

# Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en un sistema GC Agilent 8890 y su aplicación a muestras reales

## Autor

Jie Zhang  
Agilent Technologies, Inc.  
Shanghái, China

## Resumen

En esta nota de aplicación se aplicaron los métodos GB5009.168-2016<sup>1</sup> y 5009.257-2016<sup>2</sup> al análisis de FAME con una columna polar larga en un sistema GC Agilent 8890. El método de GC se optimizó para la separación de 37 FAME representativos y 21 FAME *trans* representativos en 80 minutos. Se evaluó el tiempo de retención (TR) del sistema, la reproducibilidad del área y la linealidad y se analizó una mezcla de FAME preparada a partir de muestras de aceite reales.

## Introducción

Las grasas son principalmente los triésteres de ácidos grasos y glicerol, y se denominan habitualmente triglicéridos. A efectos del etiquetado nutricional, la grasa se define como la suma de los ácidos grasos presentes en el alimento, con independencia de su procedencia, expresada en equivalentes de triglicéridos. Existen diferentes tipos de ácidos grasos, clasificados según su grado de insaturación: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos *trans* son ácidos grasos insaturados que contienen al menos un enlace doble no conjugado y *trans*.

El contenido graso de los alimentos siempre ha sido un asunto ampliamente debatido y analizado en la industria de la nutrición. Muchos compradores se interesan en la cantidad de grasa de los alimentos por motivos de salud, nutrición, pérdida de peso y otros aspectos.

Se han desarrollado varios métodos, como el GB 5009.168-2016<sup>1</sup> y el GB 5009.257-2016<sup>2</sup>, para el análisis de las grasas en los alimentos. Estos dos métodos describen los planteamientos para la extracción de grasas de diferentes matrices alimentarias, la *transesterificación* de los ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), y los métodos recomendados de CG para la separación y el análisis de datos. El método 168 se centra principalmente en el análisis de 37 ácidos grasos representativos, mientras que el método 257 se centra en el análisis de ácidos grasos *trans*.

## Materiales

### Equipo

- Un sistema GC Agilent 8890 equipado con un inyector split/splitless y un detector FID
- Un inyector automático de líquidos Agilent Serie 7693A (ALS) (ref. G4567A)

### Productos químicos

- Mezcla de FAME de 37 componentes (CDAA-252795-MIX-1 ml), adquirida a ANPEL Laboratory Technologies (Shanghái) Inc. que contiene FAME de C4-C24 en el rango de concentración de 200-400 ng/μl.

- Mezcla *trans* FAME de 13 componentes (CDAA-2527, 15-100 mg) y ésteres metílicos del ácido octadecatrienoico *cis/trans* de ocho componentes (CDAB-CRM47792), adquiridos a ANPEL Laboratory Technologies (Shanghái) Inc. El porcentaje en peso de cada componente de las dos mezclas se situó en el rango del 3-30 %.

### Muestras

El Instituto de Inspección de Calidad e Investigación Técnica de Shanghái proporcionó y preparó muestras de aceite de soja, aceite de cacahuate y aceite de sésamo de acuerdo con el método GB 5009.168-2016.

## Instrumento

Tabla 1. Condiciones del instrumento.

Sistema GC	GC 8890A
Inyector S/SL	250 °C, relación de split de 100:1
Liner	Split, ultrainerte, lana de vidrio, baja caída de presión (ref. 5190-2295)
Programa de rampa de horno	100 °C (13 minutos), 10 °C/min a 180 °C (6 minutos), 1 °C/min a 200 °C (20 minutos), 4 °C/min a 230 °C (7 minutos)
Gas portador	Nitrógeno, 40 psi, modo de presión constante
Columna	HP-88, 100 m× 0,25 mm, 0,20 μm (ref. 112-88A7)
Detector	280 °C, H <sub>2</sub> : 40 ml/min Aire: 400 ml/min Gas auxiliar: 25 ml/min

## Resultados y comentarios

Se utilizó el programa de temperatura de horno recomendado en el GB 5009.168-2016. Se utilizó el modo de presión constante y se optimizó la presión de la cabeza de la columna a 40 psi para dar una separación satisfactoria con una resolución mínima de 1,3 para pares críticos, es decir, C20:0/C20:3n6, con lo que se superó el requisito de resolución de 1,25 especificado por el método.

Se diluyó una mezcla estándar de 37 FAME a 50-100 ng/μl para cada componente y se utilizó para probar la reproducibilidad del sistema. Se eligió este patrón de acuerdo con el método GB, y porque fue diseñado para imitar la composición de ácidos grasos de muchas muestras de alimentos. El programa de la rampa del horno fue bastante largo; como se muestra, los 37 FAME se separaron en 81 minutos (Figura 1). Todos los componentes se resolvieron bien. Los cromatogramas superpuestos de seis inyecciones mostraron una excelente reproducibilidad de área y TR (Figura 1). La Tabla 2 muestra el TR, el área y la precisión de cada pico. La reproducibilidad del área

está en el rango de 1,1-3,4 % (Figura 2), y la DER% del área de un componente alcanza el 4,0 %. Como el disolvente de la muestra era hexano y el tiempo de análisis era superior a 80 minutos por inyección, la evaporación de la muestra (especialmente del disolvente) durante la separación dio lugar a una ligera variación en la concentración de la muestra.

La cantidad de muestra cargada en la columna para cada componente estuvo en el rango de 0,5-1 ng. Esta baja cantidad de muestra, junto con la evaporación del disolvente, dio como resultado una DER% de área ligeramente superior al 2 %, pero de acuerdo con los requisitos de cuantificación.

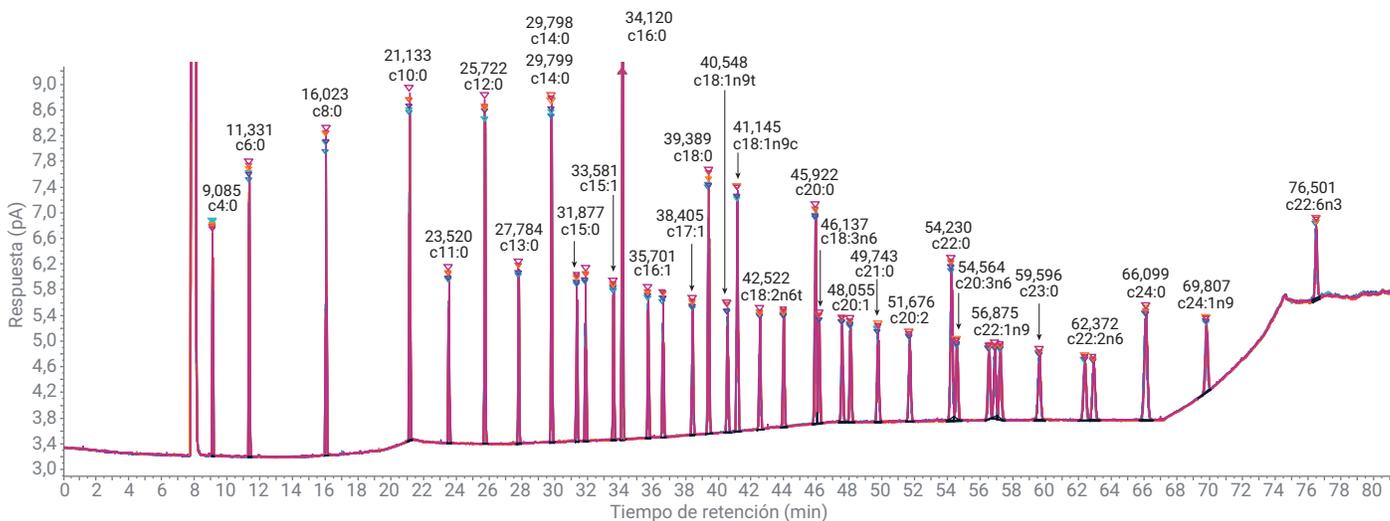


Figura 1. Cromatogramas superpuestos de seis inyecciones de 37 FAME en un GC 8890.

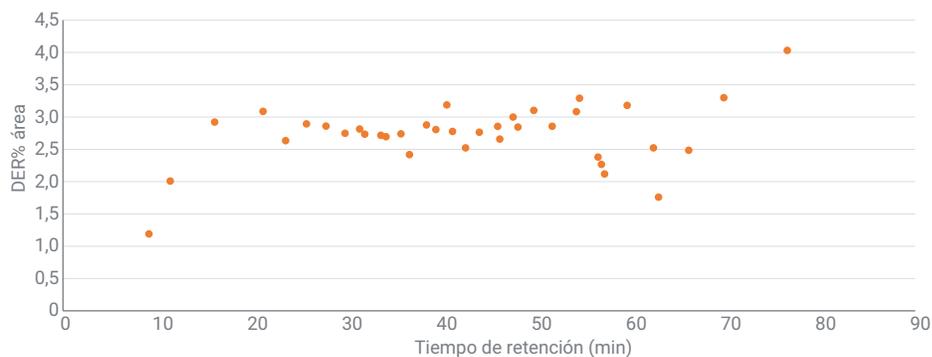


Figura 2. Precisión del área de 37 FAME en seis inyecciones.

La reproducibilidad del tiempo de retención estuvo en el rango de 0,01-0,03 % (Figura 3). Aunque el largo tiempo de análisis dificultó la reproducibilidad del sistema, el sistema GC 8890A proporcionó un control preciso y estable de la temperatura del horno, la presión de entrada y los flujos de los detectores, lo que ayudó a generar cromatogramas altamente reproducibles y a garantizar resultados de identificación fiables.

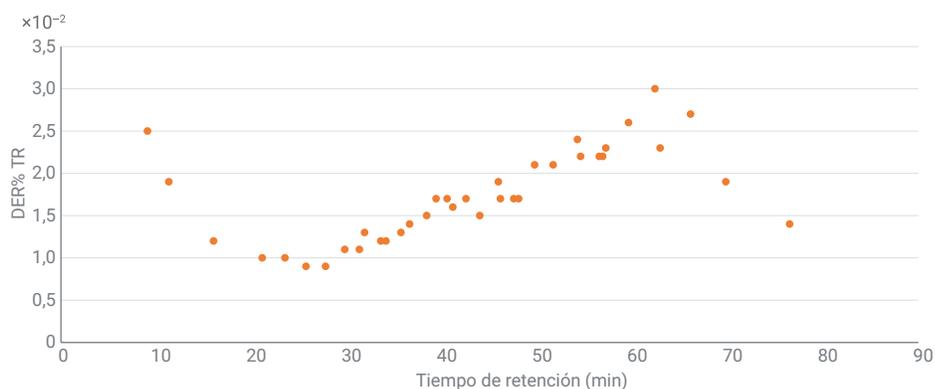


Figura 3. Precisión del TR de 37 FAME en seis inyecciones.

Tabla 2. TR, área y su precisión para 37 compuestos en seis inyecciones.

Compuesto	TR medio (min)	DER TR (%)	Área promedio	DER área (%)
C4:0	9,086	0,025	6,903	1,189
C6:0	11,331	0,019	12,795	2,008
C8:0	16,022	0,012	16,599	2,921
C10:0	21,131	0,01	17,995	3,086
C11:0	23,518	0,01	9,365	2,633
C12:0	25,721	0,009	18,702	2,893
C13:0	27,783	0,009	9,655	2,859
C14:0	29,796	0,011	19,362	2,747
C14:1	31,333	0,011	9,57	2,813
C15:0	31,874	0,013	9,9	2,733
C15:1	33,58	0,012	9,818	2,716
C16:0	34,119	0,012	29,97	2,694
C16:1	35,699	0,013	9,999	2,739
C17:0	36,602	0,014	10,125	2,417
C17:1	38,4	0,015	10,053	2,876
C18:0	39,385	0,017	20,432	2,805
C18:1n9t	40,544	0,017	10,294	3,186
C18:1n9c	41,142	0,016	20,389	2,776
C18:2n6t	42,519	0,017	10,188	2,522
C18:2n6c	43,972	0,015	10,363	2,763
C20:0	45,919	0,019	20,719	2,854
C18:3n6	46,135	0,017	10,003	2,657
C18:3n3	47,54	0,017	10,167	2,998

Compuesto	TR medio (min)	DER TR (%)	Área promedio	DER área (%)
C20:1	48,052	0,017	10,354	2,843
C21:0	49,731	0,021	10,554	3,102
C20:2	51,671	0,021	10,302	2,855
C22:0	54,225	0,024	21,046	3,082
C20:3n6	54,554	0,022	10,28	3,29
C20:3n3	56,514	0,022	10,244	2,379
C22:1n9	56,871	0,022	10,273	2,266
C20:4n6	57,204	0,023	10,633	2,117
C23:0	59,588	0,026	10,693	3,179
C22:2n6	62,36	0,03	10,415	2,521
C20:5n3	62,903	0,023	10,177	1,758
C24:0	66,093	0,027	21,326	2,484
C24:1n9	69,797	0,019	10,863	3,298
C22:6n3	76,499	0,014	9,456	4,03

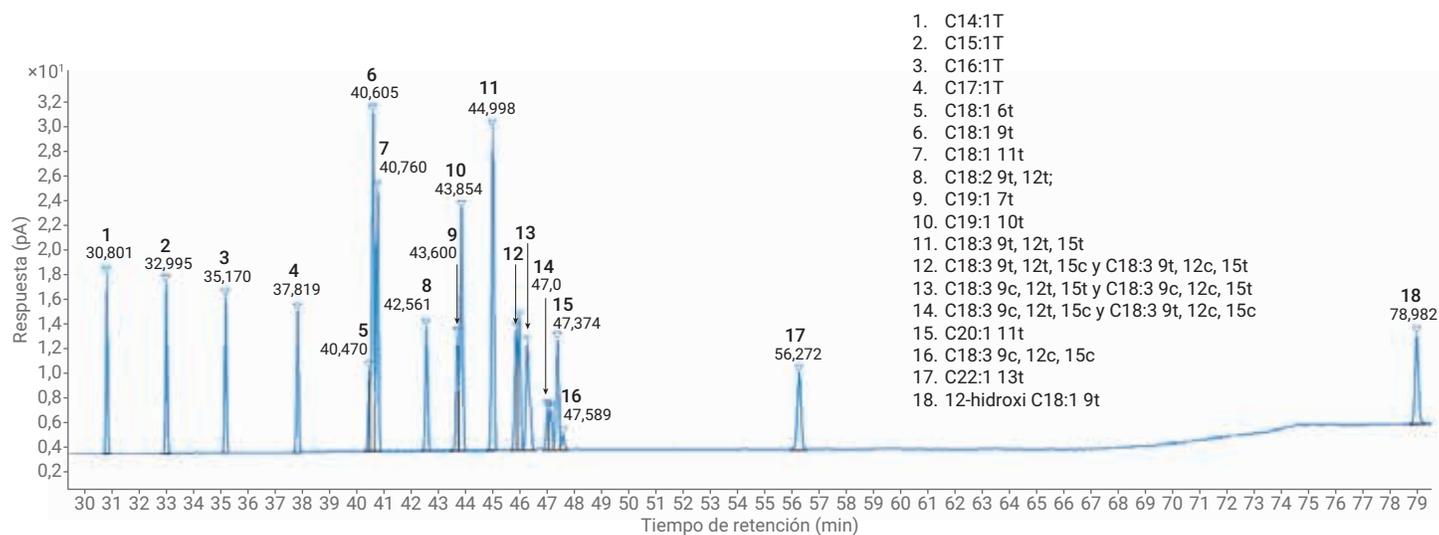
La linealidad del sistema se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (DER%) del factor de respuesta (FR) del FAME C18:1c y FAME C18:2c en cinco niveles de concentración. La Tabla 3 muestra que la DER% del FR fue de tan solo el 4 % para los dos compuestos de comprobación, lo que demuestra una excelente linealidad en términos de respuesta de pico. Algunos laboratorios utilizan el método de patrón externo (ESTD) para la cuantificación; una buena linealidad del detector en un amplio rango de concentración puede asegurar una cuantificación precisa incluso cuando se utiliza un método ESTD de punto único.

La Figura 4 muestra la separación de una mezcla de FAME *trans* de 13 componentes y de isómeros de ésteres metílicos de ácido octadecatrienoico de 8 componentes. Los resultados se obtuvieron de conformidad con el GB 5009.257-2016. El programa de temperatura del horno utilizado fue el mismo que para el análisis de la mezcla de 37 FAME. Los ocho isómeros de los isómeros de los FAME *trans* C18:3 son particularmente difíciles de resolver, especialmente si se tiene en cuenta que es necesario resolver otros FAME que coexistieron con los de los FAME C18:3 en el mismo análisis. Sin embargo, la columna HP-88 de

100 m dio como resultado ocho picos para los ocho isómeros en la sección de elución ampliada para los ésteres metílicos del ácido octadecatrienoico (Figura 5). Aunque la resolución estaba lejos de la separación en línea de base, la comparación con el cromatograma de referencia en el GB 5009.257-2016 muestra que la separación lograda estaba dentro de límites aceptables. Además, el éster metílico del ácido *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadecatrienoico se separó correctamente de otros siete isómeros *trans*. Esta es una consideración práctica importante a la luz de la naturaleza del etiquetado de ácidos grasos *trans* en la industria del etiquetado nutricional.

**Tabla 3.** Linealidad de la respuesta de área para C18:1-*cis* y C18:2-*cis*.

Componente	Concentración	Área (PA*S)	FR (Respuesta por cantidad)	DER% del FR
C18:1- <i>cis</i>	1,7 ppm	0,330	0,194	4,7 %
	17 ppm	3,002	0,177	
	170 ppm	29,152	0,171	
	1.700 ppm	301,107	0,177	
	17.000 ppm	3.065,390	0,180	
C18:2- <i>cis</i>	0.86 ppm	0,155	0,180	3,0 %
	8.6 ppm	1,628	0,189	
	86 ppm	14,833	0,172	
	860 ppm	152,562	0,177	
	8.600 ppm	1.550,921	0,180	



**Figura 4.** Cromatograma de 21 FAME *trans* en una columna HP-88.

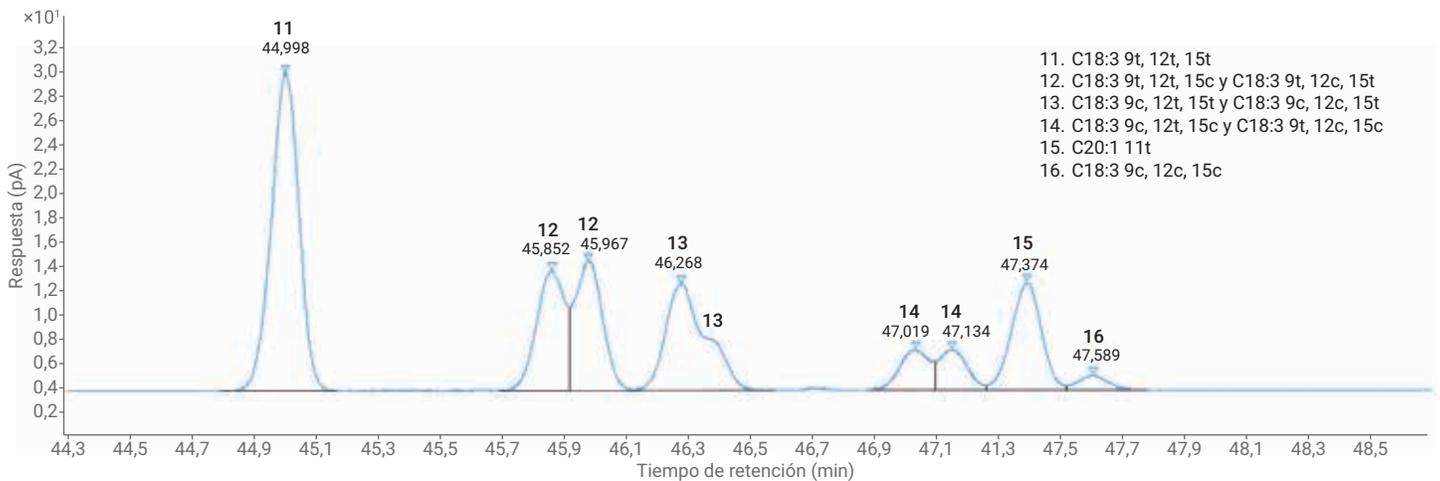


Figura 5. Cromatograma ampliado para isómeros de ésteres metílicos del ácido octadecatrienoico.

Se extrajeron, derivatizaron y analizaron muestras reales de aceite, como aceite de soja, aceite de cacahuete y aceite de sésamo, en una plataforma de GC 8890 de acuerdo con el GB 5009.168-2016. Las figuras 6A, 6B y 6C muestran los cromatogramas resultantes. C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n3 y C20:1 fueron los principales ácidos grasos identificados en los tres tipos de muestras de aceite (la etiqueta roja frontal en las Figuras 6A, 6B y 6C son

compuestos que se enumeran en la tabla de calibrado del método pero que no se identifican en la muestra real).

Existe una solución para el análisis de FAME que proporciona un análisis rápido para resolver los 37 FAME representativos en una columna corta de siloxano policianopropílico en un menos de 10 minutos<sup>3</sup>. Sin embargo, el análisis rápido tiene ciertas limitaciones para la separación de los FAME *cis* y

*trans*. El análisis de FAME de 60-80 minutos con una columna polar larga se desarrolló para tratar muestras que requieren la separación de ácidos grasos *cis/trans* complejos u otros isómeros difíciles. En determinadas aplicaciones, como las pruebas de calidad del aceite de oliva virgen extra, la separación efectiva de los FAME *cis/trans* es más importante que el tiempo de análisis.

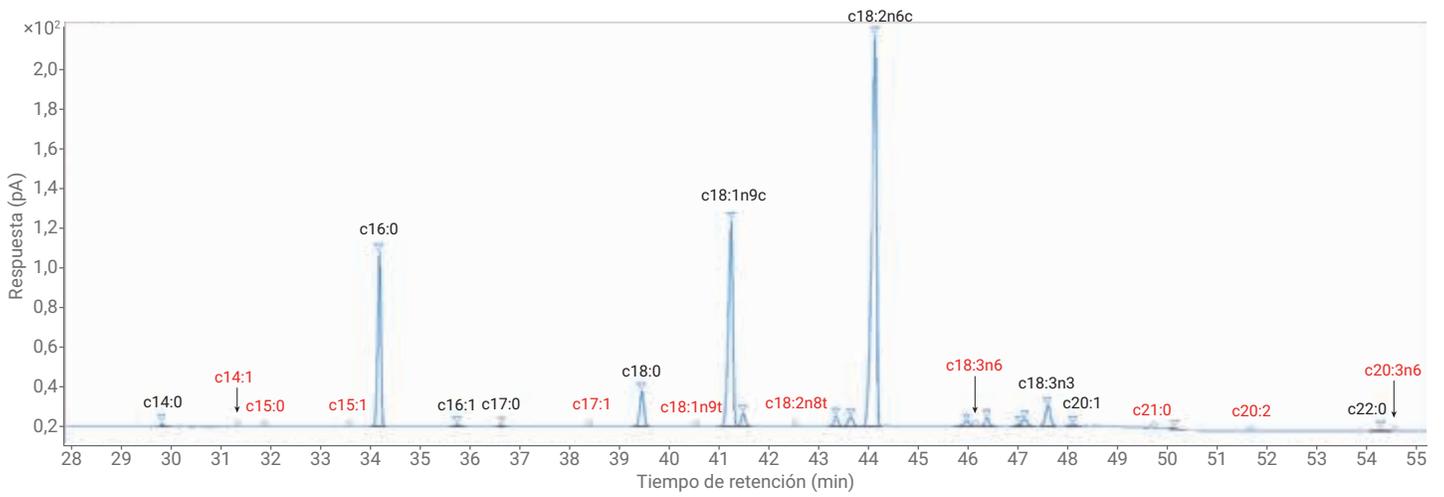


Figura 6A. Cromatograma para el análisis del aceite de sésamo.

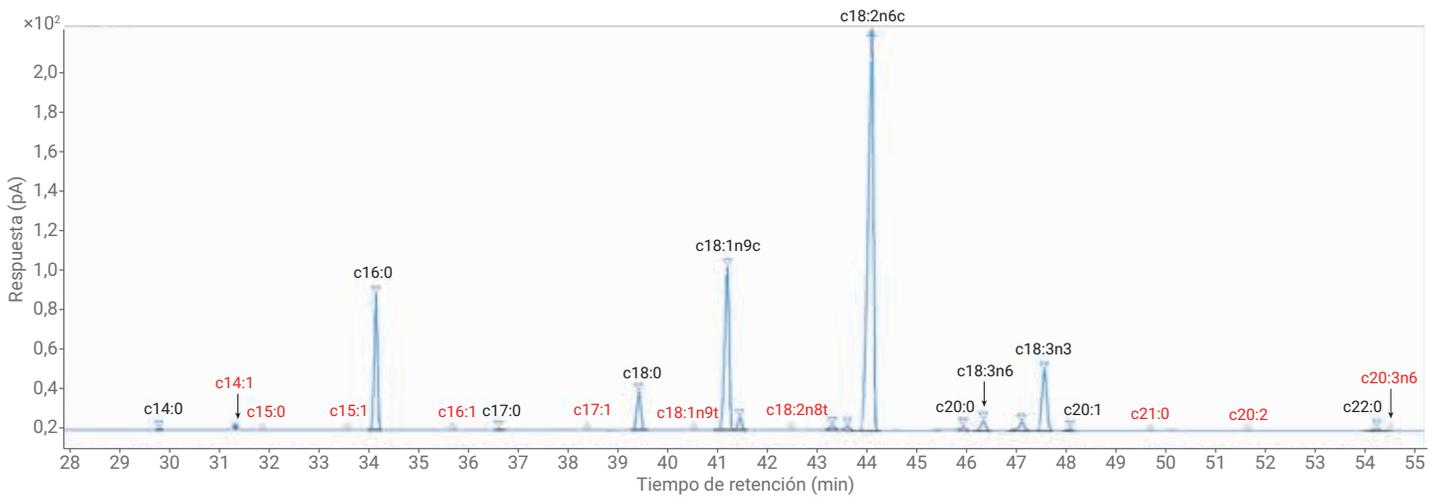


Figura 6B. Cromatograma para el análisis del aceite de soja.

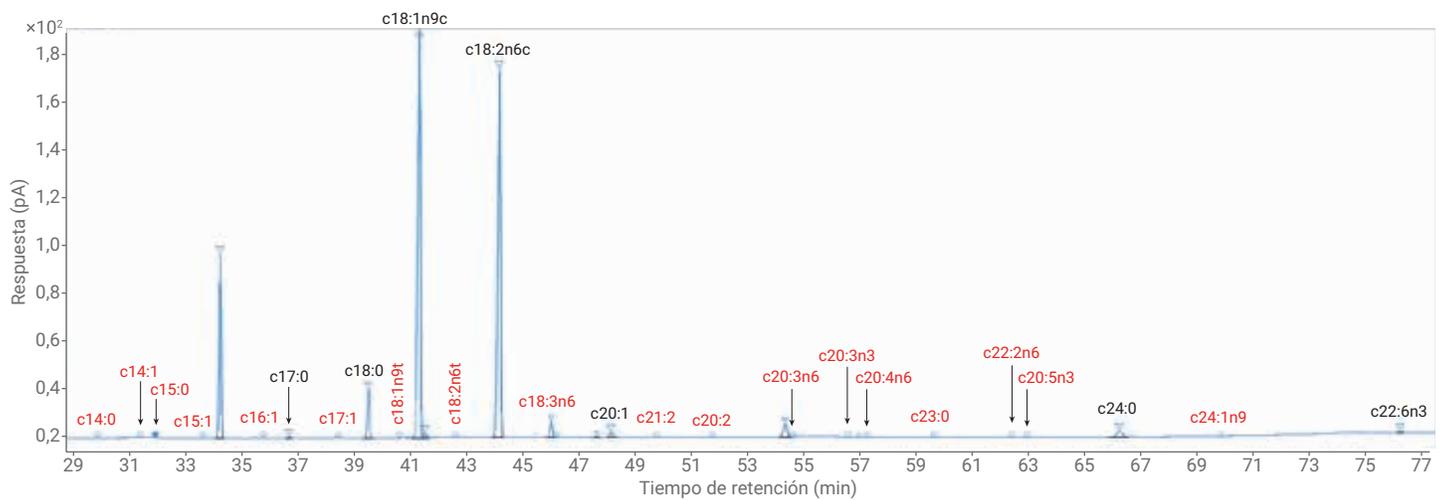


Figura 6C. Cromatograma para el análisis del aceite de cacahuete.

## Conclusiones

El uso de un GC 8890A junto con una columna HP-88 para el análisis de 37 FAME representativos y 21 FAME *trans* dio como resultado una buena resolución en ambos tipos de muestras. La resolución del par de compuestos críticos cumplió y excedió los requisitos de los métodos GB 5009.168-2016 y GB 5009.257-2016. El excelente tiempo de retención, la reproducibilidad del área y el amplio rango de detección lineal del FID demostraron que el GC 8890A es una plataforma ideal para el análisis fiable de los FAME.

## Referencias

1. Determinación de ácidos grasos en alimentos, método GB5009.168-2016.
2. Determinación de ácidos grasos *trans* en alimentos, método GB5009.257-2016.
3. Análisis rápido de FAME por Intuvo GC 9000, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-9482EN.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Impreso en EE. UU., 2 de enero de 2019  
5994-0549ES