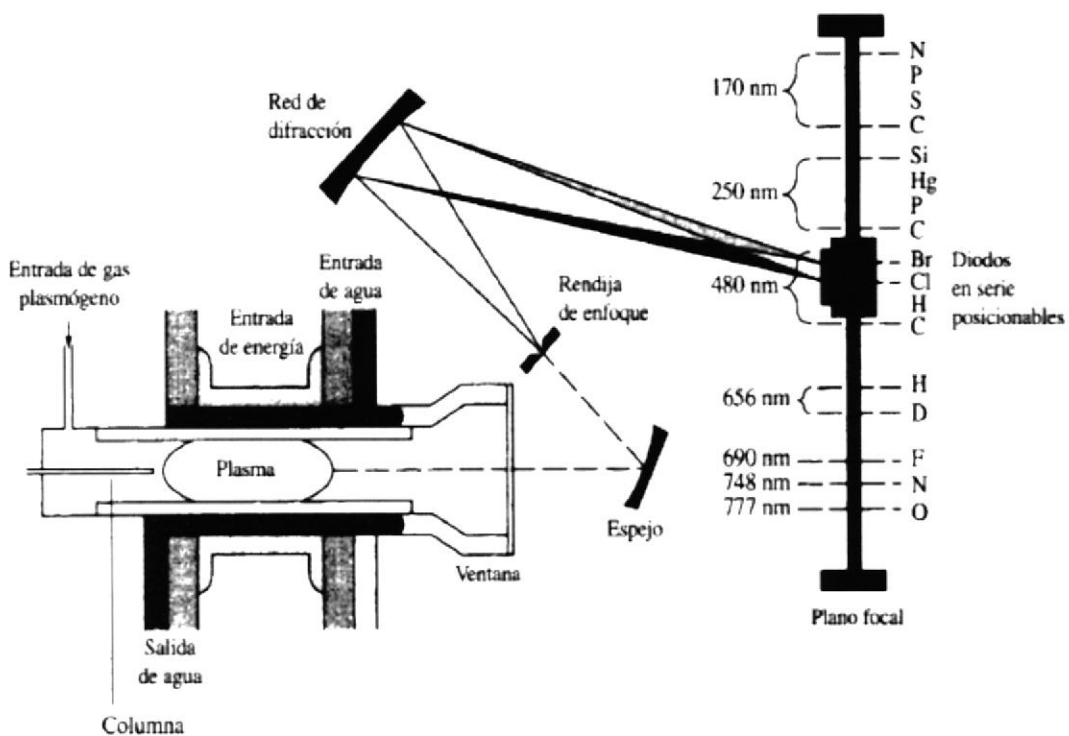
Este tipo de detecto opera casi del mismo modo que un contador proporcional para la medida de rayos X, el efluente de la columna pasa sobre un emisor β , normalmente níquel-63. Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador (nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones. De este proceso de ionización, en ausencia de especies orgánicas, resulta una corriente constante entre un par de electrodos, sin embargo, la corriente disminuye significativamente en presencia de moléculas orgánicas que tienden a capturar electrones. La respuesta no es lineal, a no ser que el potencial a través del detector se aplique en forma de impulsos. Este detector es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitrilos; en cambio no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos. Una aplicación importante del detector de captura de electrones es la detección y determinación de insecticidas clorados, tienen una ventaja que es de no alterar la muestra.

Diagrama de un detector de captura de electrones



DETECTOR DE EMISIÓN ATÓMICA (AED)

En este dispositivo el efluente se introduce en un plasma de helio obtenido con microondas, que se acopla a un espectrómetro óptico de emisión de diodos en serie. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener sus espectros de emisión atómica característicos. Estos espectros son recogidos en un espectrómetro que utiliza una serie de diodos configurados en un plano móvil, que es capaz de detectar la radiación emitida desde 170 a 780 nm. Los diodos en serie son capaces de controlar simultáneamente de dos a cuatro elementos en una posición dada, el programa de tratamiento de datos suministrado con el detector permite medir la concentración de 15 elementos.



Esquema de un detector de emisión atómica

DETECTOR TERMOIÓNICO (TID)

Es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno, tiene una configuración similar al detector de llama. El efluente de la columna se mezcla con hidrógeno, pasa a través de la llama, y se quema, el gas caliente fluye alrededor de una bola de silicato de rubio calentada eléctricamente, la cual se mantiene a unos 180 V con respecto al colector, la bola caliente forma un plasma que alcanza una temperatura de 600 a 800 °C. Lo que ocurre exactamente en el plasma, que hace que se produzcan gran cantidad de iones a partir de las moléculas que contienen fósforo o nitrógeno.

OTROS TIPOS DE DETECTORES.

DETECTOR FOTOMETRICO DE LLAMA (FPD)

Se lo ha utilizado extensamente para el análisis de contaminantes del aire y del agua como pesticidas y los hidrocarburos. Es un detector selectivo que sobre todo sensible a los compuestos que contienen azufre y fósforo. En este detector, el eluyente se hace pasar a través de una llama hidrógeno aire a baja temperatura, la cual convierte parte del fósforo a una especie HPO que emite bandas de radiación centradas alrededor de 510 y 526 nm. El azufre de la muestra se convierte simultáneamente en S₂, el cual emite una banda centrada en 394 nm.

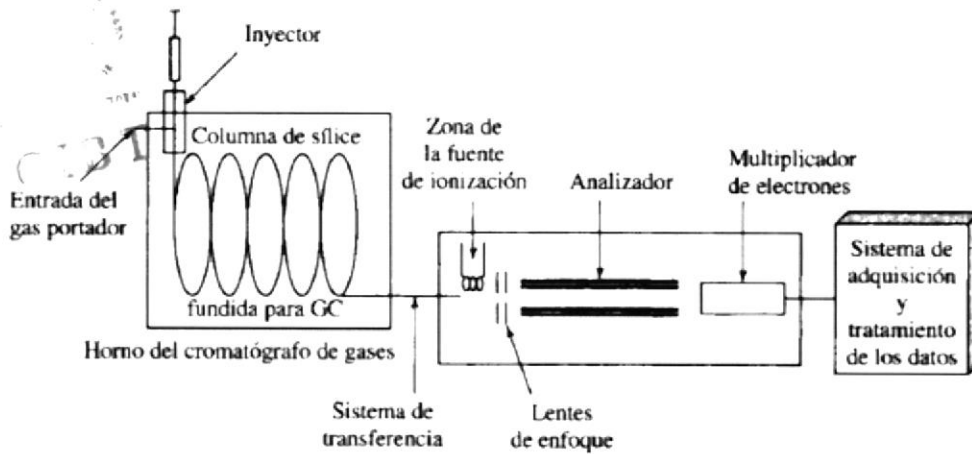
DETECTOR DE FOTOIONIZACIÓN.

En este detector el efluente de la columna se irradia con un haz intenso de radiación ultravioleta entre 8,3 y 11,7 eV (149 a 106 nm), que provoca la ionización de las moléculas, al aplicar un potencial a través de una celda que contiene los iones producidos, se origina una corriente de iones, la cual es amplificada y registrada.

CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTRÓMETRIA DE MASAS (GC/MS).

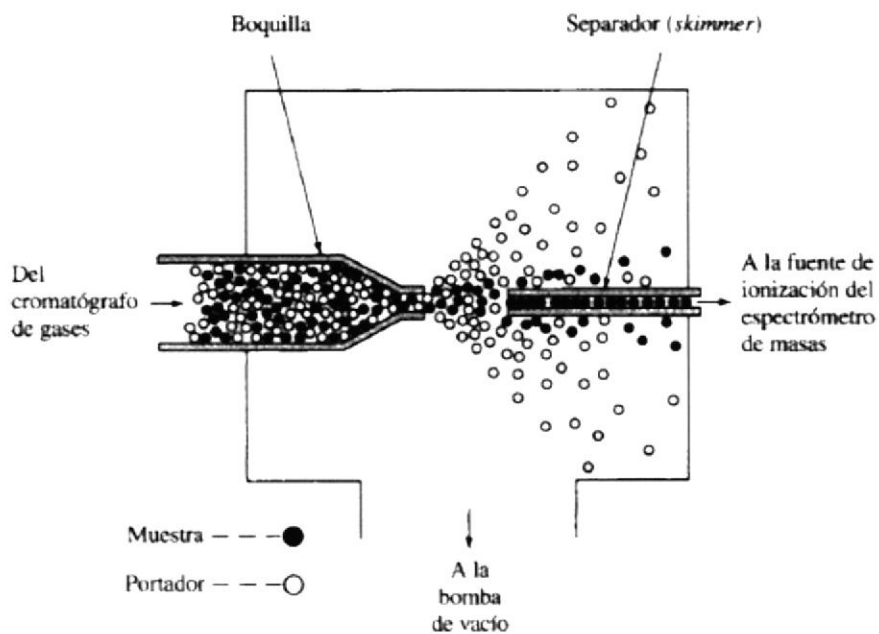
Esto es un sistema de acoplamiento directo con distintos tipos de espectrómetros de masas de barrido rápido. El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, en el caso de columnas rellenas así como en las columnas megacapilares ha de emplearse un separador de chorro, para eliminar la mayor parte del gas portador que acompaña al analito. En este dispositivo, la salida de gases fluye a través de la boquilla de un separador de corcho (de vidrio), el cual aumenta el momento lineal de las moléculas más pesadas del analito de tal forma que el 50% o más de éstas se desplazan

aproximadamente en línea recta hacia el conductor colector de salida, por el contrario los átomos de de helio ligeros se desvían por el vacío y son succionados hacia el exterior.

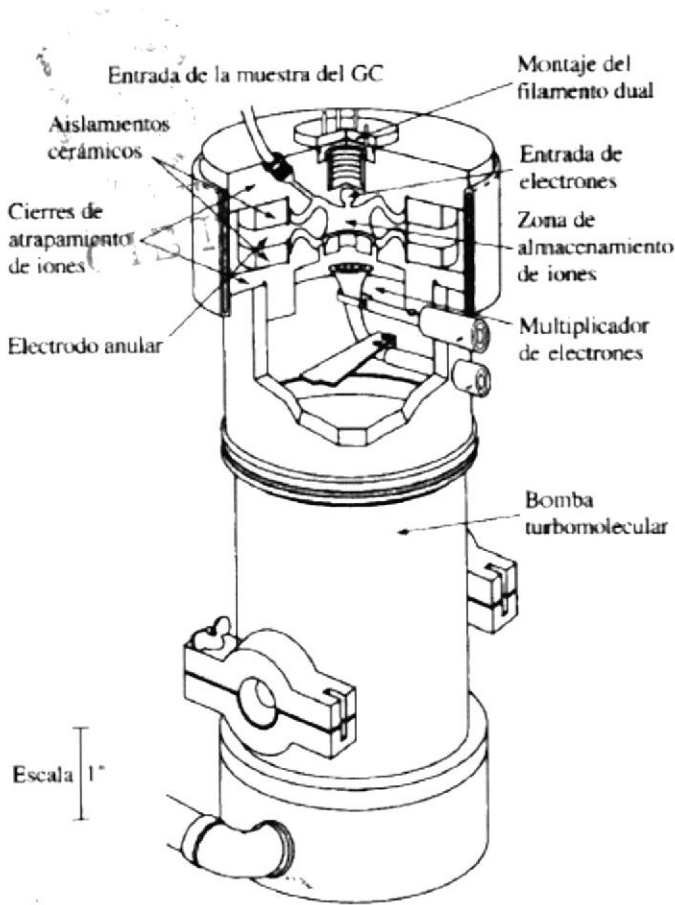


Esquema de un cromatógrafo de gases de columna abierta/espectrómetro de masas

Esquema de un separador de chorro



Esquema del detector de trampa de iones.



El detector de masas más simple para cromatografía de gases es el detector de trampa de iones (ITD), en este instrumento los iones se generan por impacto de electrones o por ionización química, a partir de la muestra eluida y luego se mantienen en un campo de radiofrecuencia, a continuación, los iones atrapados se expulsan del área de almacenamiento hacia un detector multiplicador de electrones, la expulsión se controla de tal forma que es posible un barrido en función de la relación masa/carga. Estos instrumentos se han utilizado para la identificación de cientos de componentes que están presentes en sistemas naturales y biológicos, por ejemplo caracterizar los componentes responsables del olor y del sabor en los alimentos, identificar contaminantes del agua, diagnósticos médicos basados en los componentes del aliento y estudios de metabolitos de fármacos.



COLUMNAS

Existen dos tipos de columnas en los estudios de cromatografía; columnas rellenas y columnas capilares o abiertas.


COLUMNAS ABIERTAS

Son de dos tipos básicos, denominados columnas abiertas de pared recubierta (WCOT) y columnas abiertas recubiertas con soporte (SCOT). Las primeras son simplemente capilares con pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria, en las segundas, la superficie interna del capilar está revestida de una capa delgada (30um) de material soporte, como las tierras diatómicas que sirve para retener y ubicar la fase estacionaria líquida, este tipo de columnas contienen varias veces la fase estacionaria que tiene una columna de pared recubierta y, por tanto, tiene una mayor capacidad de carga. Generalmente, la eficiencia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero es sensiblemente mayor que la de una columna rellena. Las nuevas columnas WCOT, que se introdujeron en el mercado en 1979, son columnas abiertas de sílice fundida (columnas FSOT) los capilares de sílice se fabrican a partir de sílice especialmente purificada con un contenido mínimo de óxidos metálicos, en la mayoría de las aplicaciones han sustituido a las columnas WCOT.

COLUMNAS RELLENAS.

Estas se fabrican con tubo de vidrio, metal (acero inoxidable, cobre, aluminio) o de teflón, con una longitud característica de 2 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm, estos tubos se rellenan densamente con un material de soporte sólido, finamente dividido y homogéneo, que se recubre con una delgada capa (0,05 a 1 um) de fase estacionaria líquida, y estas se configuran en forma helicoidal con un diámetro aproximado de unos 15 cm. El material de soporte como son en la actualidad las tierras diatómicas de procedencia natural, que están constituidas por esqueletos de miles de especies de plantas unicelulares, estas plantas tomaban sus nutrientes y eliminaban sus residuos por difusión molecular a través de sus poros.

Propiedades y características para columnas de gases



	Tipo de columna*			CIBT
	FSOT	WCOT	SCOT	Rellena
Longitud, m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diámetro interno, mm	0,1-0,53	0,25-0,75	0,5	2-4
Eficacia, platos/m	2.000-4.000	1.000-4.000	600-1.200	500-1.000
Platos totales	$(20-400) \times 10^3$	$(10-400) \times 10^3$	$(6-120) \times 10^3$	$(1-10) \times 10^3$
Tamaño de la muestra, ng	10-75	10-1.000	10-1.000	10-10 ⁶
Presión relativa de retroceso	Baja	Baja	Baja	Alta
Velocidad relativa	Rápida	Rápida	Rápida	Lenta
Inercia química	Mejor	→ Pobre		
Estabilidad química	Sí	No	No	No

FSOT: Columnas abiertas de sílice fundida.

WCOT: Columna abiertas de pared recubierta.

SCOT: Columna abiertas recubiertas con soporte.



DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS POR HPLC

METODOLOGÍA: AOCS Ge 86 HPLC

FUNDAMENTO

Este método es para la separación y determinación cuantitativa de triglicéridos en aceites y grasas, usando HPLC marca Agilent Technologies-HP Series 1100 con Detección Ultravioleta medida a 220 nm. o de Índice de Refracción con Celda Óptica Termostatizada. Los triglicéridos son separados en función de su peso molecular y grado de insaturación en Cromatografía de Fase Reversa (RP). Aplicable a aceites y grasas vegetales o animales preferentemente refinados.

EQUIPOS

- 1.- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia, con control termostático de temperatura de la columna.
- 2.- Unidad o Lazo de Inyección de 20 µl de capacidad.
- 3.- Detector de Absorbancia Molecular (de Longitud de Onda Variable VWD o de Arreglo de Diodos DAD). También Detector por Índice de Refracción con control termostático de temperatura de celda.
- 4.- Columnas HPLC Waters Spherisorb ODS-2 , 250 x 4.6 mm , 5 µm .
- 5.-Jeringas Desechables de 10 ml
- 6.-Filtros de Jeringa con Membrana de Celulosa Reducida, PTFE o Nylon y con poros de $\leq 0.45 \mu\text{m}$
- 7.-Filtros de Membrana para Solventes , de Celulosa Reducida ,PTFE o Nylon con poros de $\leq 0.45 \mu\text{m}$
- 8.-Micro jeringa Hamilton , de 100 µl de capacidad.

REACTIVOS:

Tetrahidrofurano THF, grado HPLC.

Acetona AC, grado HPLC.

Acetonitrilo ACN, grado HPLC.

Solvente de Elusión: Mezcla 45/55 (v/v) de Acetonitrilo /Acetona

Solvente de Muestra: Mezcla 50/50 (v/v) de Acetona/ Tetrahidrofurano

Triglicéridos Estándares: POP, PPP, OOS, POS, SOS, LLO, PLL, OOL, PLO, PLP ,MOP, POO, Piel, LLL, LeLL, LeLeL.

En donde: M- Acido Mirístico, P- Acido Palmitico, O- Acido Oleico, L- Acido Linoleico, Le- Acido Linolénico, S- Acido Estearico.

PREPARACION DE LA MUESTRA:

La muestra se la disuelve en la mezcla Acetona/Tetrahidrofurano . La concentración de muestra es de 4 % pero si se usa solo detector por Absorbancia UV(DAD, VWD)entonces hay que considerar las siguientes concentraciones :Los aceites de soya, girasol y algodón se los disuelve al 2 %, los de palma y manteca de cacao al 8 %, los de palmiste al 10 % ,las grasas animales al 6-15 %. La solución obtenida debe ser filtrada con la ayuda de filtros de jeringa. El filtrado puede ser recogido en viales previa inyección al cromatógrafo. La excesiva humedad en la muestra debe ser previamente eliminada.

La composición del solvente de muestra THF/Acetona 50/50 es optima para obtener la mejor resolución cromatográfica, y también cuando se desea la resolución de tipos moleculares de MG (monoglicéridos) y DG (diglicéridos). No obstante con hidrogenados y grasas con alto P.F(>45°C),se debe incrementar la cantidad de THF.

TEORIA

CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Es la técnica analítica de separación más ampliamente usada por su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en las ciencias, por ejemplo : aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas, esta tecnología requiere de una instrumentación sofisticada para poder trabajar a altas presiones con el empleo de bombas. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna (colector) que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de las muestras experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más

fuertemente fluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

Los componentes adyacentes (picos) se separan cuando el pico que sale después es retardado lo suficiente para impedir la sobre posición con el pico que emergió antes.

Tipos de Cromatografía Líquida:

Cromatografía de Reparto.

Cromatografía de Adsorción o cromatografía líquido-sólido.

Cromatografía Iónica.

Cromatografía de Exclusión por tamaño o cromatografía en geles.



Elección del Solvente

Características:

Disponible comercialmente

Precio

Pureza y Estabilidad. En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas.

Disolver la muestra

Misible con otros solventes para formar mezclas útiles

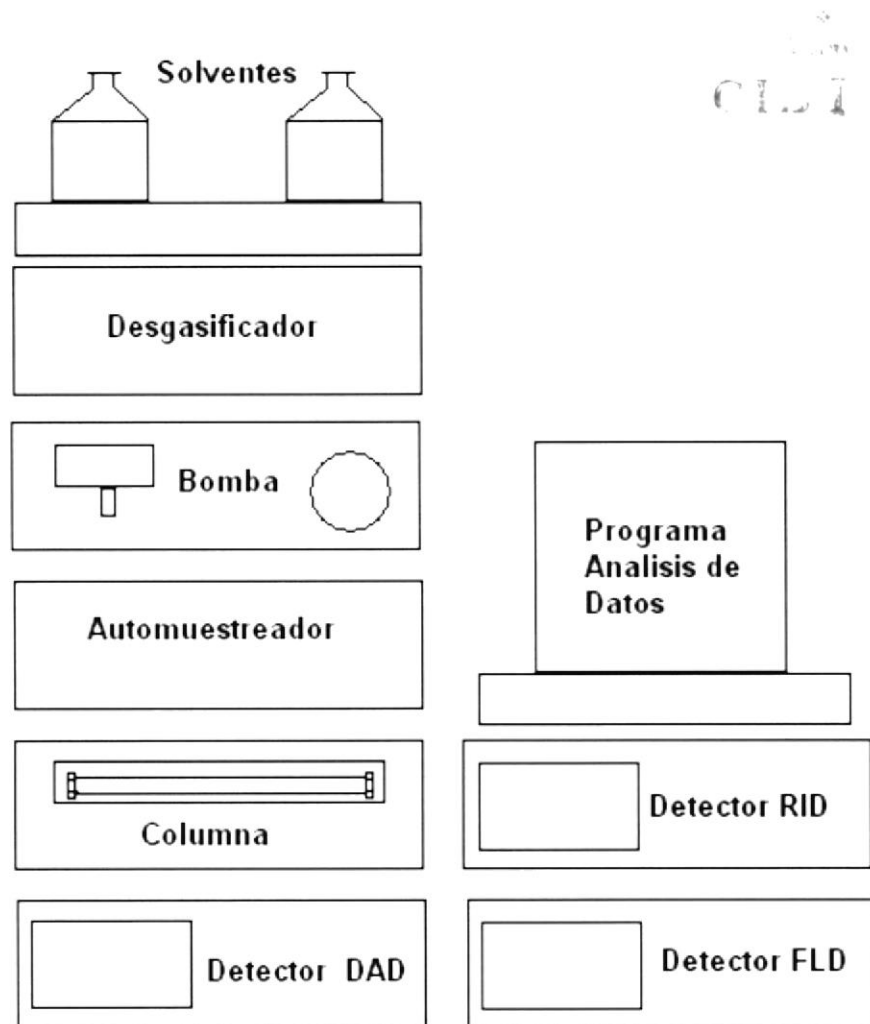
No degradar o disolver la fase estacionaria

Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión

Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV)



Diagrama Básico de un sistema de HPLC



Esquema de un cromatógrafo hplc con cada una de su módulos

CIBT

Filtración y Des gasificación de Solventes

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los cromatógrafos líquidos en la era de la computadora, hay aun problemas que ésta no puede resolver.

Hasta los Solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de solvente en el depósito para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una nueva botella de solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el depósito solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El Oxígeno Disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El Nitrógeno Disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El Dióxido de Carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Hay tres (3) métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC :

Filtro a la Entrada del Solvente

Filtración al Vacío

Filtración en Línea

Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC



Existen cuatro (4) métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

Sonificación

Burbujear Helio

Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo

Desgasificación al Vacío en Línea

Bombas

Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo:

Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.

Mantener el flujo libre de pulsaciones

Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min)

Control y reproducibilidad del flujo de solvente

Componentes de la bomba resistentes a la corrosión

Las bombas que se usan en HPLC se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en: Isocráticas, Binarias Cuaternarias

Mecánicas

Recíprocantes

De desplazamiento continuo

Neumáticas

Programación del Solvente

Existen dos métodos de programación de Solvente en HPLC:

Isocrático

Gradiente de Elusión. Es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil. Pueden efectuarse de dos maneras:

A baja presión

A alta presión

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos:

Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible.

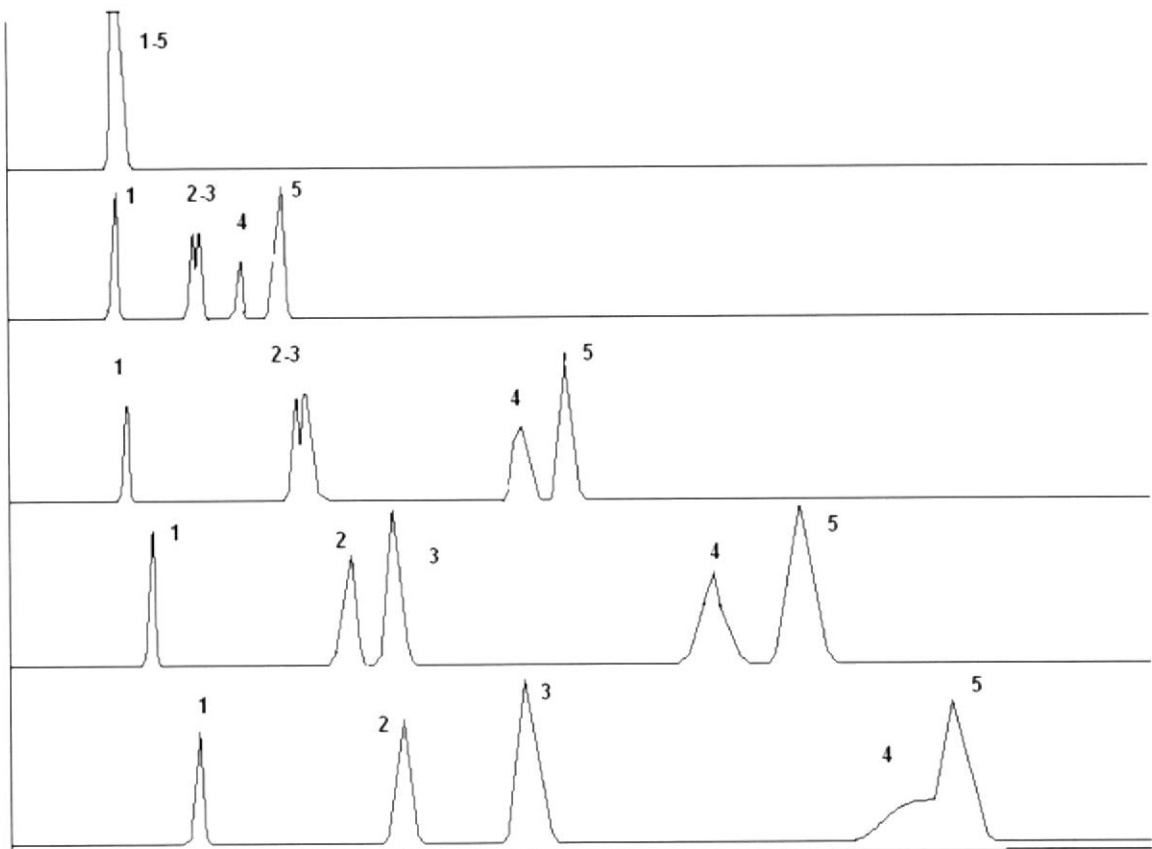
Asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir 5 pasos fundamentales:

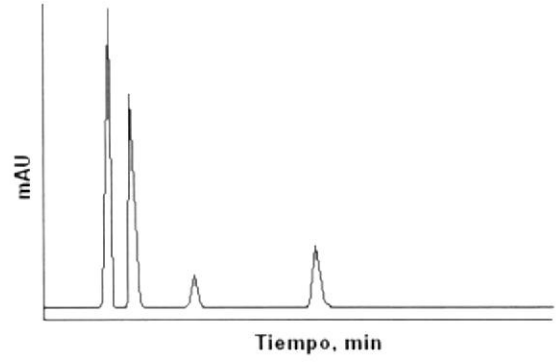
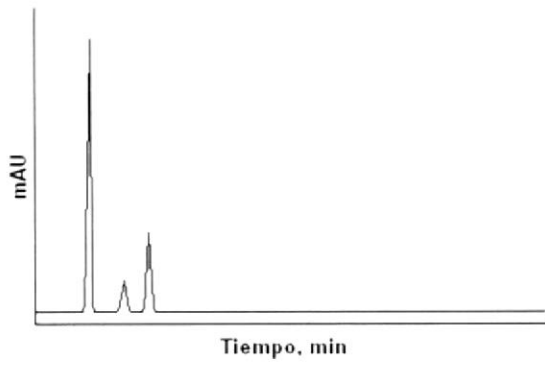
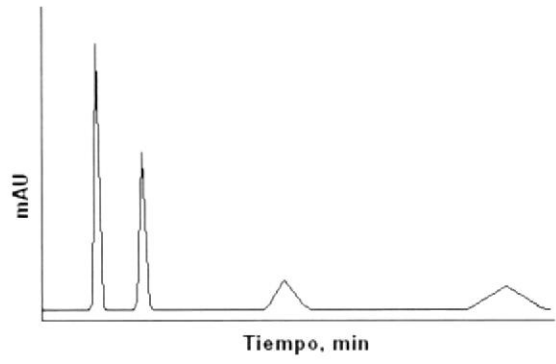
- Determinar la composición inicial y final del solvente
- Ajustar el tiempo del gradiente
- Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- Regresar a las condiciones iniciales la columna.

Efecto de la Fuerza del Solvente en la Separación

100 % CAN, 60 % CAN, 50% CAN, 45% CAN, 40% ACN



60% Metanol
40% Agua



60% ACN
40% Agua

60% Isopropanol
40% Agua

Sistemas de Inyección de Muestra

Estos sistemas han variados durante la historia del sistema de HPLC, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión que ya están de desuso. Hoy se utiliza el sistema de Válvulas inyectoras.

Columnas y Fases Estacionarias

Fuentes de daño de una columna de HPLC:

- * Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fases móviles
- * Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras
- * Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos

Columnas HPLC y Parámetros Óptimos

Diámetro Interno Velocidad de Flujo Cantidad de Muestra Volumen de Muestra

mm	ml/min	mg	ul
1	0.06	0.05	0.05-1
2	0.25	0.2	0.2-5
3	0.6	1	1-20
4	1	5	5-80
10	6	30	30-500
25	39	200	200-3000



Cromatografía en Fase Reversa RP-HPLC

Como escoger Columnas de Fase Reversa

- Química de la Fase Estacionaria: RP18, RP 8, etc
- Tipo de Partículas (Irregulares o Esféricas): Sorb , Spher
- Cartucho y Accesorios de la Columna
- Diámetro de Columna: 2- 4.6 mm
- Tamaño de las partículas: 3 , 5 , 10 um
- Medida de los Poros y Volumen: 60, 100 , 500 ,10000A etc.
- Área de Contacto
- % de Carbono (Contenido de Fase Reversa):
12- 22%, ODS, ODS2, etc.
- Empaque Monomérico o Polimérico

Fases Estacionarias Vs Fase Movil

FASE MOVIL	SORBENTES
Baja Polaridad	Baja Polaridad-RP 18
Pentano	
Hexano	RP 8
CH ₂ Cl ₂	Fenil
THF	RP2
Acetato Etilo	CN
Acetona, Metanol	NO ₂
Acetonitrilo	NH ₂
Agua	Diol
	Si
Alta Polaridad	Alta Polaridad

Detección

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferencia.

Los tipos de detectores en HPLC se clasifican en:

-Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. *Ejemplo: Detector de Índice de Refracción*

Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta*

Los detectores más utilizados en HPLC son:

Detector UV. Hay básicamente tres tipos:

-Detector de Longitud de Onda Fija

-Detector de Longitud de Onda Variable

-Detector de Arreglo de Diodos

Detector de Índice de Refracción. Existen muchos diseños de estos detectores, pero solamente existen ahora dos tipos: Tipo Deflexión y Tipo Fresnel

Detector de Fluorescencia. Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.

Detector de Fluorescencia Inducida por Láser

Según el sistema óptico

-Detectores Electroquímicos. Pueden ser clasificados en tres tipos:

*Detector Amperométrico

*Detector Conductimétrico

*Detector Potenciométrico

Se deben tener algunas precauciones con los detectores electroquímicos para asegurarse análisis reproducibles:

-Chequear que estén conectados adecuadamente a tierra la bomba, el detector y registrador (integrador.)

- Usar bombas reciprocantes de doble pistón
- Mantener en todo momento el flujo de la fase móvil en el detector.
- Operar con el voltaje adecuado
- Monitorear la altura de los picos para observar cambios en la eficiencia que nos indique la necesidad de reacondicionar los electrodos.
- Tener electrodos de referencias extras en solución 3M de NaOH y reemplazar el electrodo de referencia en la celda 1 ó 2 veces a la semana.

Desconectar el detector electroquímico cuando este limpiando las columnas.

Utilizar agua, buffers y solventes orgánicos de alta pureza.

Derivatización

Existen dos tendencias:

- Pre-Columna
- Post-Columna

Problemas más comunes encontrados en HPLC

Esta es una lista de los problemas normalmente encontrados en HPLC, sus posibles causas posibles, y cómo solucionarlos.

Presión Alta

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC o Guarda Columna por partículas.

Solución: Invierta la Columna y Enjuagar con solvente, teniendo la columna desconectada del detector. Si esto no funciona reemplace el filtrado a la entrada de la columna. Si la presión sigue alta reemplace la columna.

Solución a largo plazo: Asegurar que todas las fases móviles se filtren apropiadamente antes que entren a la bomba de HPLC. También filtre todas las muestras antes de inyectarlas.

Pérdida de la Resolución

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC ó del Guarda Columna por partículas.

Solución: vea la sección de Presión Alta

Solución a largo plazo: Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.

Picos Hendidos

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC o del Guarda Columna por partículas.

Solución: Marcha atrás columna roja con presión baja está al lado de abre. Si es necesario reemplace el filtrado de la entrada o la columna.

Solución a largo plazo: Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.

Variación en los Tiempos de Retención

Posible causa : Aire atrapado en la bomba debido a gases disueltos en fase móvil.

Solución: Bomba primera y está fases seguras tan móviles es propiamente [degassed]

Solución a larga plazo: Asegurar que la fase móvil está propiamente y adecuadamente desgasificada. Si usa des gasificación electrónica en línea asegura esa cadencia del flujo no es demasiado alto para evita [degassing] completo.

Variaciones de la Línea Base

Posible causa: Burbujas del aire atrapados en la celda del detector debido a una mala des gasificación de los solventes de la fase móvil.

Solución: Asegurar que todas las fases móviles estén debidamente desgasificadas y considerar el uso de un registrador de la presión a toma de corriente del detector.

Línea Base con mucho Ruido

Posible causa: Aire atrapado en celda del detector o en la bomba.

Solución: Enjuague el sistema y purgue la bomba de HPLC. Use Solventes desgasificados adecuadamente para mantener constante la velocidad de flujo de la fase móvil del sistema.

Picos Falsos (Detectores Electroquímicos y de Fluorescencia)

Posible causa: Oxígeno Disuelto

Solución: Desgasificar adecuadamente las fases móviles para reducir la concentración de oxígeno disuelto.

Solución a largo plazo: Agregar un sistema de filtración al vacío en línea. Periódicamente chequear el nivel de oxígeno disuelto.

Baja ó Ninguna Presión

Posible causa: Trabajar con bombas, sellos ó pistones expuestos por mucho tiempo a partículas en suspensión en la fase móvil.

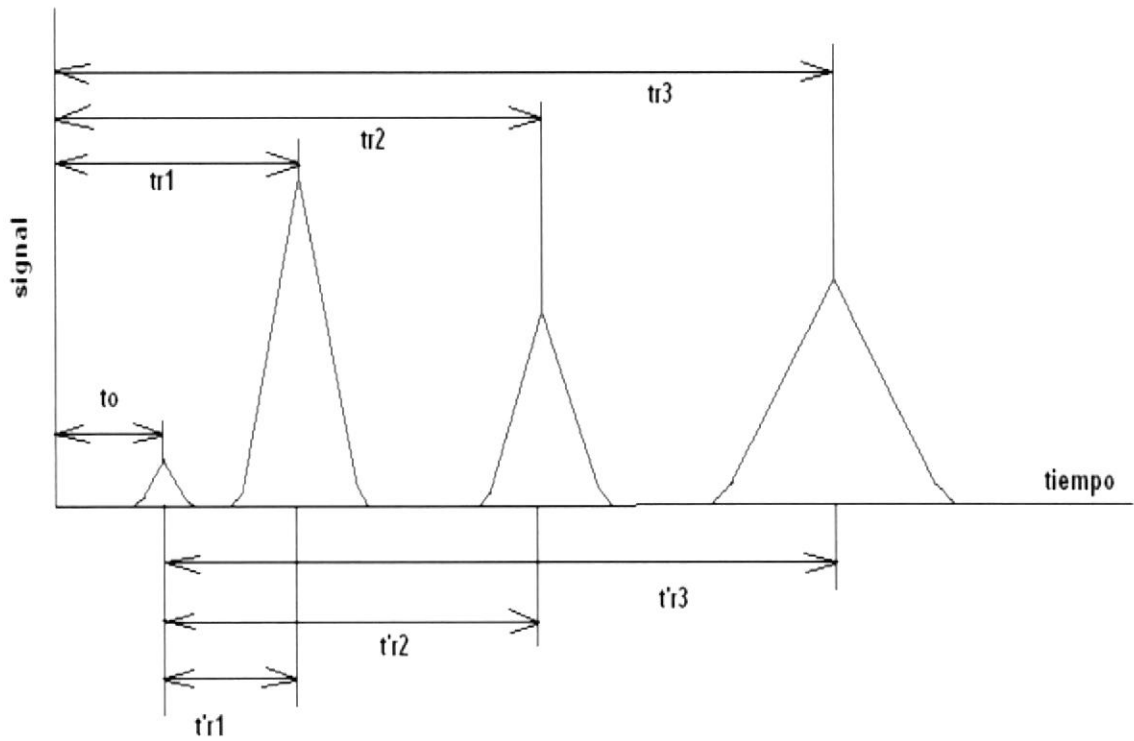
Solución: Reemplace los sellos o pistones, si es necesario.

Foto revisión de un equipo de cromatografía de gases- masas cambio de detector FID



Nomenclatura y Cálculos

CIBT



Tiempo de Retencion

$$t'_r = t_r - t_o$$

Factor de Capacidad

$$k = t'_r / t_o = (t_r - t_o) / t_o$$

Selectividad

$$a = K'_1 / K'_2 = (t_{r2} - t_o) / (t_{r1} - t_o)$$

Numeros y Altura de Platos Teoricos

$$H = L / N$$

$$N = 16(t_n / W)^2$$

CIBT

CIBT

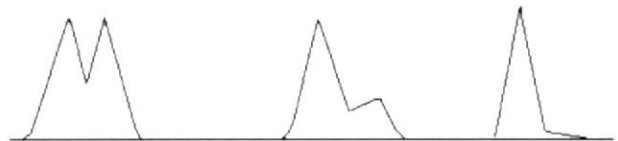
Nomenclatura y Cálculos

Resolución (R)

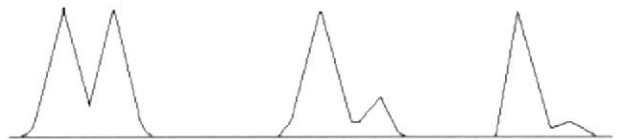
$$R = \frac{1}{4}(a-1) \times \sqrt{N} \times k' / (1+k')$$

$$R = 0.5(t_2 - t_1) / (W_2 - W_1)$$

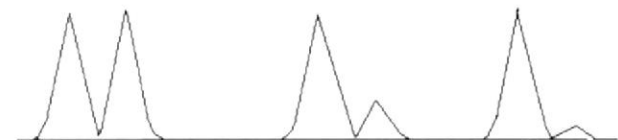
R=0.8



R=10

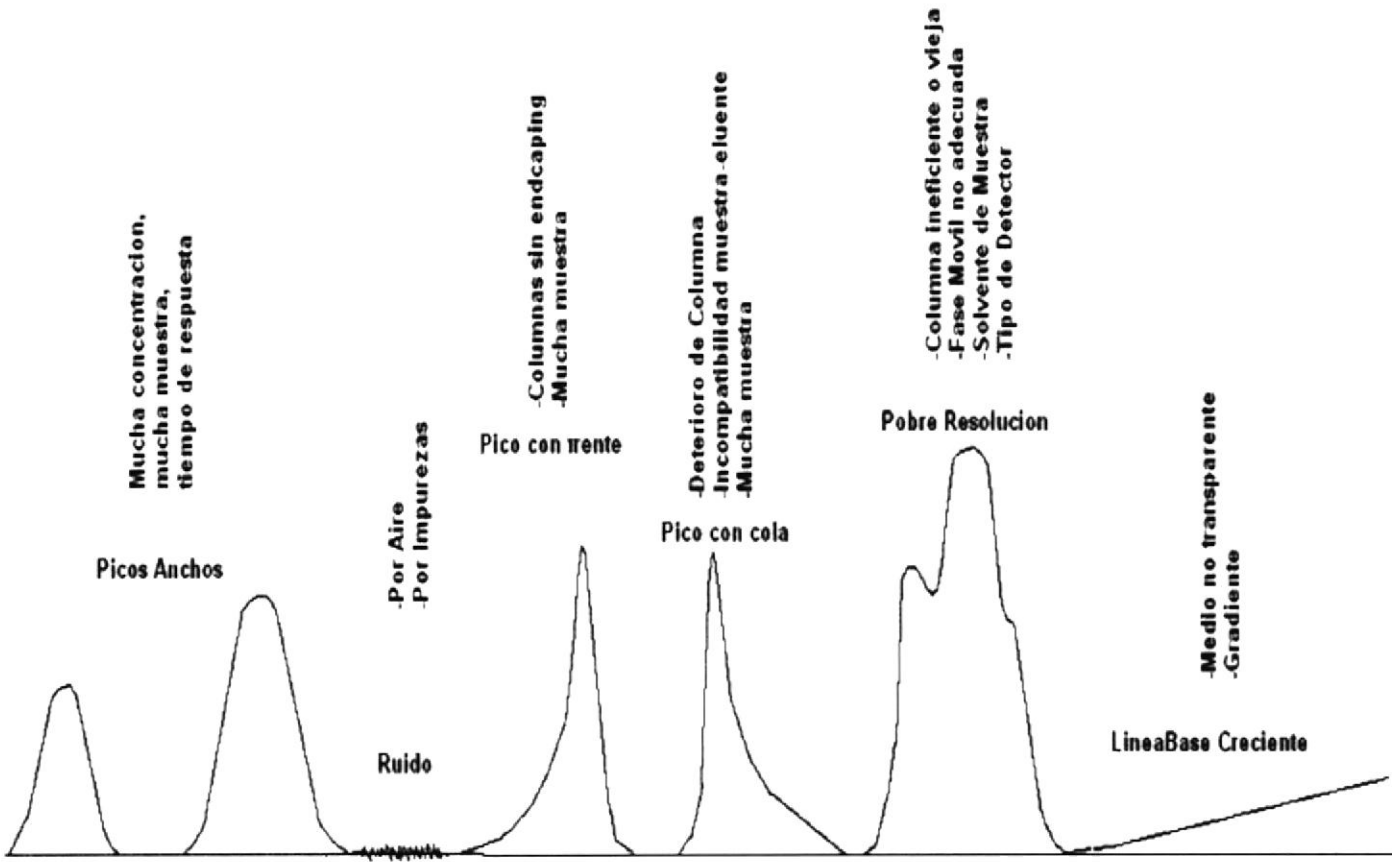


R=1.25



Formas de Picos

CIBT



CIBT

Recomendaciones para adquirir un sistema de HPLC

Estos son algunos consejos para adquirir un sistema de HPLC:

Cuántas muestras y tipos de ensayos

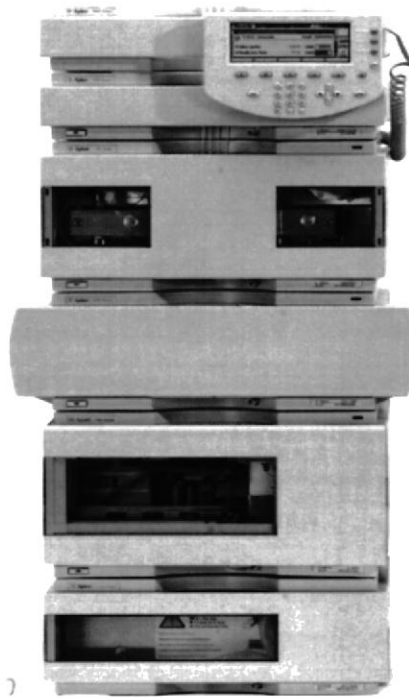
La facilidad para reemplazar los sellos de las bombas (mantenimiento)

La exactitud y precisión del sistema de bombas

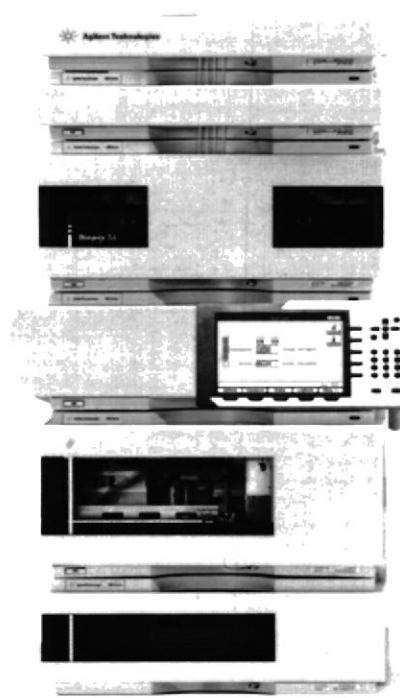
El Sistema de Gradiente. La suavidad y reproducibilidad de la mezcla

Que tipo de servicio ofrecen ó puede ofrece la casa vendedora

Suministro de software y compatibilidades.

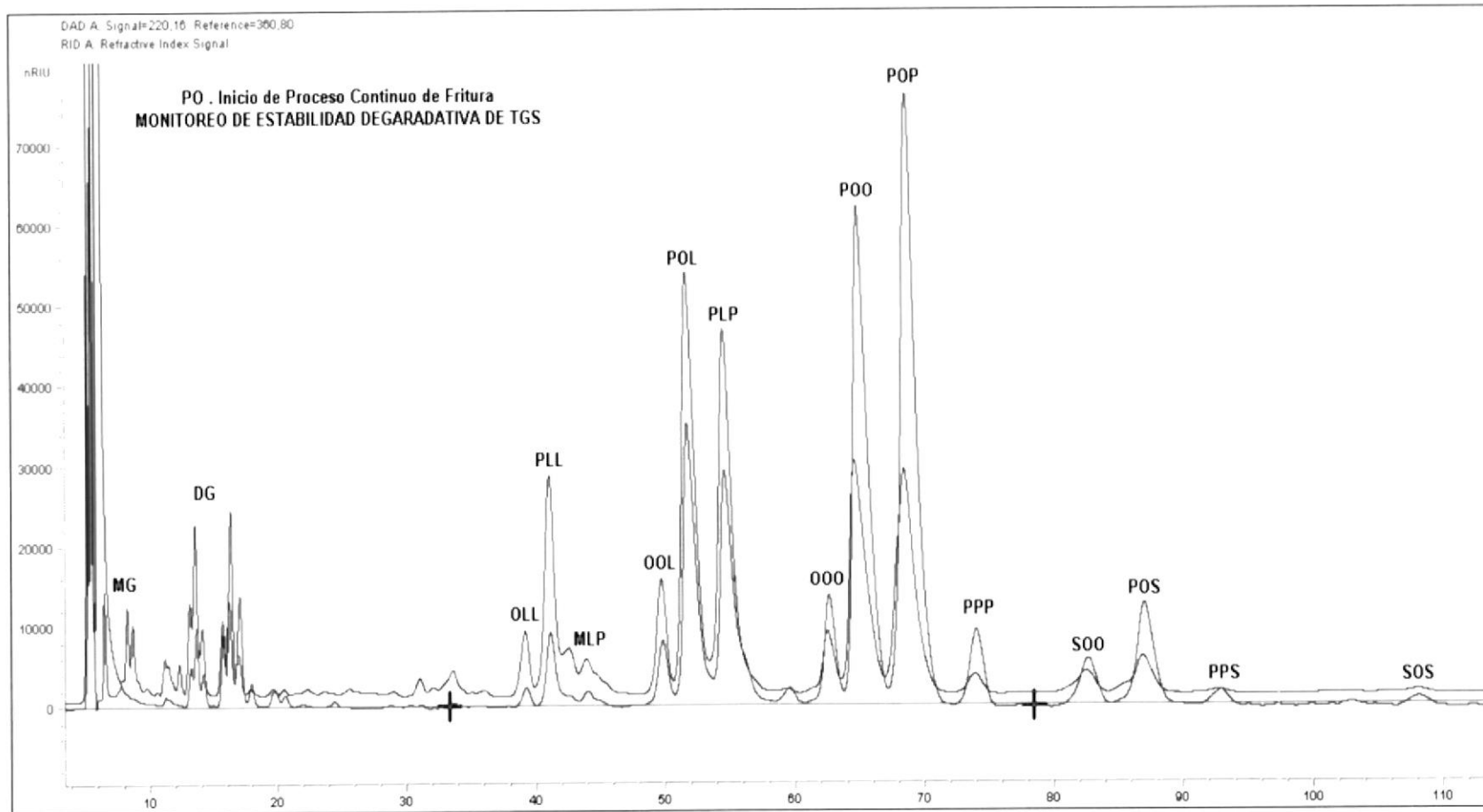


HP 1100



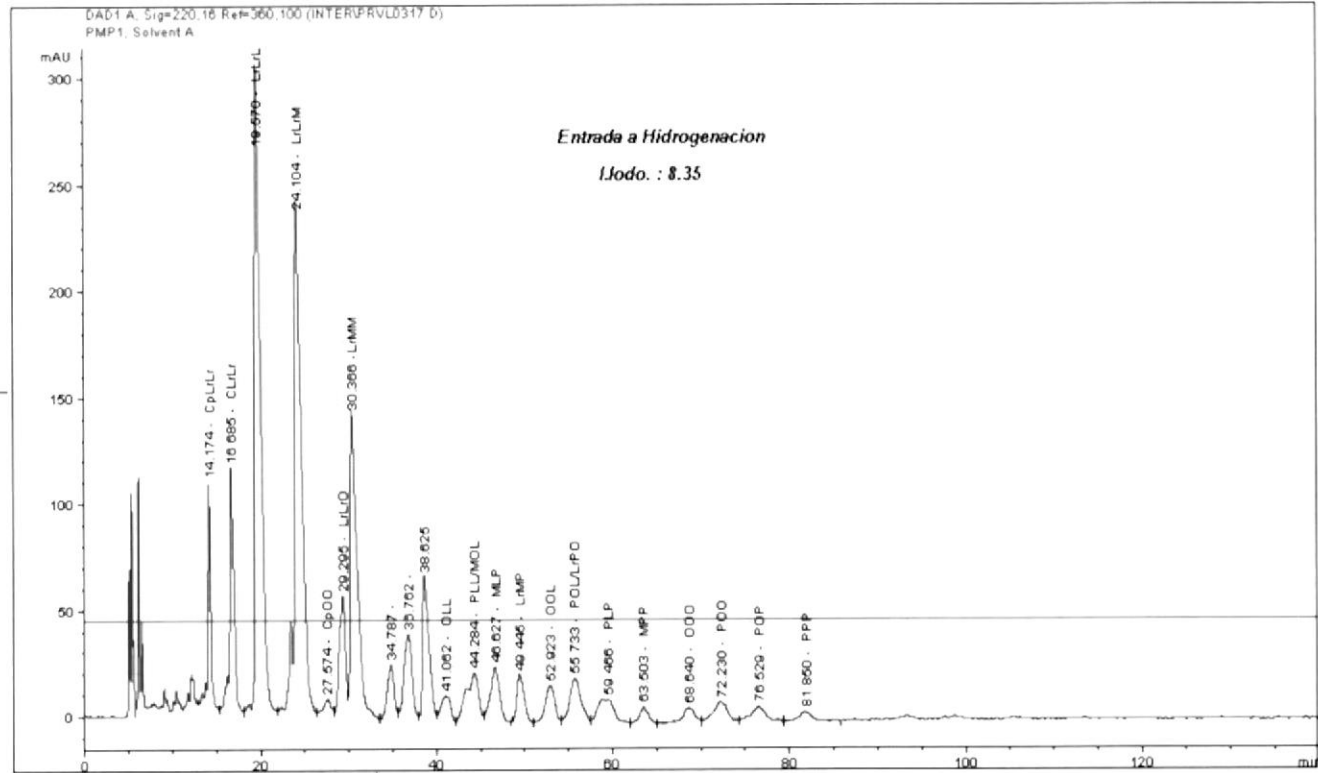
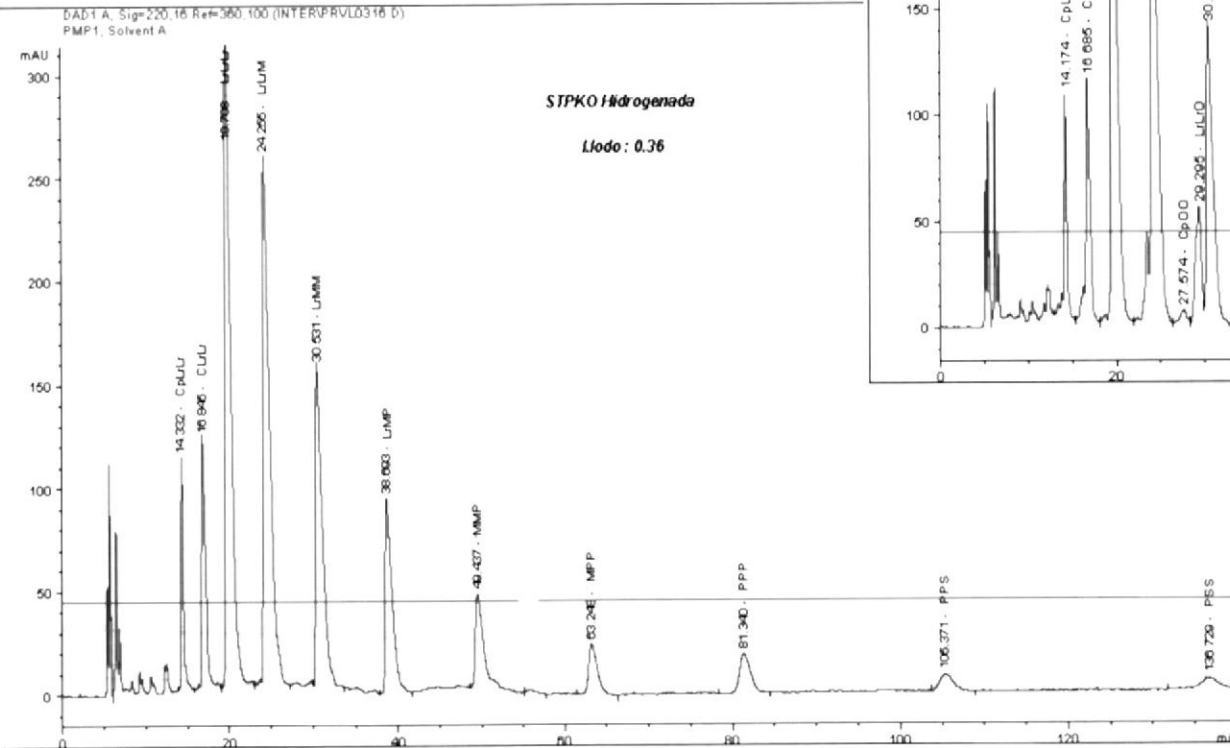
HP 1200

Análisis de Triglicéridos

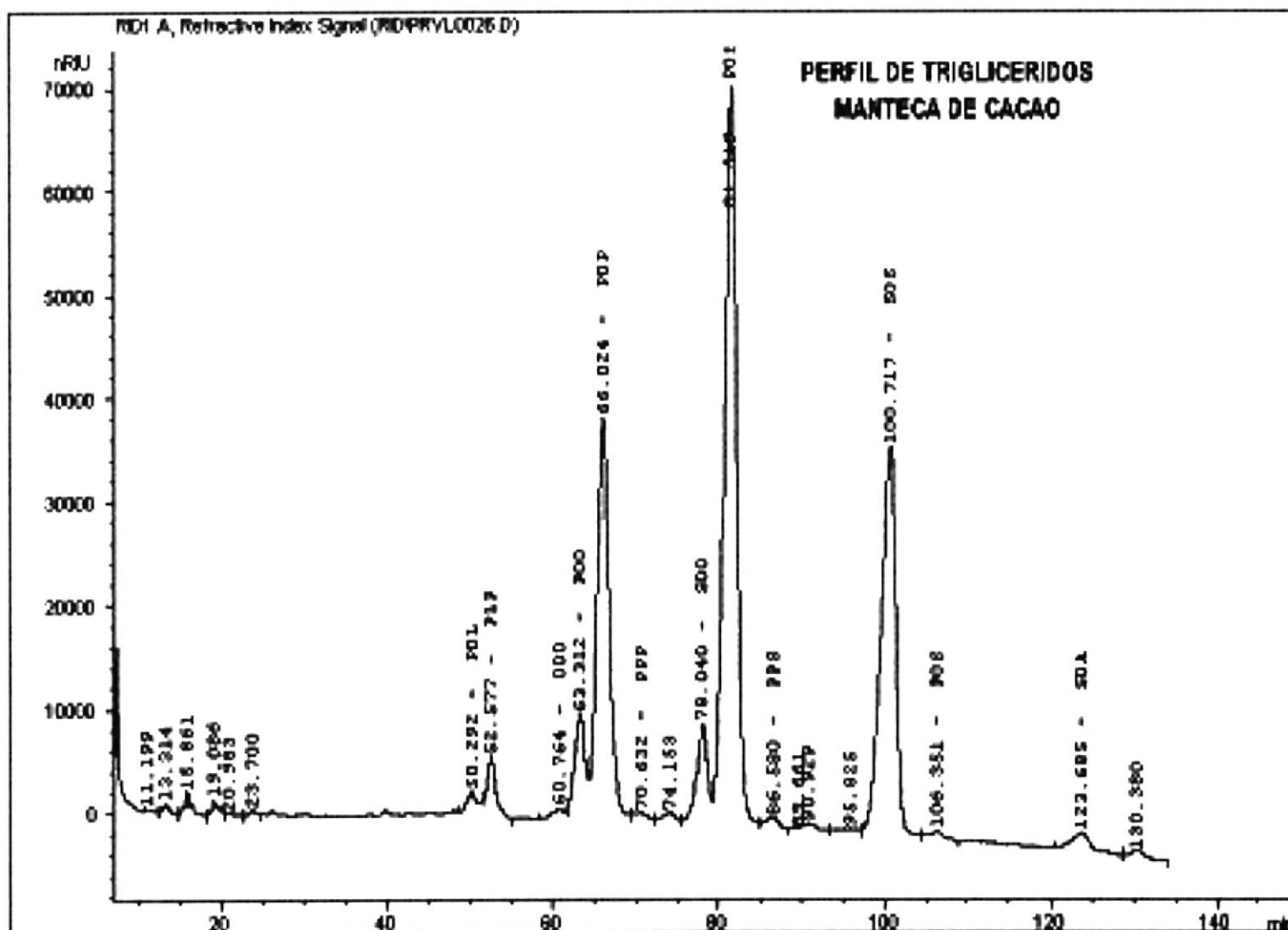


Fase Reversa: Columnas Dos en serie ODS2, 250 x 4.6mm , 5 um , Fase Móvil: ACN/Acetona 55/45

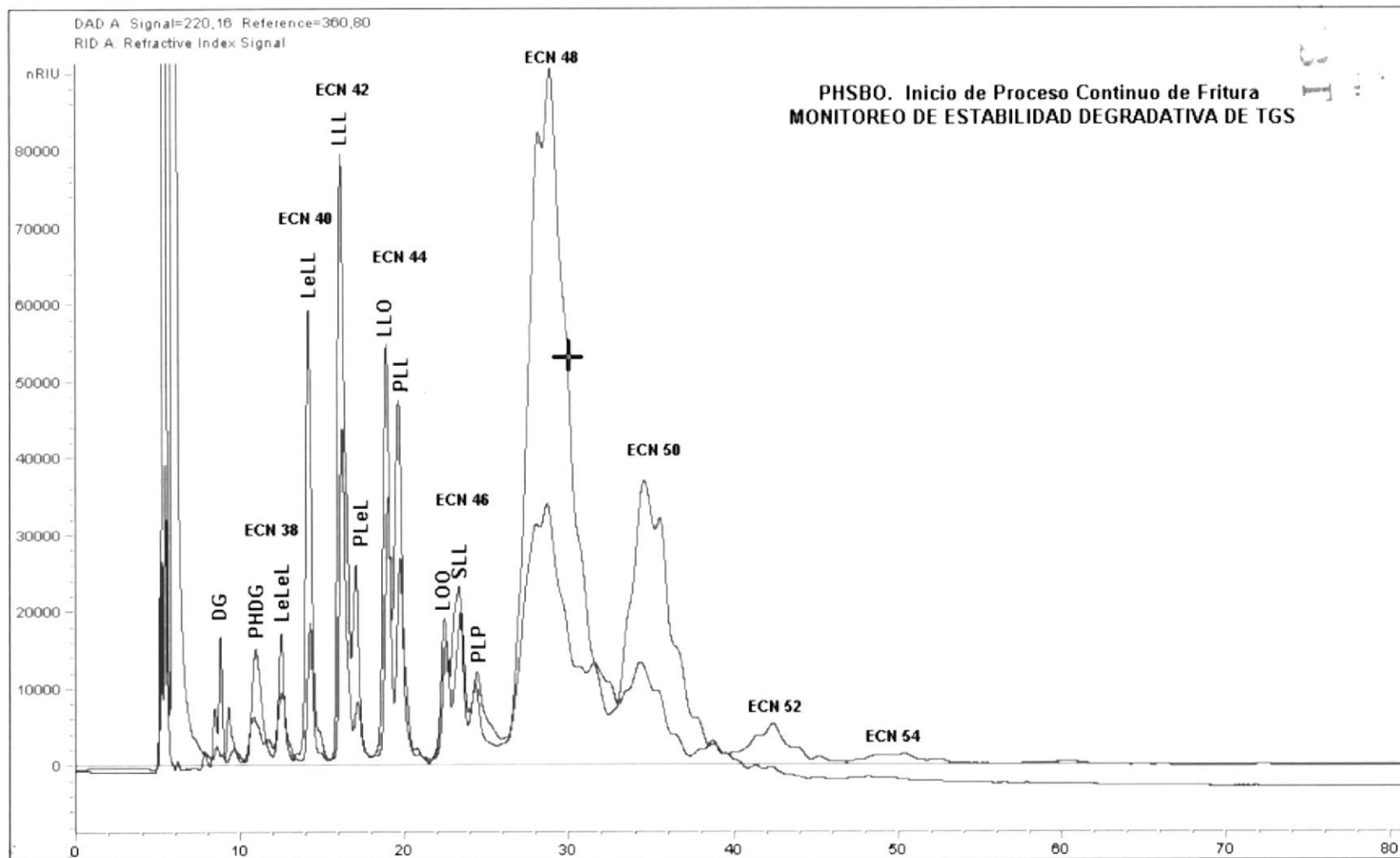
Análisis de Triglicéridos



Análisis de Triglicéridos

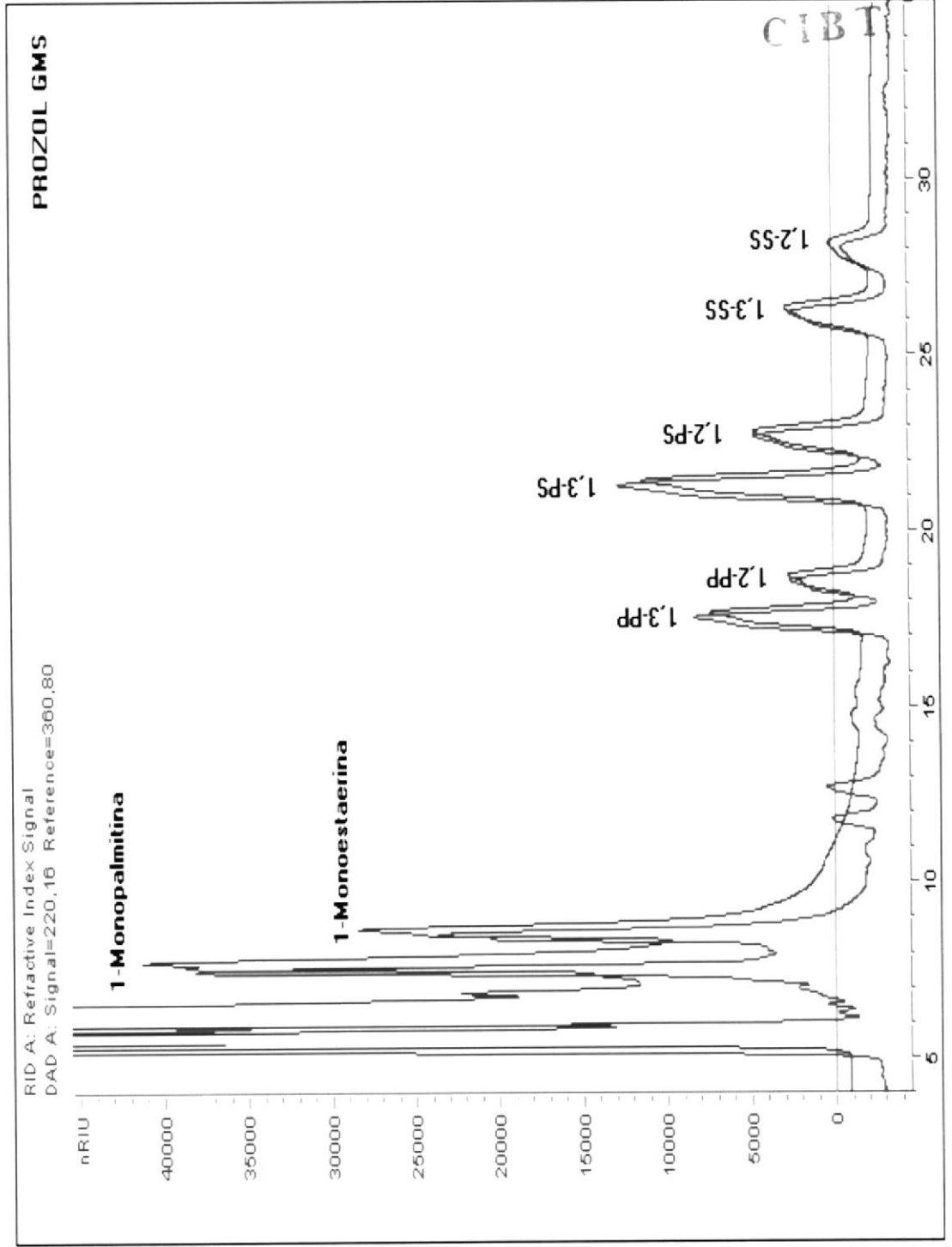


Análisis de TGs por ECN para Hidrogenados

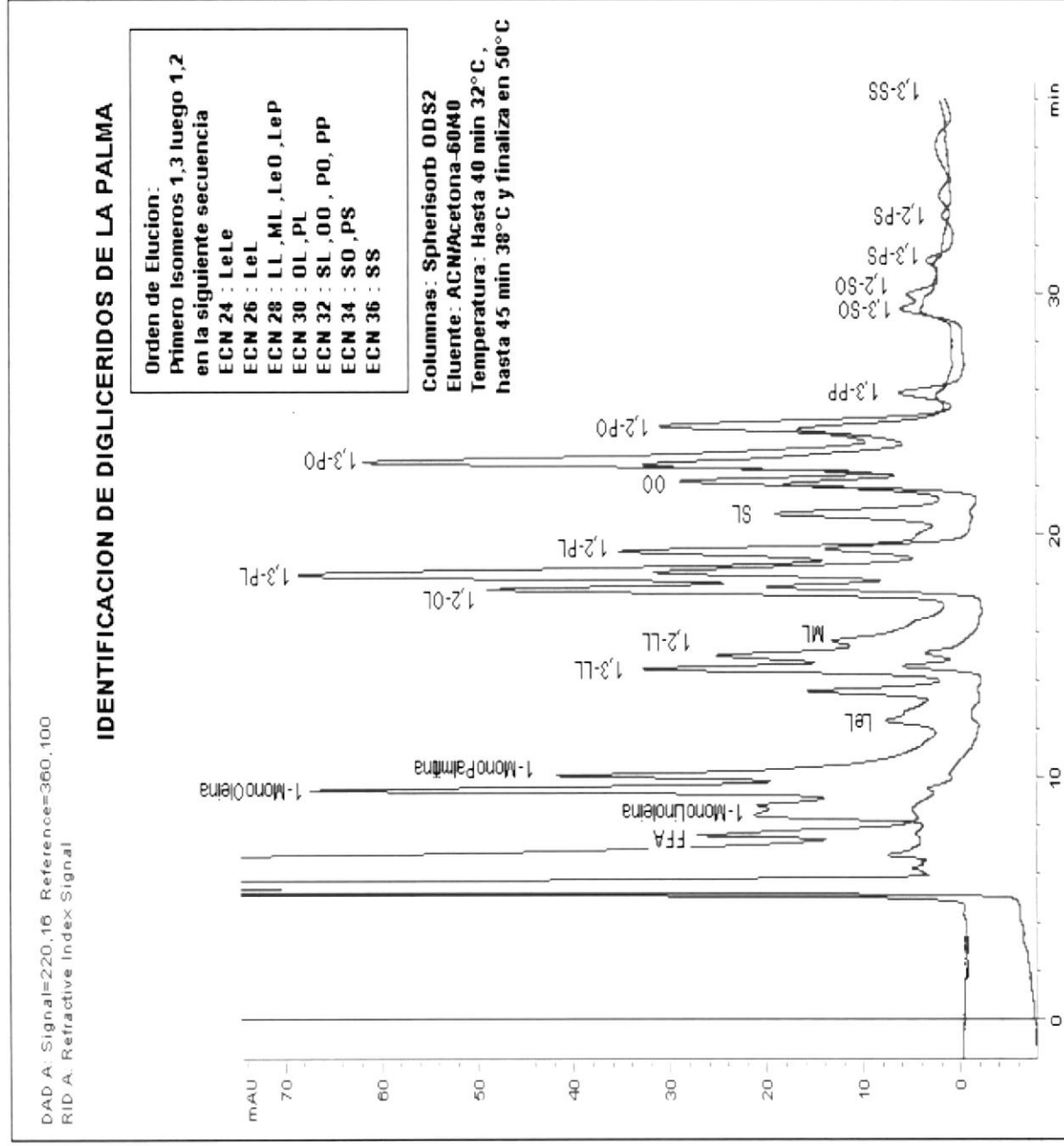


CIBT

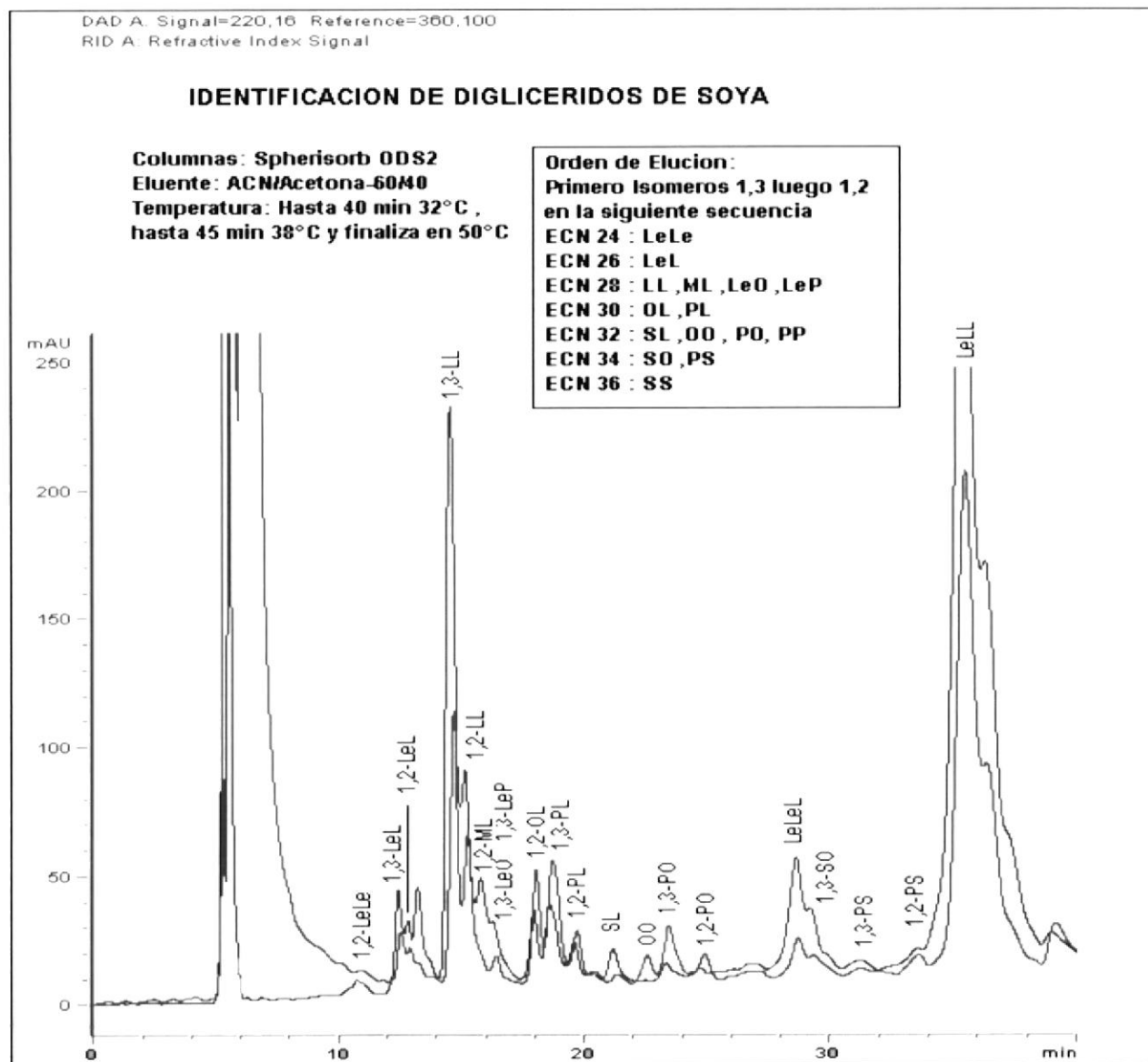
Análisis de Mono- y Di glicéridos



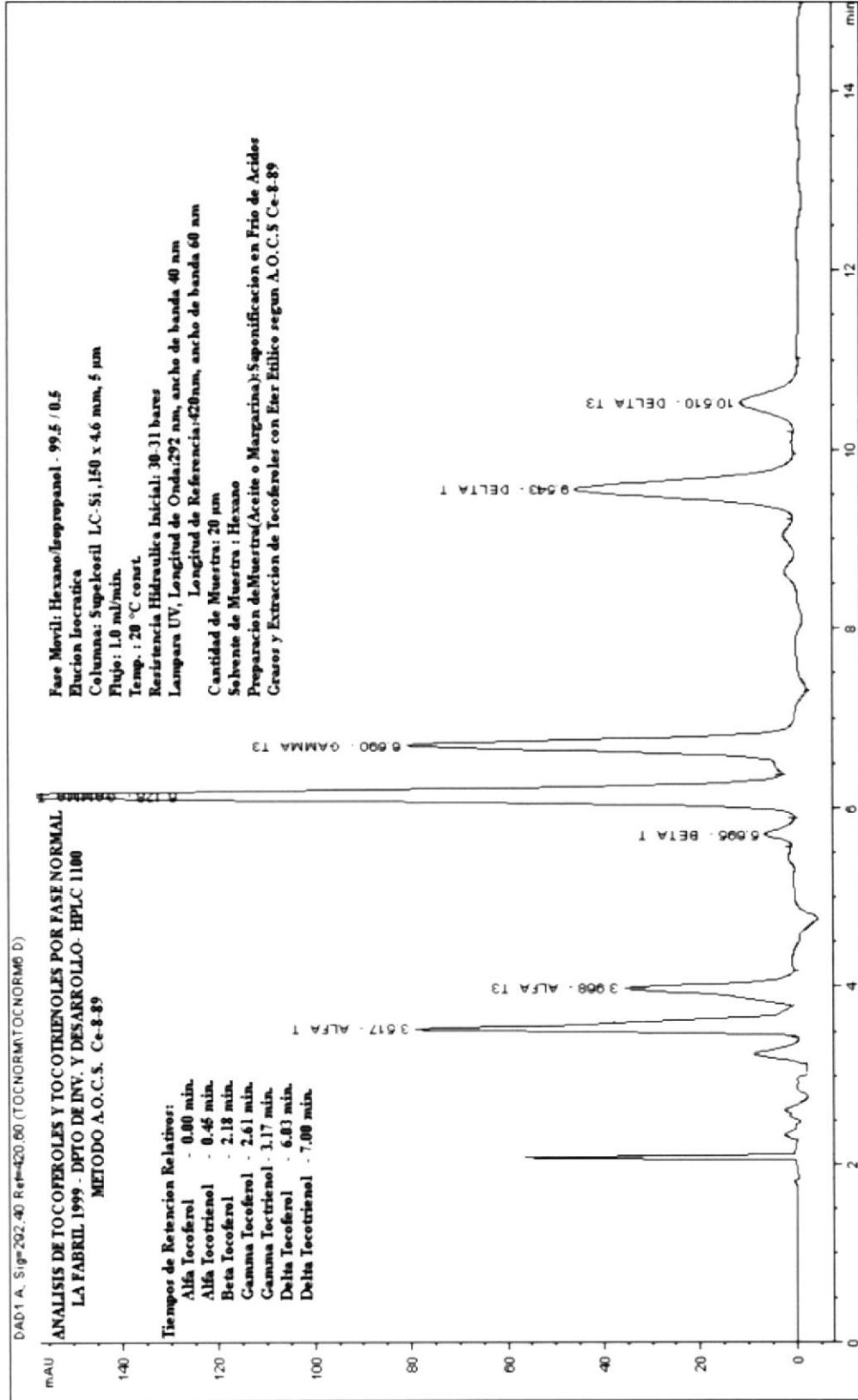
Análisis de Mono- y Di glicéridos



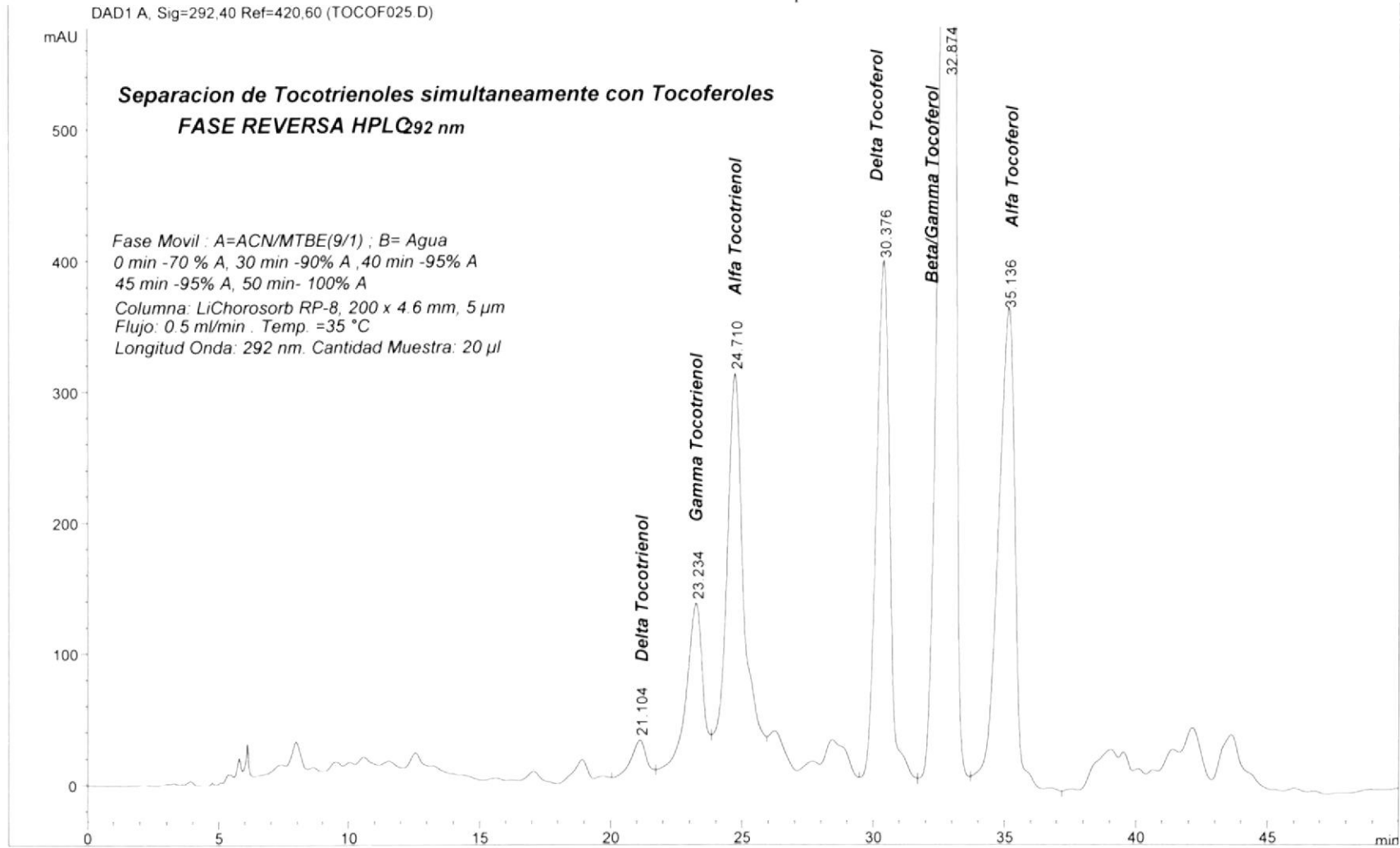
Análisis de Mono- y Di glicéridos



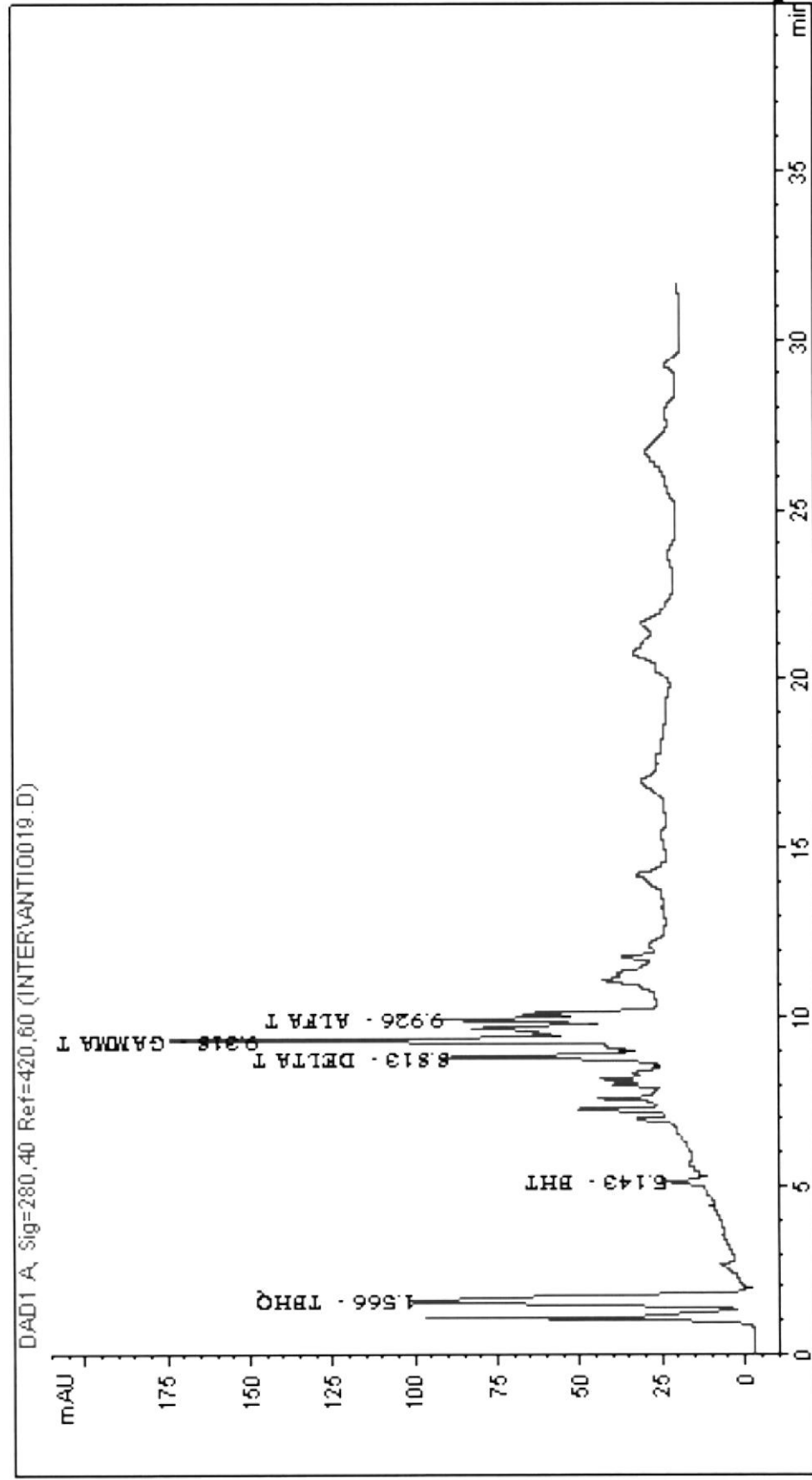
Análisis de Tocoles por Fase Normal



Análisis de Tocoles por Fase Reversa

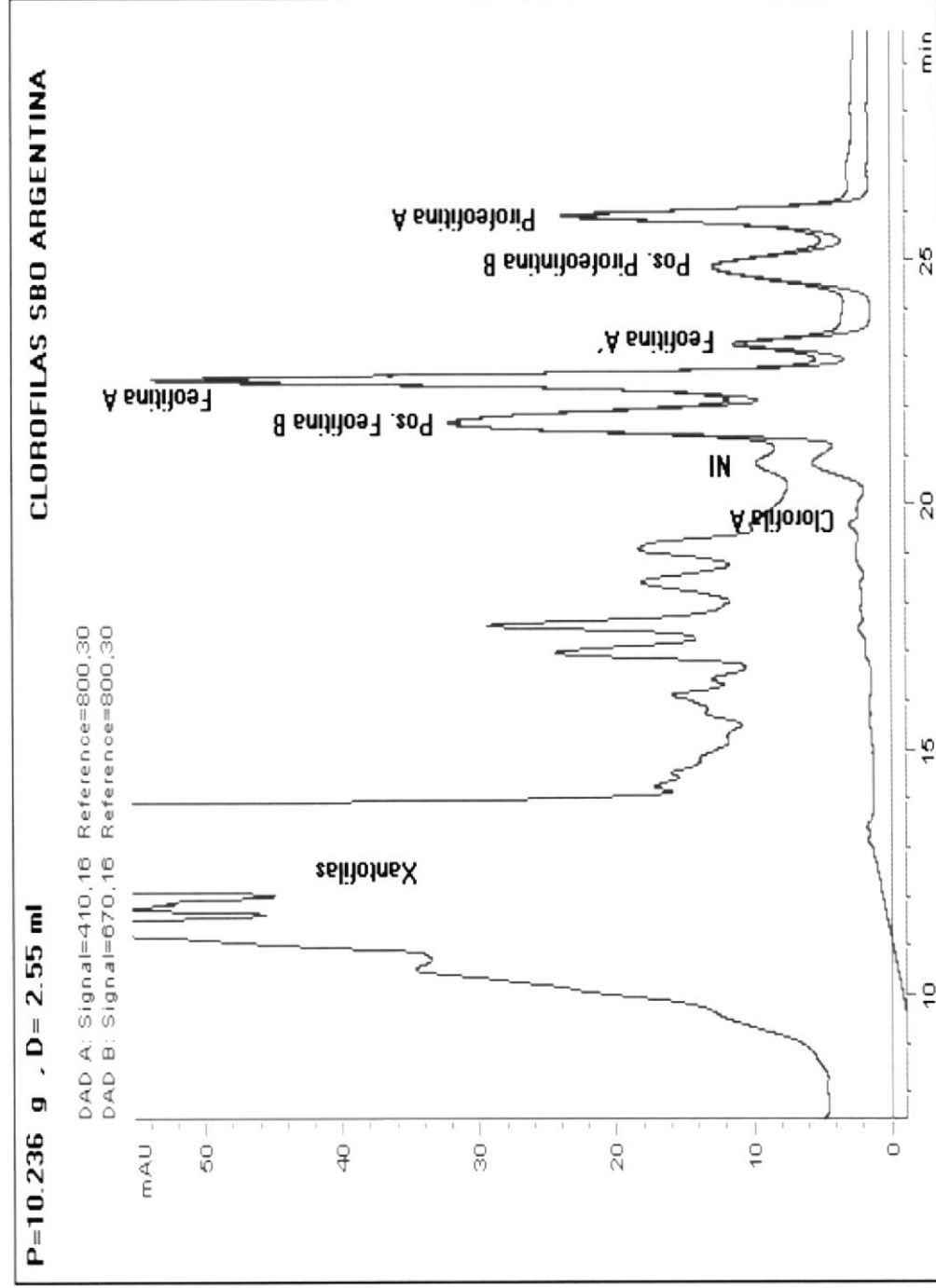


Análisis de Antioxidantes Fenólicos

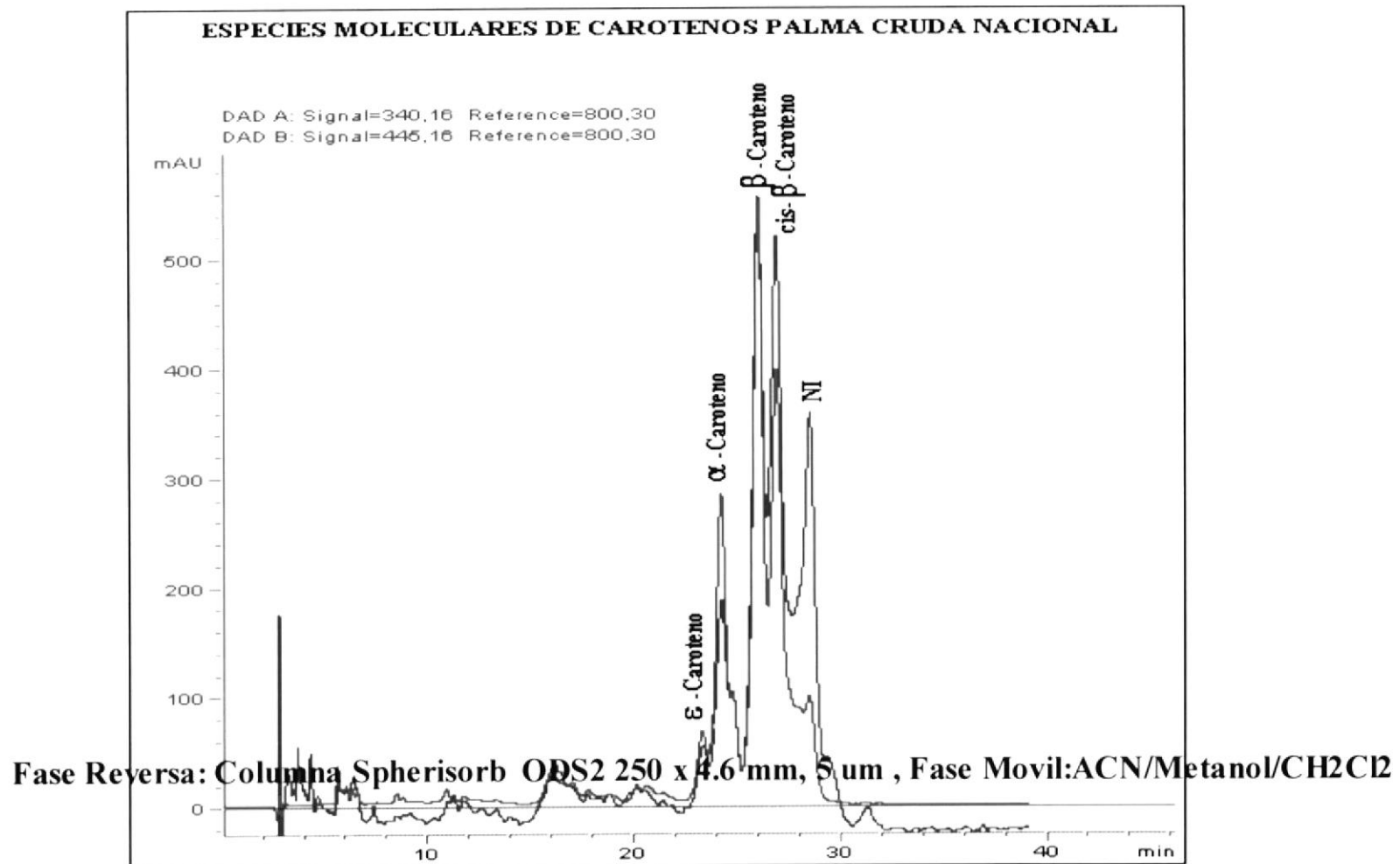


Fase Reversa: Columna Hypersil ODS, 100 x 4.6, 5um Fase Movil: ACN/Agua

Análisis de Clorofilas y Derivados Termo degradación



Análisis de Especies Moleculares de Carotenos



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

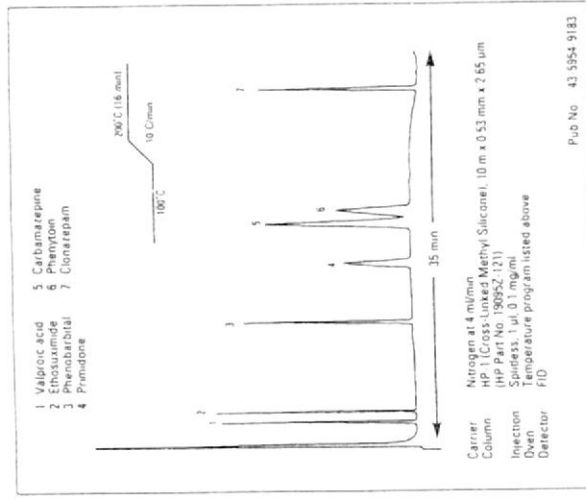
- Puedo manifestar realmente que fue muy beneficioso este periodo de practicas, pues conocí el funcionamiento de equipos instrumentales para el análisis de los diferentes productos dentro del proceso productivo de la Fabril S.A.. Es importante conocer y valorar el respeto entre compañeros de trabajo y dar repuestas eficientes y oportunas; además el manejo adecuado de un cronograma de trabajo dentro del laboratorio es fundamental, como parte de las actividades realizadas puedo recomendar
- Que la universidad incremente dentro del programa de estudio de la carrera de tecnología de alimentos más estudio y manejo de equipos de laboratorios.
- Que en el programa de estudio se considere la implementación de la norma ISO 17025 dentro de un laboratorio de ensayo.
- Que se den conocimientos básicos en electrónica, así como conocimientos bromatológico de la muestra a estudiar y aprovechar en máximo las herramientas de trabajo.
- Realizar análisis de costo por ensayo .

BIBLIOGRAFÍA

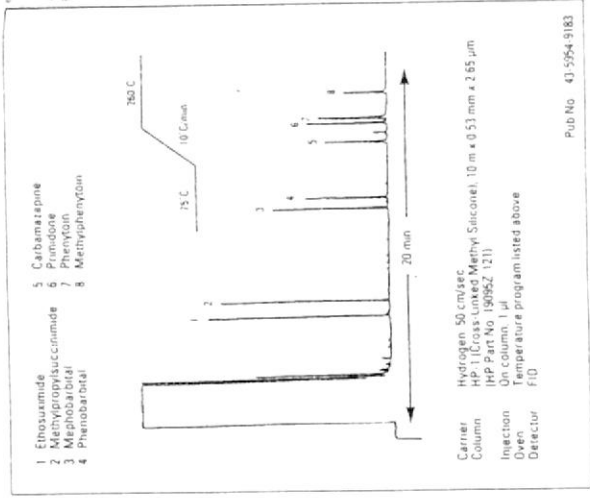
- A.O.C.S. Official Method Ce 5b- 89 Metodo de V.K. Shukla Metodo IUPAC 3.324
Analyses of Fats, Oils and Lipoproteins, AOCS , E.G. Perkins.Capitulo 12
- A&G Libro 10° Aniversario, Recopilación de Artículos Técnicos ediciones 1 a 41 –
1999 / 2000. por Asociación Argentina de Grasas y Aceites.
- HPLC. Htm Monografías .com/Archivos
- Memorias del X Congreso Latinoamericano AOCS de los Aceites y Grasas pag15-20
- Principios de Análisis Instrumental, Quinta Edición 2005, Sección V Capítulos 26, 27,
28, por Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman
-

ANEXOS

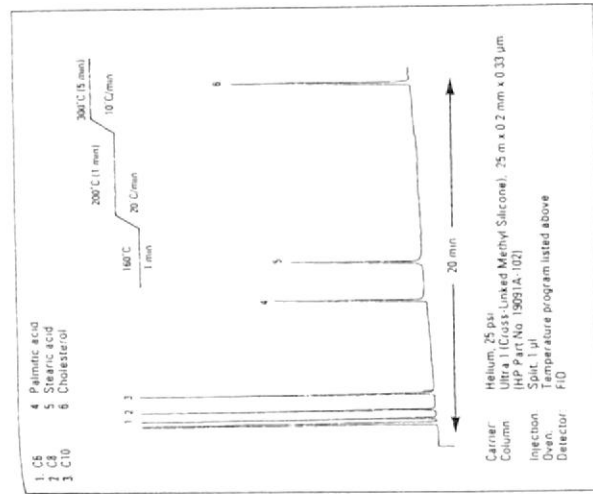
Fármacos antiepilépticos en plasma



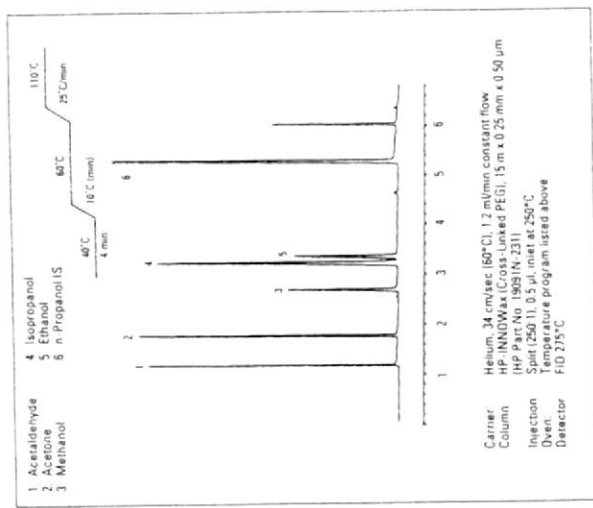
Anticonvulsivos



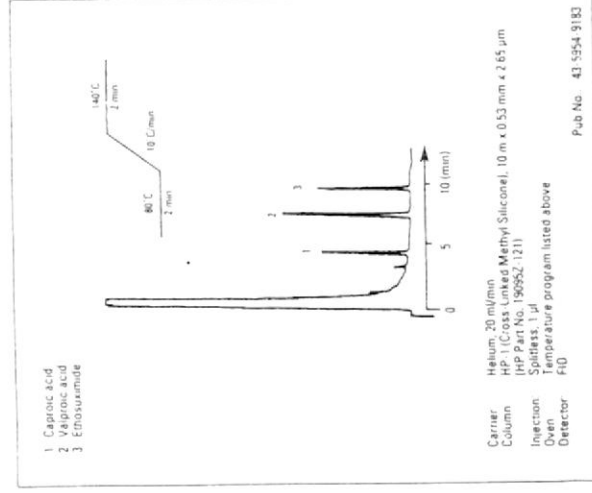
Coolesterol



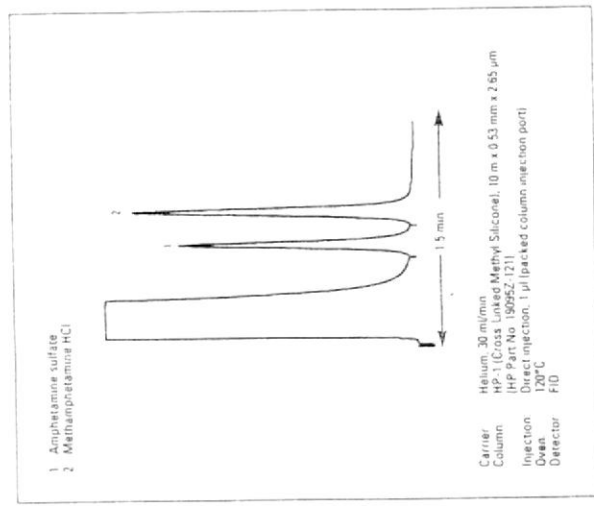
Alcoholes en sangre



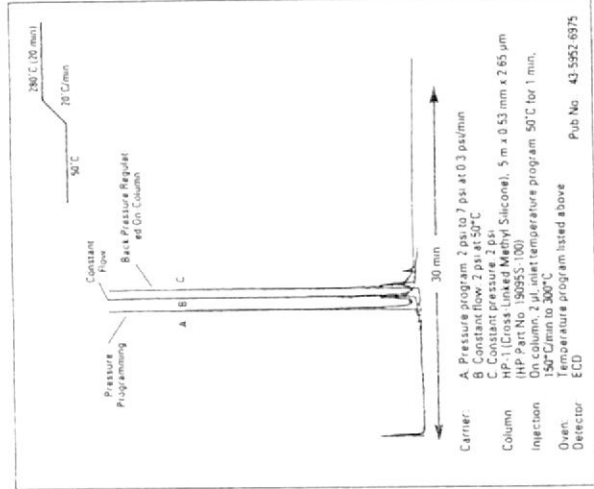
Fármacos antiepilépticos en plasma



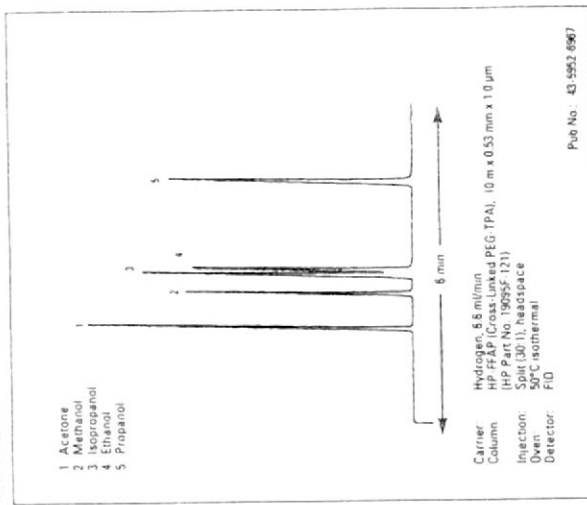
Amfetaminas inyectadas como sales



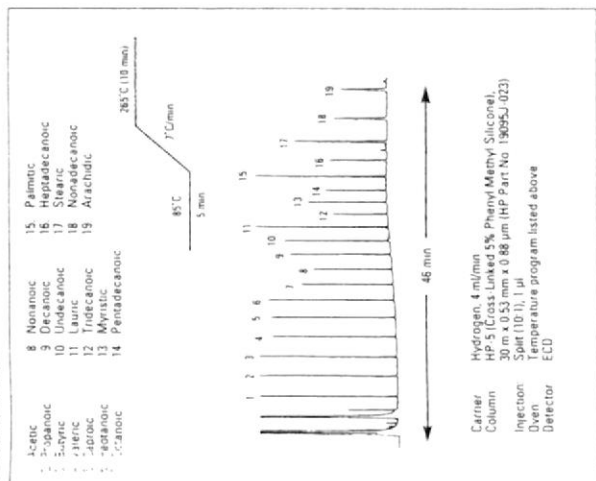
Flumetazona



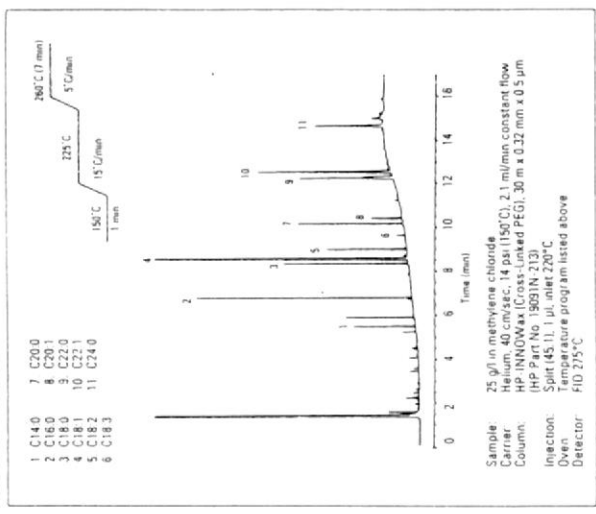
Alcoholes en sangre mediante espacio de cabeza



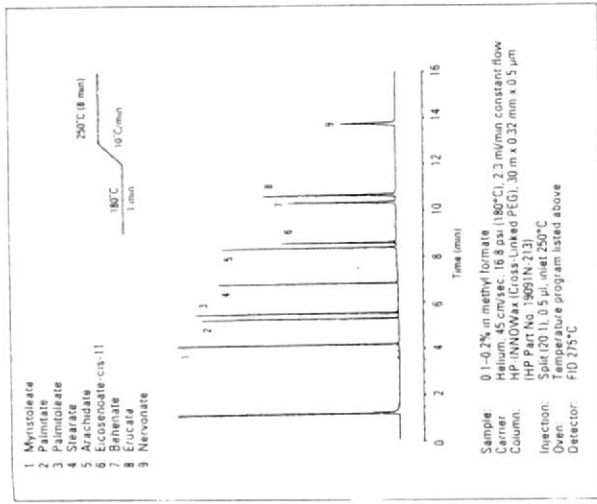
**Tricloroésteres de ácidos grasos—
cadena recta**



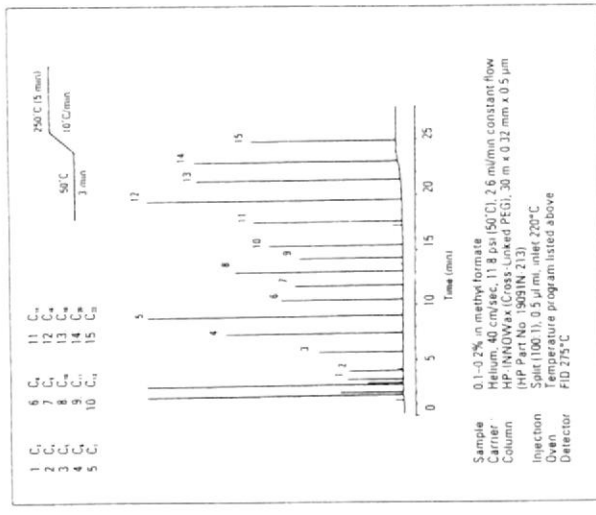
**Ésteres metílicos de ácidos grasos de
aceite vegetal**



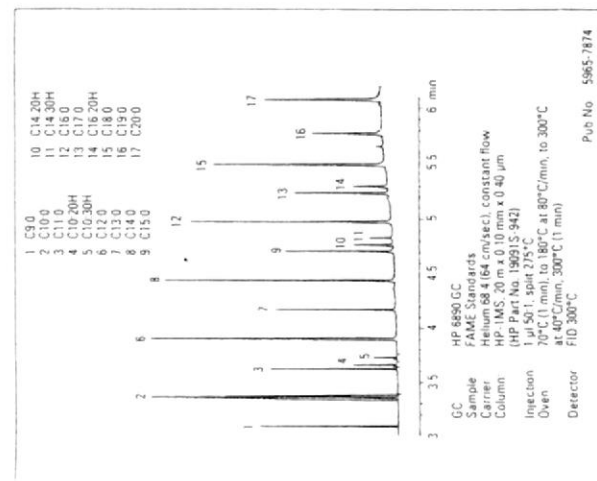
FAMES C14-C24



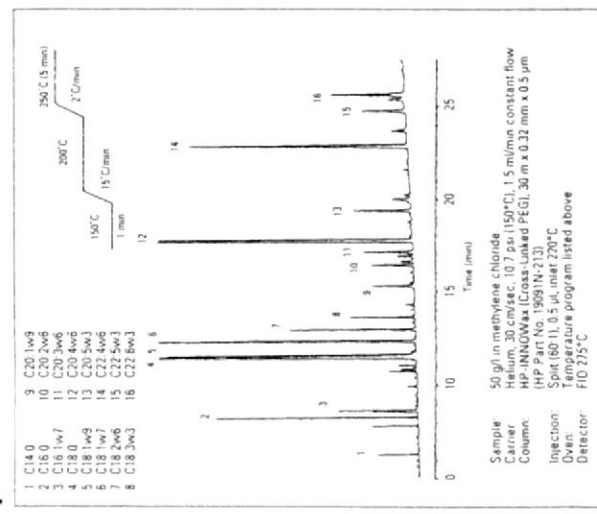
Ésteres metílicos de ácidos grasos



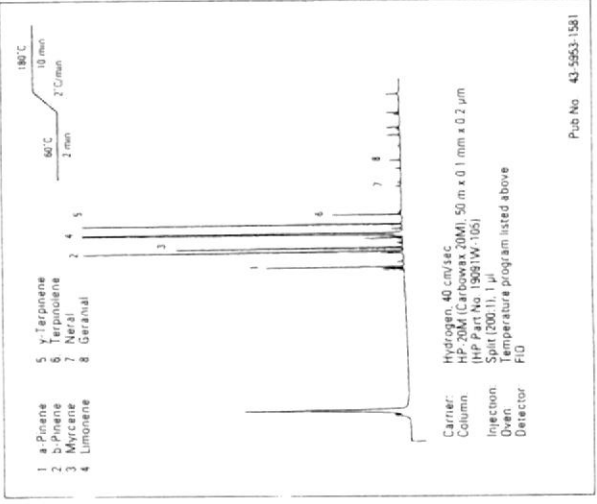
Ésteres metílicos de ácidos grasos



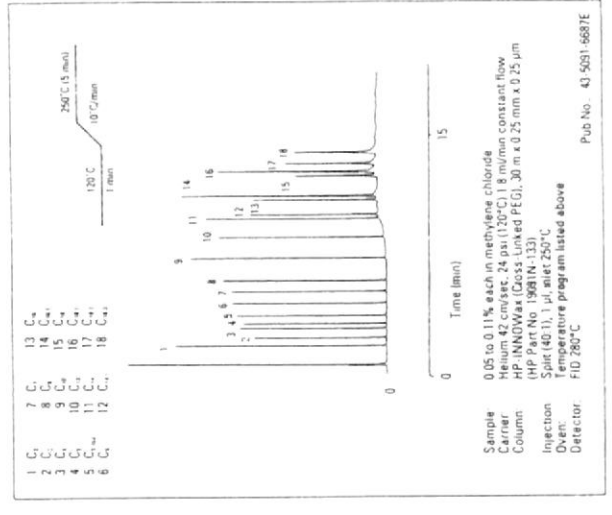
**Ésteres metílicos de ácidos grasos
poliinsaturados**



**Orgánicos volátiles en zumo de limón
natural**

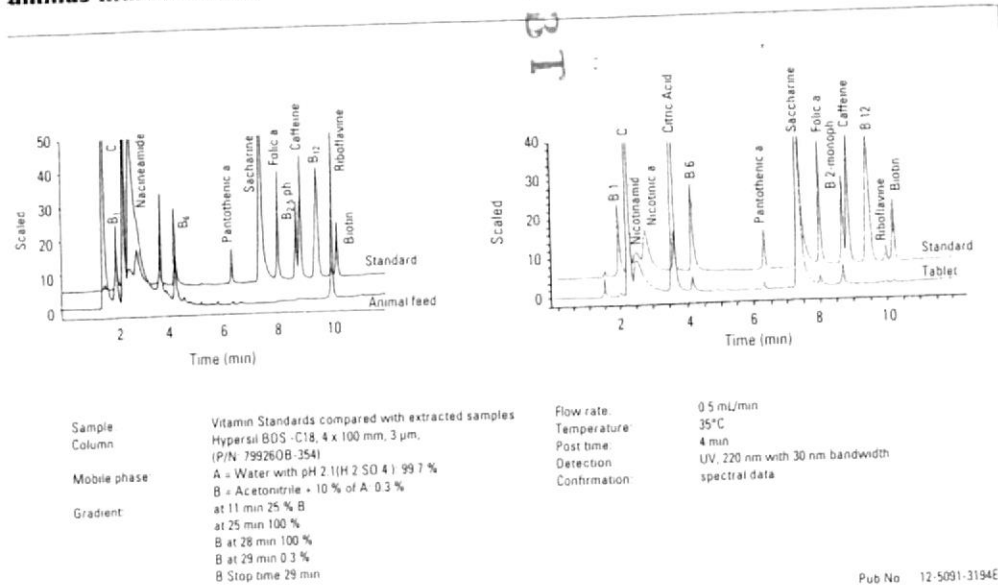


Ácidos grasos libres

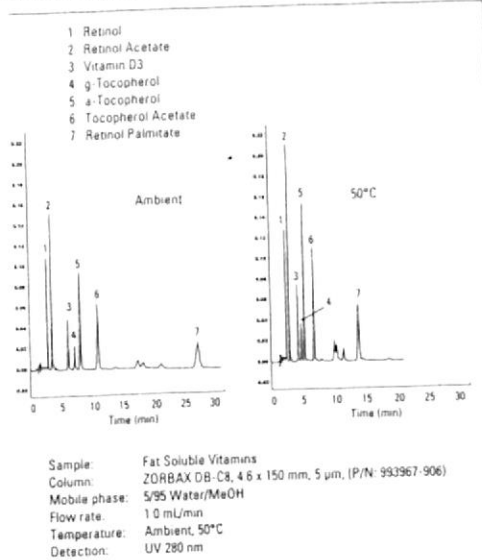


Alimentación y productos de consumo

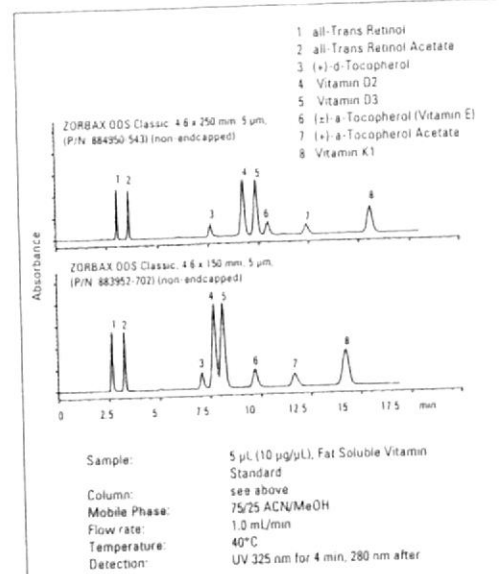
aminas hidrosolubles



vitaminas liposolubles en ORBAX XDB-C8

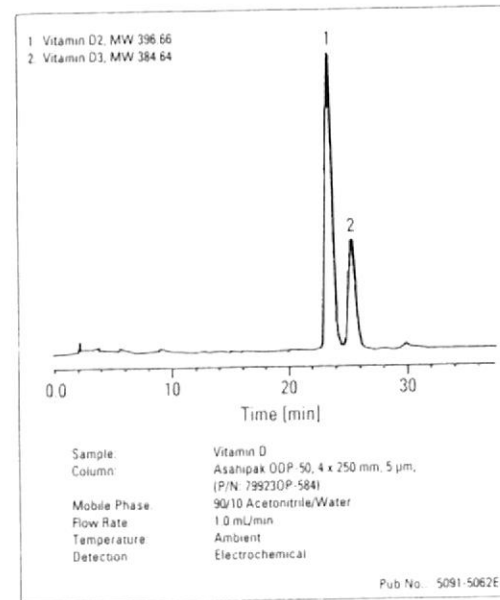


vitaminas liposolubles: Separación de Vitamina D2 de la D3

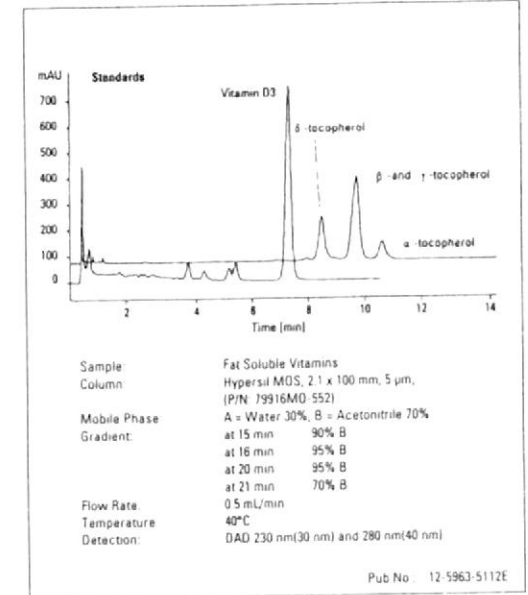


Alimentación y productos de consumo

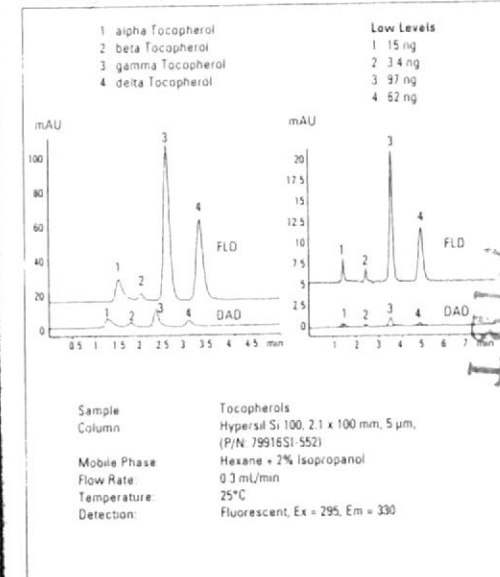
Separación de las vitaminas D2/D3



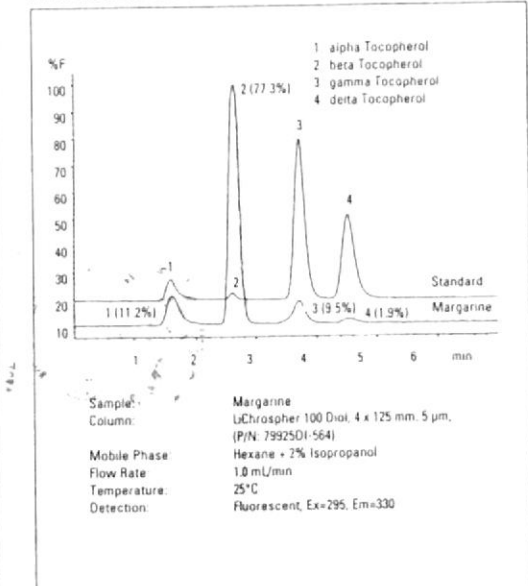
Vitaminas liposolubles: Separación en microbore HP utilizando Hypersil-MOS



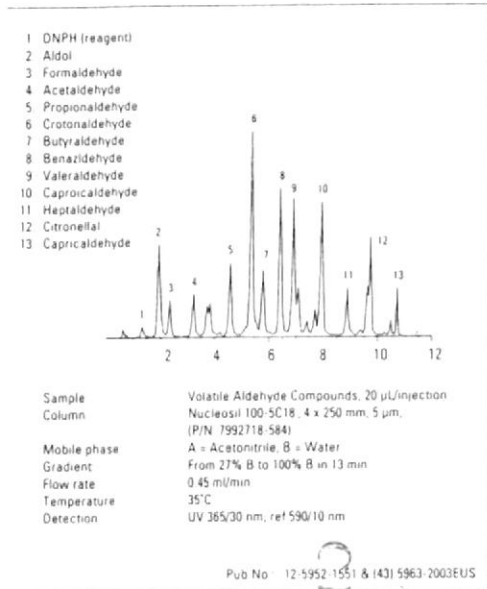
Tocoferoles: En columnas de fase normal con diodo & fluorescencia



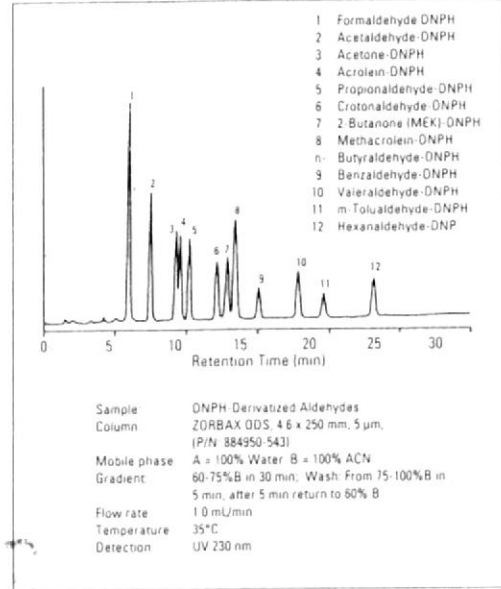
Tocoferoles: Análisis de margarina con detección de fluorescencia



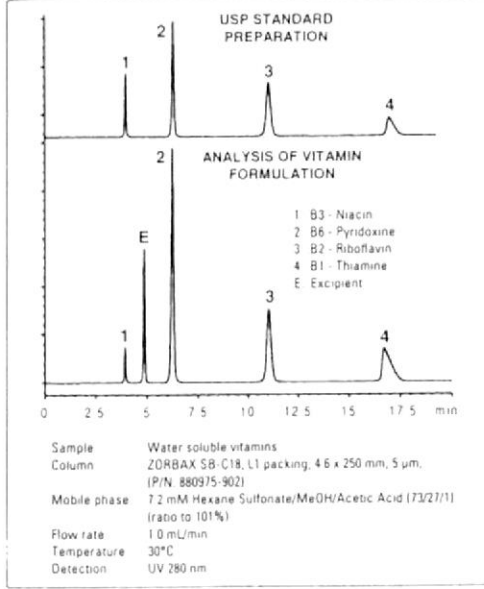
Volátiles—Análisis de aire, LC



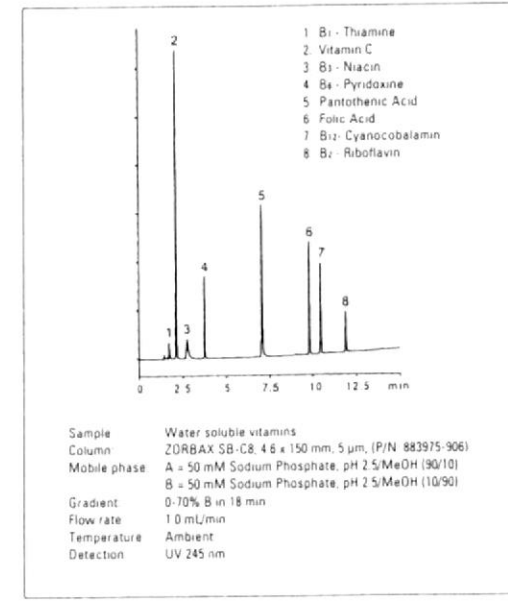
Separación de aldehídos derivatizados DNP—obtenidos del aire



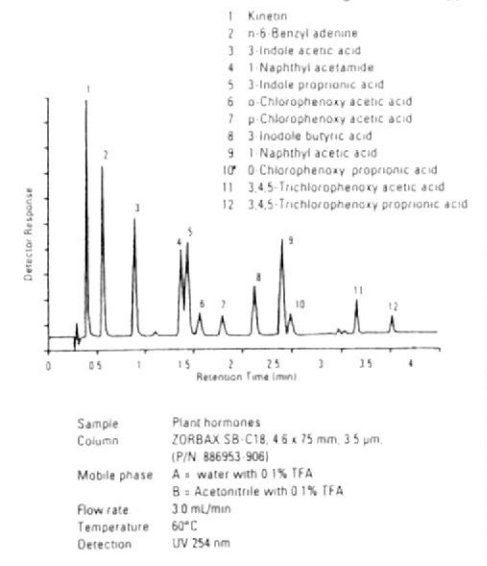
Vitaminas hidrosolubles utilizando el método USP 23



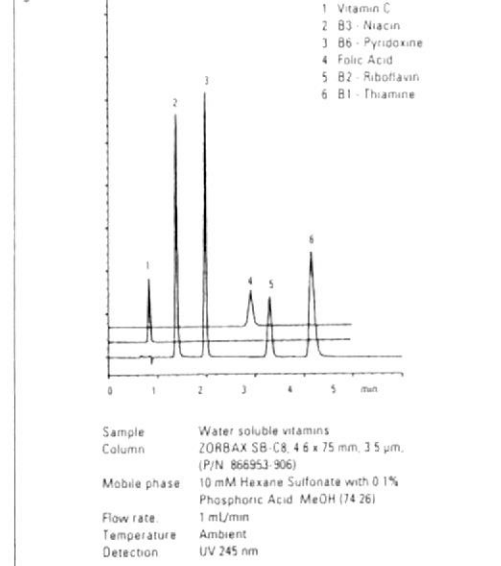
Vitaminas hidrosolubles



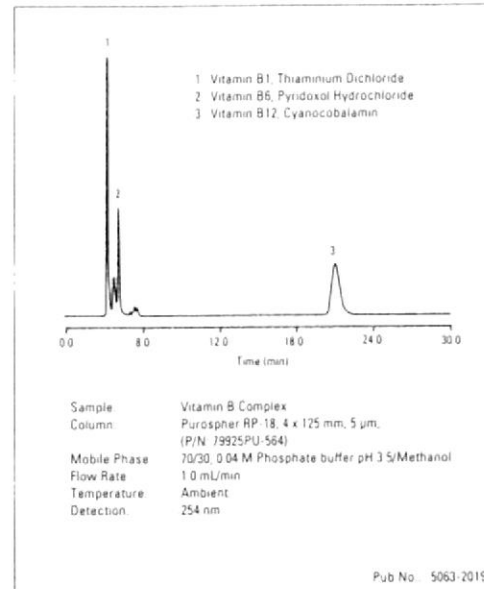
Hormonas de plantas: Separación con resolución en gradiente rápido



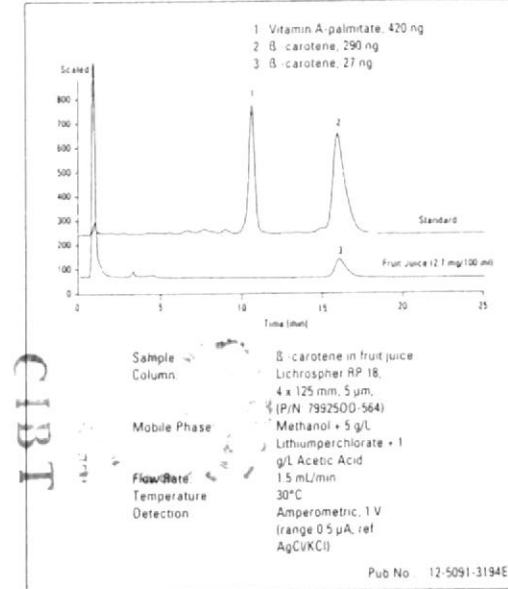
Vitaminas hidrosolubles: Separación de alta velocidad utilizando cromatografía de pares iónicos



Vitaminas B

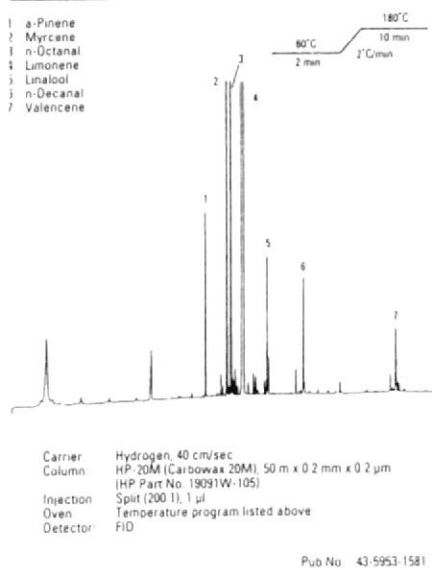


Vitamina A y beta caroteno

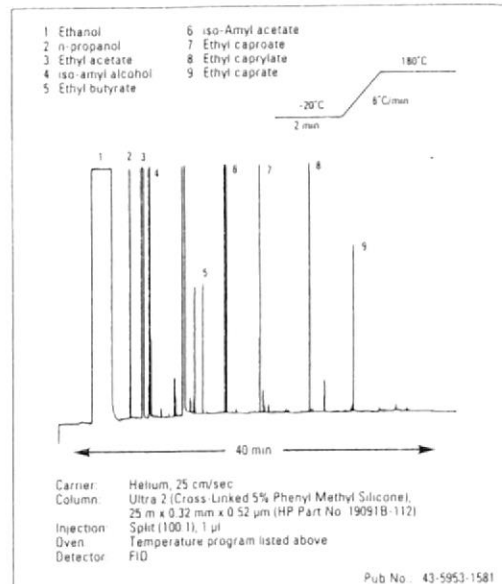


Consumo/alimentación/esencias/fragancias

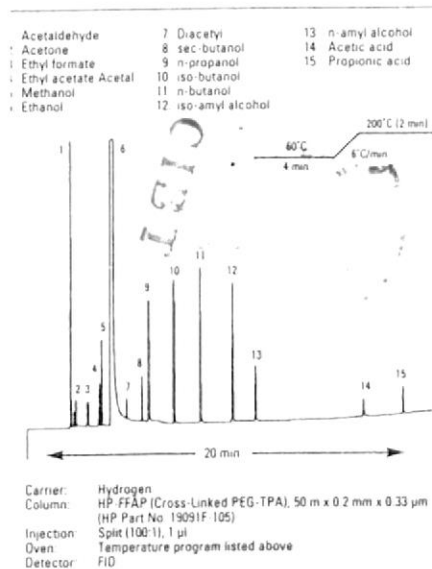
Orgánicos volátiles en zumo de naranja congelado



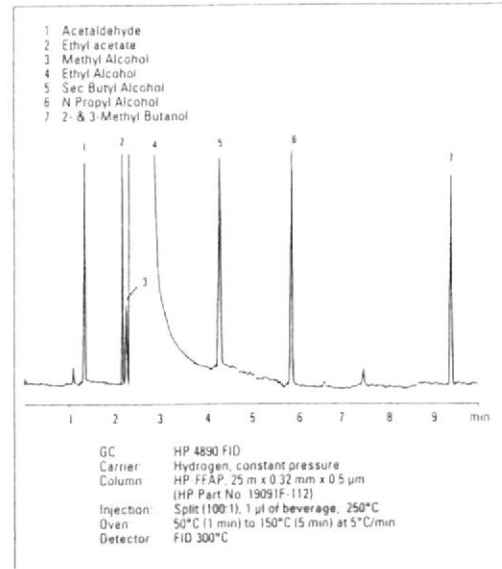
Orgánicos volátiles en cerveza



atrón bebidas alcoholicas

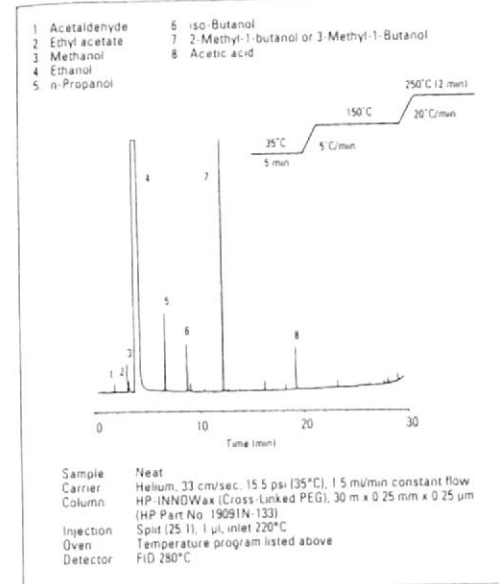


Ron Light

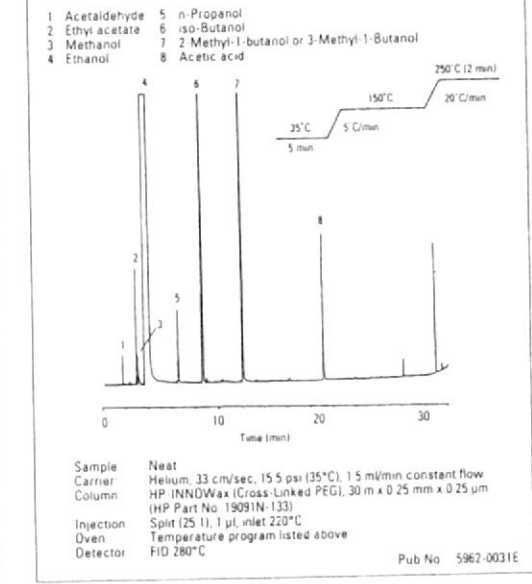


Consumo/alimentación/esencias/fragancias

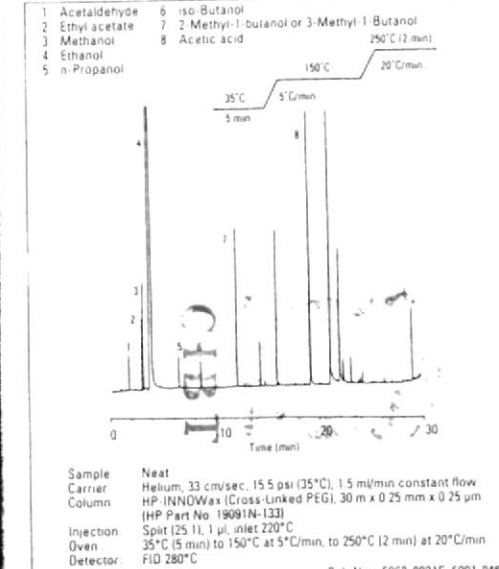
Brandy



Bourbon



Vino, Cabernet



Whisky

