



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

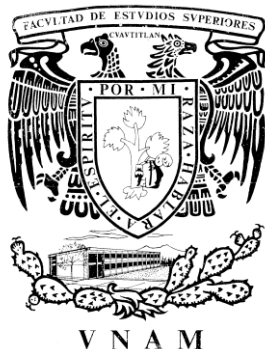
**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
DIFERENTES AMINOACIDOS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES
CAPILAR”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

P R E S E N T A:

CLAUDIA VERÓNICA TINOCO MUÑOZ



**Asesores: M en .C. PABLO HERNÁNDEZ MATAMOROS
DRA. GUADALUPE PÉREZ CABALLERO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Con base en el Art. 19 del Reglamento General de Exámenes, la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno:

Claudia Verónica Tinoco Muñoz

con número de cuenta: 40409388-2 a presentar

La tesis: "Identificación y Cuantificación de diferentes aminoácidos por Cromatografía de Gases Capilar".

Bajo la Asesoría del: MC. Pablo Hernández Matamoros

para obtener el TÍTULO de: Ingeniera Química

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA Y FECHA DE RECIBIDO
PRESIDENTE	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	<u>[Firma]</u> 23/02/09
VOCAL	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	<u>[Firma]</u> 20/02/09
SECRETARIO	<u>MC. Pablo Hernández Matamoros</u>	<u>[Firma]</u> 20/02/09
1er. SUPLENTE	<u>QFB. Dalia Bonilla Martínez</u>	<u>[Firma]</u> 23/02/09
2° SUPLENTE	<u>MC. Enrique Ramos López</u>	<u>[Firma]</u> 20/02/09
* Lo Sustituye	_____	_____
** Lo Sustituye	_____	_____

Atentamente notificamos su participación para la revisión y evaluación, solicitando firme la presente al recibir copia del trabajo y en un plazo no mayor de 20 días hábiles, emita sus observaciones y/o su VOTO APROBATORIO.

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de febrero del 2009

LA. Araceli Herrera Hernández
JEFE DEL DEPARTAMENTO

NOTA: Los Sinodales Suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen

AHH/rhr Profesional (Art. 120)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por la salud que me brindo para realizarme como persona.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo, por su cariño y confianza.

A la FES Cuautitlan por mi formación profesional y su disponibilidad. Gracias a cada uno de los docentes y personal de la sección de analítica; por su confianza y el apoyo que recibí durante mi estancia en el laboratorio. Así como su colaboración para que se llevara a cabo esta tesis.

Gracias a la DGAPA-UNAM por el proyecto PAPIME PE203405.

Gracias a la DGAPA-UNAM por el proyecto PAPIME PE207606.

De manera muy especial a mis asesores de tesis. Gracias Dra. Lupita por todo el apoyo, confianza, esfuerzo al revisar este trabajo, paciencia, amistad, por sus consejos y por confiar en mí.

Gracias MC. Pablo Hernández Matamoros, por compartir sus conocimientos, por su confianza, su tiempo, su amistad, y sus consejos.

Dra. Alma gracias por su apoyo y disponibilidad en todo momento.

A mis compañeros y amigos: Elsa, Lucy, Ivonne, Manuel, Ubaldo, Paty, Diego, Irma, Hilda, Juan Alberto, Alan, Bernardo; por sus diversas formas de apoyo y su sincera amistad.

A ti Ismael por darme el tiempo y espacio necesario para alcanzar mis metas y por creer en mí.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción.	1
2. Objetivos.	3
Objetivo Generale	3
Objetivos Particulares	3
3. Marco teórico	4
3.1 Generalidades	4
3.1.1 Aspectos generales de los aminoácidos	5
3.1.2 Clasificación de los aminoácidos.	5
3.1.3 Propiedades ácido-base de los aminoácidos	6
3.1.4 Reactividad química de los aminoácidos	9
3.1.5 Métodos de cuantificación	11
3.1.6 Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos en estudio	12
3.2 Cromatografía	15
3.2.1 Cromatografía de Gases Capilar	15
3.2.2 Instrumentación	17
3.2.3 Tipos de Columnas	21
3.2.4 Detectores	23
3.3 Derivatización	24
3.3.1 Reacciones de derivatización	25
3.4 Técnicas de derivatización	29
3.5 Método de estándar interno para la cuantificación en cromatografía de gases capilar	30
3.6 Método de calibración absoluta	32
4. Metodología	33
5. Parte Experimental	34
5.1 Material y Equipo	34
5.2 Reactivos	36
6. Preparación de soluciones	37
6.1 Preparación de estándares de aminoácidos	37
6.2 Preparación del estándar interno	37

6.3	Procedimiento para la curva de calibración	38
6.4	Preparación de las muestras comerciales	39
7.	Resultados y Análisis de Resultados	40
7.1	Condiciones Cromatográficas	40
7.2	Selección del Estándar Interno	45
7.3	Obtención de la curva de Calibración	45
7.4	Cuantificación de muestras	49
8.	Conclusiones	53
9.	Bibliografía	54
	Anexo A	56
	Anexo B	68

ÍNDICE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura general de un aminoácido	5
Figura 2.	Estructura del ácido glutámico	12
Figura 3.	Estructura ácido aspártico	13
Figura 4.	Estructura de leucina	13
Figura 5	Estructura treonina	14
Figura 6	Estructura valina	14
Figura 7	Esquema de un cromatógrafo de gases	17
Figura 8	Introducción de la muestra en el puesto de inyección	19
Figura 9	Curva de calibración con estándar interno	31
Figura 10	Diagrama de flujo de la metodología experimental	33
Figura 11	Cromatógrafo de Gases Buck Scientific 910, ubicado en la sección de química analítica L-113	35
Figura 12	Procedimiento previo a la derivatización de los aminoácidos	38
Figura 13	Reacción general de derivatización	41
Figura 14	Cromatograma de treonina en su forma trimetilsilil	42
Figura 15	Reacción de derivatización para la treonina	42
Figura 16	Cromatograma de estándares de aminoácido en forma de su derivado trimetilsilil	43
Figura 17	Estructura del Antraceno, estándar interno	45
Figura 18	Curva de calibración leucina	47
Figura 19	Cromatograma una muestra comercial AMINO 2000	49
Figura 20	Cromatograma una muestra comercial AMINO 1800	50
Figura A-1	Cromatograma, prueba 1 para definir condiciones cromatográficas.	56
Figura A-2	Cromatograma, prueba 2 para definir condiciones cromatográficas.	57
Figura A-3	Cromatograma del blanco (derivatizante + acetonitrilo)	58
Figura A-4	Cromatograma del blanco; correspondiente al antraceno (estándar interno) con acetonitrilo, sin derivatización	58
Figura A-5	Cromatograma acido glutámico en su forma derivatizada trimetilsilil	59
Figura A-6	Cromatograma acido aspártico en su forma derivada trimetilsilil	59
Figura A-7	Cromatograma leucina en su forma derivatizada trimetilsilil	60
Figura A-8	Cromatograma treonina en su forma derivatizada trimetilsilil	60

Figura A-9	Cromatograma valina en su forma derivatizada trimetilsilil	61
Figura A-10	Cromatograma de la separación de los derivados trimetilsilil con respecto al estándar interno	61
Figura A-11	Curva de calibración de leucina	62
Figura A-12	Curva de calibración de valina	64
Figura A-13	Curva de calibración treonina	66

ÍNDICE TABLAS

		Página
Tabla 1	Propiedades y características de las columnas para cromatografía de gases	22
Tabla 2	Grupos funcionales que forman derivados trimetilsililo	27
Tabla 3	Separación de aminoácidos mediante formación de derivados trimetilsililo	28
Tabla 4	Grupos funcionales que originan derivados alquilo	29
Tabla 5	Preparación de los sistemas para la curva de calibración	37
Tabla 6	Pruebas de diferentes programas de temperatura para definir las condiciones cromatográficas, par el desarrollo del proyecto	40
Tabla 7	Información general de las condiciones cromatográficas utilizadas en la separación de los derivados de aminoácidos	40
Tabla 8	Tiempos de retención promedio de los aminoácidos en estudio bajo las condiciones cromatográficas establecidas	44
Tabla 9	R _s de los aminoácidos correspondientes	44
Tabla 10	Concentración de los aminoácidos para la curva de calibración	46
Tabla 11	Recopilación de datos correspondientes a las curvas de calibración de cada aminoácido	48
Tabla 12	Valores del factor respuesta de los aminoácidos con respecto al antraceno	48
Tabla 13	Tiempos de retención y parámetros estadísticos para la muestra comercial AMINO 2000	51
Tabla 14	Tiempos de retención de la muestra comercial AMINO 1800	51
Tabla 15	Resultados comparativos a la muestra comercial amino 2000	52
Tabla 16	Resultados comparativos muestra comercial AMINO 1800	52
Tabla A-1	Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de Leucina	61
Tabla A-2	Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-1	61
Tabla A-3	Datos para trazar la curva de calibración de valina; relación de áreas y concentración de leucina	61
Tabla A-4	Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de valina	63
Tabla A-5	Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-4	63
Tabla A-6	Datos para trazar la curva de calibración de valina; relación de áreas y	63

	concentración de valina	
Tabla A-7	Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de Treonina.	65
Tabla A-8	Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-7	65
Tabla A-9	Datos para trazar la curva de calibración de valina; relación de áreas y concentración de treonina.	65
Tabla A-10	Resultados Muestra A, AMINO 2000	66
Tabla A-11	Resultados Muestra B, AMINO 2000	66
Tabla A-12	Resultados Muestra C, AMINO 2000	66
Tabla A-13	Resultados de la muestra comercial AMINO 1800	67

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad y cada vez más, un alto porcentaje de la población se interesa en formar un cuerpo atlético, que le permita tener una mejor imagen o un mejor desarrollo a nivel profesional en alguna disciplina deportiva. En este sentido, la ingestión de aminoácidos se ha tenido un incremento muy importante. Los aminoácidos, péptidos y proteínas son componentes esenciales de los alimentos ya que proporcionan los elementos necesarios para la síntesis proteica. Los aminoácidos son los elementos constitutivos de las proteínas y contienen aproximadamente el 16% de nitrógeno, que es lo que los distingue de otros nutrientes básicos.

En el mercado existen de suplementos proteicos en una amplia variedad de presentaciones como polvo, pastillas, bebidas, alimentos, etc. [1,2] que requieren un control adecuado tanto en la calidad como en el contenido, para lo cual se usan diferentes técnicas analíticas

Las técnicas analíticas usadas para la identificación y cuantificación de aminoácidos son la cromatografía de gases [1,3], la cromatografía líquida [4–5] y la electroforesis capilar [6–7]. En particular, la cromatografía en fase gaseosa se aplica al análisis y control de los productos de su metabolismo en el organismo en numerosos líquidos biológicos así como del componente activo en productos farmacéuticos [8].

La potenciometría es una técnica considerada exacta para establecer las constantes de disociación de diversos compuestos orgánicos incluyendo los aminoácidos [19]. Esta técnica es confiable ya que no es afectada por interferencias provocadas por otras sustancias presentes en el hidrolizado [20].

La espectrofotometría Ultravioleta, la fluorescencia o detectores electroquímicos son usados dependiendo de la naturaleza de los derivados del aminoácido. No obstante, en este método, el procedimiento de derivatización es muy complejo y la sensibilidad es más pobre que las alternativas disponibles para análisis de amino ácidos individuales. Sin embargo, es útil en el análisis automatizado de péptidos.

Una de las técnicas comúnmente utilizada para el análisis de los aminoácidos es la cromatografía líquida (HPLC) en fase reversa; sin embargo, debido a que la mayoría de los aminoácidos no tienen un grupo cromóforo, no son candidatos viables a dar respuesta en un detector UV-VIS, por esta razón es necesario la derivatización de aminoácido, comúnmente con o-ftaldialdehído (OPA) [18]. El derivado formado tiene la capacidad de fluorecer lo que permite determinarlo en concentraciones muy pequeñas en un detector de fluorescencia, incrementándose de esta manera la sensibilidad del método. Sin embargo, los inconvenientes al utilizar este derivatizante son:

- contar en el laboratorio con un detector selectivo lo que incrementa el costo de equipo

- baja estabilidad de los derivados formados
- no reacciona con aminoácidos secundarios por ejemplo: la prolina, e hidroxoprolina.

Los métodos por cromatografía de gases poseen algunas ventajas sobre HPLC, como es el uso de un detector más universal y económico. Sin embargo, esta cromatografía requiere una derivatización previa de los aminoácidos para producir compuestos suficientemente volátiles y por lo tanto un método de derivatización que les confiera dicha volatilidad. En cromatografía de gases se utiliza generalmente la silinización previa para el análisis de los aminoácidos la cual se lleva a cabo con BSTFA [9–10] y MTBSTFA [11–12] bajo condiciones analíticas previamente establecidas y calentamiento [13,14].

Existen aproximadamente una docena de métodos propuestos para derivatizar aminoácidos para su posterior análisis cromatográfico. Las reacciones de derivatización más utilizadas suelen ser de dos etapas:

1. Derivatización de los dos grupos funcionales ($-\text{CO}_2\text{H}$ y $-\text{NH}_2$) utilizando diferentes reactivos.
2. Protección de los dos grupos utilizando un sólo reactivo.

El proceso de dos etapas incluye la esterificación de aminoácidos por un exceso del correspondiente alcohol en presencia de HCl y, después de la evaporación de compuestos volátiles, el tratamiento de la hidroclicación no volátil de alquil ésteres por acilación de reactivos [8].

Una dificultad en la separación por cromatográfica de gases de los aminoácidos es el detector, ya que puede ser necesario dividir la corriente del gas y usar dos detectores diferentes [15]. El detector de ionización de flama, que comúnmente es usado, no es específico para aminoácidos. Además la respuesta molar relativa del detector de ionización de flama varía para cada aminoácido, haciendo necesario la producción de curvas individuales [16]. En casos especiales, es posible emplear un detector de nitrógeno para aumentar la especificidad de la detección.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar un método analítico para realizar la identificación y cuantificación de aminoácidos en diferentes suplementos alimenticios por cromatografía de gases capilar, mediante la silinización previa de los aminoácidos usando BSTFA. Este método pretende ser una opción analítica en relación a los métodos establecidos por HPLC. La presente investigación pretende ser una contribución para establecer una metodología para el control del contenido de aminoácidos en suplementos alimenticios, ya que al no ser medicamentos, no están regulados por la Secretaria de Salud y pueden presentar contenidos muy diversos a los reportados en el marbete.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Desarrollar un método analítico para la separación, identificación y cuantificación de los aminoácidos (valina, leucina, treonina) presentes en diferentes suplementos alimenticios por cromatografía de gases capilar (CGC – FID).

Objetivos particulares.

- Establecer las condiciones cromatográficas adecuadas que permitan la separación de los aminoácidos presentes en suplementos alimenticios.
- Optimizar las condiciones de reacción para llevar a cabo la silinización de los aminoácidos usando BSTFA como agente derivatizante.
- Elaborar las curvas de calibración correspondientes, para la cuantificación de los aminoácidos mediante el empleo de un estándar interno.
- Identificar los aminoácidos presentes en uno o varios suplementos alimenticios mediante el uso estándares.
- Desarrollar un procedimiento para el tratamiento de suplementos alimenticios que contienen aminoácidos que permita determinar los aminoácidos presentes a partir de las curvas de calibración y a través del empleo de un estándar interno.
- Comparar los contenidos de aminoácidos obtenidos con los reportados en el marbete a fin de evaluar la calidad de los productos analizados.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Generalidades.

Los aminoácidos son moléculas orgánicas con un peso molecular relativamente pequeño (100 – 200) que poseen un grupo carboxilo (COOH) y uno amino (NH₂). Son los componentes esenciales de las proteínas, los cuales los cuales constituyen a las plantas y animales.

Los aminoácidos se dividen en dos grupos; en función de la capacidad que posee el cuerpo humano para sintetizarlos: esenciales y no esenciales.

Los esenciales son aquéllos que no fabrica el cuerpo o lo hace en cantidades muy limitadas y deben ingerirse a través de alimentos consumidos o de los suplementos. Los aminoácidos no esenciales los fabrica el propio cuerpo.

Como aminoácidos esenciales se puede citar la treonina, lisina, metionina, arginina, valina, fenilalanina, leucina, triptófano, isoleucina e histidina.

Los no esenciales son: glicina, alanina, serina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, hidroxilisina, cistina, tirosina, prolina, hidroxiprolina.

Los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas, pero para cada proteína, la secuencia, es decir, el orden en que van ordenados los aminoácidos, es diferente. El número de secuencias posibles es tan grande que explica la gran cantidad de proteínas diferentes. Algunos aminoácidos conocidos, como por ejemplo, la fenilalanina, forman parte esencial de los neurotransmisores, tanto en el cerebro como fuera de él. La metionina y el triptófano son componentes esenciales del hígado. La tirosina y la glutamina, son segregadas por la glándula tiroides.

3.1.1 Aspectos generales de los aminoácidos.

Los aminoácidos son los monómeros de las proteínas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un enlace peptídico. Estos dos restos aminoacídicos forman un dipéptido. Si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente para formar un polipéptido.

Los veinte aminoácidos encontrados en las proteínas son α -aminoácidos. Todos tienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α), como se muestra en la figura 1. Son diferentes unos de otros en sus cadenas laterales (o grupo R) ya que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica influyendo en la solubilidad en agua de los aminoácidos [27].

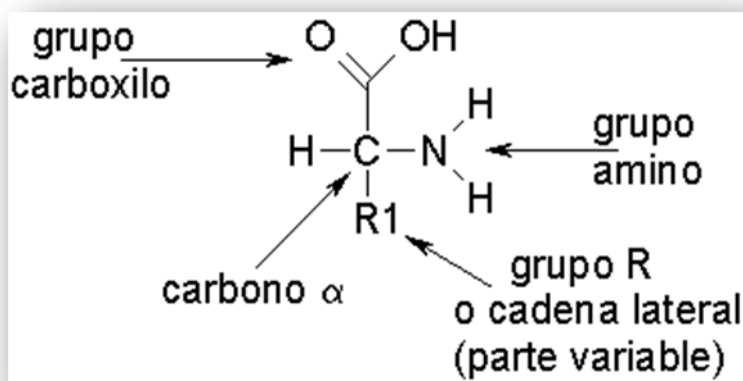


Figura 1. Estructura general de un aminoácido.

3.1.2 Clasificación de los aminoácidos.

Los α -aminoácidos se agrupan de acuerdo a las propiedades del grupo R, en especial a su polaridad o tendencia a interactuar en el agua a un determinado pH. La polaridad de los grupos R varía totalmente en forma apolar o hidrofóbico a altamente polar o hidrofílico. Coexisten 5 principales clases de α -aminoácidos [28-29]:

- Grupos R apolares y alifáticos

- b. Grupos R aromáticos (generalmente apolares)
- c. Grupos polares sin carga
- d. Grupos cargados negativamente
- e. Grupos cargados positivamente

a. Grupos R apolares y alifáticos

Los grupos R hidrocarbonados son apolares e hidrofóbicos. Las cadenas laterales voluminosas de alanina, valina, leucina e isoleucina, con sus distintas formas, son importantes para la promoción de interacciones hidrofóbicas dentro de las estructuras proteicas.

b. Grupos R aromáticos

La fenilalanina, tirosina y el triptófano con sus cadenas laterales aromáticas son relativamente apolares. Todos ellos pueden participar en interacciones hidrofóbicas, las cuales son especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se apilan los unos sobre los otros.

c. Grupos R polares sin carga

Los grupos R de estos α -aminoácidos. Son más solubles en agua, o hidrofílicos, que los α -aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman puente de H con el agua. Algunos de ellos son la serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina y glutamina.

d. Grupos R cargados negativamente (ácidos)

Los 2 α -aminoácidos que tienen grupos R con carga neta negativa a pH 7 son el aspartato y el glutamato, cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo.

e. Grupos R cargados positivamente (básicos)

Son en los cuales grupos R tienen una carga neta positiva a pH 7 son lisina, que tiene un segundo grupo amino en la posición de su cadena alifática; arginina y la histidina, que tiene un grupo imidazol. La histidina es el único α -aminoácido que tiene una cadena lateral con un pK_a próximo a la neutralidad.

3.1.3 Propiedades ácido base de los aminoácidos.

Todos los aminoácidos poseen un grupo ácido (-COOH) y un grupo básico (-NH₂), por lo tanto todos los aminoácidos presentan propiedades ácido-base [45].

Puesto que los aminoácidos tienen un grupo ácido y un grupo básico, presentan propiedades anfotéricas. Una sustancia anfotérica es aquella que puede aceptar y donar un H^+ . En una solución ácida fuerte, con un bajo pH, los aminoácidos están totalmente protonados y tienen una carga positiva (la forma catiónica). Para valores de pH altos, los aminoácidos se cargan negativamente (la forma aniónica) porque los iones hidróxido sacan los H^+ de las moléculas y en solución se establece un equilibrio entre sus diversas formas.

Ejemplo, la valina:

- a pH 1, todos los grupos aparecen protonados: carboxilo como $-COOH$ y amino como $-NH_3^+$. El aminoácido tiene una carga positiva neta.
- A pH 7, el carboxilo se disocia ($-COO^-$) y el amino sigue protonado ($-NH_3^+$); el aminoácido tendrá simultáneamente carga positiva y negativa (zwitterion).
- A pH 13, el carboxilo sigue disociado ($-COO^-$) y el amino pierde el protón ($-NH_2$); el aminoácido queda con una carga negativa.

Por otro lado, encontramos las formas iónicas de un aminoácido dicarboxílico (ácido aspártico) en función del pH.

- A pH 1, todos los grupos aparecen protonados: los dos carboxilos como $-COOH$ y amino como $-NH_3^+$. El aminoácido tiene una carga positiva neta.
- A pH 3, el carboxilo de la cadena lateral y el grupo amino, aparecen protonados ($-COOH$ y $-NH_3^+$) y el α -carboxilo disociado ($-COO^-$). El aminoácido está en torno a su punto isoeléctrico.
- A pH 7, los dos carboxilos están disociados ($-COO^-$) y el amino sigue protonado ($-NH_3^+$); el aminoácido tendrá simultáneamente dos cargas negativas y una positiva (una negativa neta).
- A pH 13, los dos carboxilos siguen disociados ($-COO^-$) y el amino pierde el protón ($-NH_2$); el aminoácido queda con dos cargas negativas netas.

Para concluir este análisis, consideremos las formas iónicas de la lisina que es un aminoácido dibásico.

- A pH 1, todos los grupos aparecen protonados: el carboxilo como $-COOH$ y los dos aminos como $-NH_3^+$. El aminoácido tiene dos cargas positivas netas.
- A pH 7, el alfa-carboxilo disociado ($-COO^-$) y los dos aminos protonados ($-NH_3^+$). El aminoácido tiene una carga positiva neta.

- A pH 9.5, el carboxilo sigue disociado (-COO⁻) y el amino de la cadena lateral sigue protonado (-NH₃⁺); el alfa-amino aparece como (-NH₂). El aminoácido estará próximo a su punto isoeléctrico.
- A pH 13, el carboxilo sigue disociado (-COO⁻) y los dos aminos han perdido el protón (-NH₂); el aminoácido queda con una carga negativa neta.

La mayoría de las células tiene valores de pH aproximadamente neutros; por lo tanto, la forma predominante de los aminoácidos en las células es el ion dipolar. Puesto que el anión carboxilato -COO⁻, está cargado negativamente, y el grupo amino protonado -NH₃⁺, está cargado positivamente, el ion dipolar es una especie química neutra.

Dentro de una titulación se sabe que cada punto de inflexión, indica la condición en que la forma ácida y la forma básica de un grupo químico son equimolares. El pH al que esto ocurre corresponde a:

$$-\log(\text{constante de ionización del ácido}) = pK_A$$

(Tal como lo indica la ecuación de Hendersson-Hasselbach)

Si se habla de un aminoácido que al titularse se comporta de manera diprótica, se dice entonces que el primer grupo en titularse es el grupo ácido:



El pK_A aproximado de este grupo en los aminoácidos es inferior, esto debido al efecto electro-atractor del grupo α-amino, que a este pH se encuentra cargado positivamente.

En el punto medio de cualquier titulación se alcanza un punto de inflexión en que el pH es igual pK_A del grupo protonado. El segundo grupo en titularse es el grupo α-amino:



que posee un pK_A del grupo básico.

En varios aminoácidos, la cadena lateral también posee carácter ácido base y por tanto tendremos un tercer grupo ionizable.

Siempre que una molécula presenta dos o más grupos ionizables, existe un valor de pH al cual la especie iónica más abundante posee una suma de cargas positivas y negativas igual a cero, es decir, no posee carga eléctrica neta.

Cuando los aminoácidos se encuentran en solución, se encuentran en forma del ion dipolar, o *zwitterion* (en alemán "ion híbrido"). Un *zwitterion* puede actuar como ácido (dador de protones), o como base (aceptor de protones). Las sustancias con esta naturaleza dual son denominadas anfóteras y comúnmente denominadas anfólitos.

Si nosotros analizamos el movimiento electroforético de los aminoácidos a distintos valores de pH, encontraremos un valor al cual su movilidad electroforética es nula. Este valor de pH corresponde a la condición en la cual la especie dominante es aquella que no posee carga eléctrica neta. Este valor de pH recibe el nombre de punto isoelectrico (*pI*). El punto isoelectrico puede calcularse como el valor promedio de los valores de pK_A de los dos grupos siguientes:

- El grupo ácido que al perder su protón da lugar a la especie sin carga neta.
- El grupo básico que al ganar un protón da lugar a la especie sin carga neta.

3.1.4 Reactividad química de los aminoácidos

Las aminas pueden considerarse como derivados de amoniac, al igual que los alcoholes y éteres se consideran derivados de agua. El nitrógeno en aminas tiene una hibridación sp^3 y el par de electrones sin compartir puede considerarse como el cuarto sustituyente. Esta disposición tetraédrica se invierte rápidamente a través de un estado de transición plano. El par de electrones sin compartir está menos unido con respecto a los pares sobre el oxígeno en alcoholes y éteres, ya que el nitrógeno es menos electronegativo que el oxígeno. Las consecuencias de esto, son:

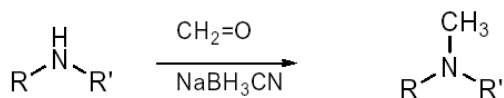
- su menor capacidad para formar enlaces de hidrógeno
- su mayor basicidad y nucleofilia
- su menor acidez

De los métodos de síntesis las sustituciones con azida o cianuro, o la aminación reductora son mejores métodos que la alquilación directa del amoniac [42]. El grupo NR_3 en una sal de amonio cuaternario, $R^+N^+R_3$, es un buen grupo saliente, lo que permite que se produzca la eliminación de Hoffman.

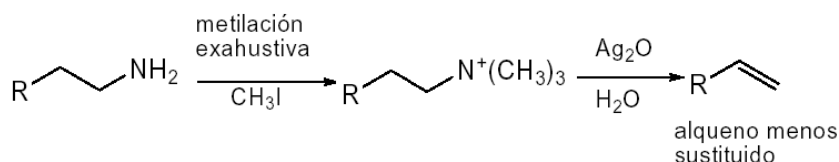
La reactividad nucleófila de las aminas se manifiesta en reacciones sobre carbonos electrófilos, como haloalcanos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y sus derivados.

En el caso de este tipo de compuestos, muchas de las reacciones consideradas como principales están asociadas a compuestos carbonílicos entre otros grupos funcionales. Es muy difícil en este punto resumir las más importantes.

Aminación reductora (metilación)



Eliminación de Hofmann



Las reacciones de aminas están controladas por el potencial nucleofílico del átomo de nitrógeno, la tendencia del nitrógeno a compartir el par de electrones libre, hace que éstos sean buenos nucleófilos, buenas bases y una reactividad excepcional de los anillos aromáticos con grupos o-amino sustituidos.

Los 20 α -aminoácidos naturales poseen un grupo ácido que puede sufrir las reacciones características de los ácido carboxílicos, por ejemplo:

Los aminoácidos sufren descarboxilación a aminas; un ejemplo particular sería la descarboxilación de la histidina a histamina. El interés sintético de esta reacción es suprimir el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). Esto puede ser más o menos fácil, necesitando más o menos temperatura para lograrlo, en función del grupo R unido al carboxilo.

Cabe mencionar que los grupos R de los aminoácidos son diversos, por ello pueden reaccionar de varias maneras, es decir; el ácido aspártico y el ácido glutámico poseen un segundo grupo ácido carboxílico. Otros aminoácidos con grupos laterales reactivos son la cisteína ($-\text{SH}$), la arginina (guanidio), la histidina (imidazol), la serina, la treonina y la tirosina (alcoholes), la asparagina y la glutamina (amidas), la metionina (un tioeter) y el triptofano (indol).

3.1.5 Métodos de cuantificación.

Los α -aminoácidos pueden cuantificarse utilizando diferentes técnicas; químicamente se pueden cuantificar mediante la reacción del grupo α -amino con ninhidrina donde este compuesto reacciona rápidamente con el grupo amino, lo oxida y libera amonio, el cual se condensa con la ninhidrina reducida y con otra molécula de ninhidrina para producir un aducto de color púrpura.

Otros métodos de cuantificación y análisis de mezclas de aminoácidos que se desean analizar, llevan a cabo una previa separación. Los principales métodos de separación empleados en los laboratorios, dependen en gran medida, de la cromatografía de gases [1,2], la cromatografía líquida [3–4] y electroforesis capilar [5–6].

Cromatografía de capa fina.

Una de las técnicas que cabe mencionar es la cromatografía de capa fina. Este método se basa en la separación de las moléculas adsorbidas a una capa muy delgada de gel de sílice, mediante el flujo de una columna de solvente que se deja ascender mediante capilaridad. La separación se realiza en base a la polaridad de las moléculas y la mezcla de solventes más empleada ha sido butanol: agua: ácido acético (4:1:1).

Cromatografía líquida en columnas de intercambio aniónico.

En este caso, los aminoácidos se hacen pasar por una columna de resina con un grupo catiónico. Los aminoácidos, según su carga se van a unir a la columna y luego, mediante un cambio gradual en el pH del solvente que se aplica a la columna, se va eluyendo cada aminoácido a un pH distinto (según su punto isoelectrico). Como algunos aminoácidos son más difíciles de separar que otros, a menudo es necesario emplear una columna corta para separar un grupo de aminoácidos y una columna larga para separar los aminoácidos restantes.

Los aminoácidos pueden identificarse mediante su reacción con ninhidrina, mediante su absorbancia UV o mediante fluorescencia (si están marcados con un grupo fluorescente), ya sea en la placa de sílice, o conforme eluyen de la columna.

Cromatografía líquida de alta resolución en columnas de fase reversa.

Este método consiste en aplicar los aminoácidos disueltos en una fase acuosa acidificada a una columna de sílice unida a una cadena hidrocarbonada. Los aminoácidos, según su polaridad se van a unir a la columna y entonces el

eluyente se mezcla gradualmente con cantidades cada vez mayores de un solvente menos polar que el agua. Los aminoácidos van siendo lavados de la columna conforme la polaridad del solvente baja lo suficiente.

Existen otros métodos que nos permiten analizar de manera tanto cualitativa como cuantitativa; en los cuales se sustituye uno de los grupos del aminoácido, ya sea el ácido carboxílico, el grupo amino como tal, o bien el hidrógeno activo.

También se han comparado técnicas de cromatografía gaseosa (GC) con las de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en la separación y cuantificación de azúcares, polialcoholes y aminoácidos, concluyendo que en el análisis de un gran número de estos compuestos, la GC tiene mejor selectividad, mayor sensibilidad, permite separar mayor número de compuestos y cuantificar, en un mayor intervalo de concentraciones. Todo con una derivatización y una inyección con una sola columna y un único inyector [7-8].

Los compuestos en estudio requieren de una derivatización para formar compuestos volátiles susceptibles a la separación por cromatografía gaseosa [9-10]. A pesar de la gran variedad de derivados y métodos existentes, y en desarrollo, se puede observar que los más usados son los acetilados y sobre todo los trimetilsililderivados.

3.1.6 Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos en estudio.

3.1.6.1 Ácido glutámico.

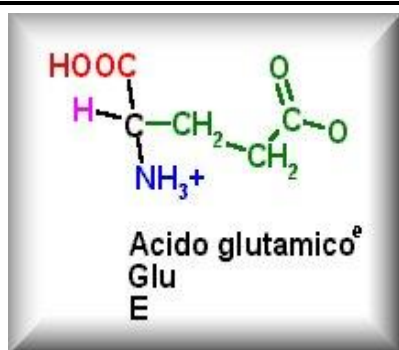


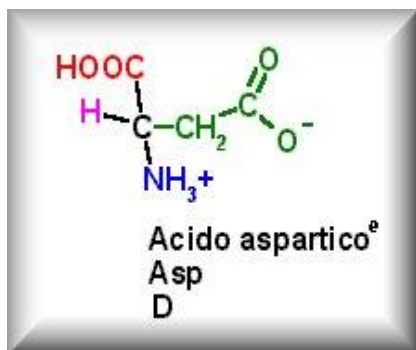
Figura 2. Estructura ácido glutámico

Es un aminoácido no esencial. Se considera como “alimento de cerebro” que mejora las capacidades mentales; ayuda rápidamente a recuperación de la úlcera; ayuda a evitar la fatiga; ayuda en el control del alcoholismo, esquizofrenia y el ansia por el azúcar.

pK_1 α -COOH 2.10; pK_2 α -NH₃⁺ 9.47; pK_R 4.07 (Δ -COOH).

Formula empírica	C ₅ H ₉ NO ₄
Peso molecular	147,13
aspecto	Sólido blanco
olor	Característico.
pH	3,0-3,5
Punto de fusión	205°C
Solubilidad	7 g/l en agua a 20°C HCl,

3.1.6.2 Ácido aspártico.



Figur

3. Estructura ácido aspártico

Es un aminoácido no esencial. Ayuda en la expulsión de amonio perjudicial. Cuando el amonio ingresa al sistema circulatorio actúa como una sustancia altamente tóxica que puede ser dañina para el sistema nervioso central. Estudios recientes señalan que el ácido aspártico puede incrementar la resistencia a la fatiga e incrementa la resistencia. pK_1 α -COOH 1.99; pK_2 α -NH₃⁺ 9.90; pK_R 3.90 (β -COOH).

Formula empírica	C ₄ H ₇ NO ₄
Peso molecular	133,10
aspecto	Sólido blanco
olor	Inodoro
pH	2.5 – 3.5
Punto de fusión	270°C
Solubilidad	5 g/l en agua a 20°C. HCl

3.1.6.3 Treonina



Figura 4. Estructura treonina:

Es un aminoácido esencial. Es un constituyente importante de colágena, elastina y proteínas del esmalte; ayuda a prevenir el exceso de grasa en el hígado; ayuda al aparato digestivo y tractos intestinales a funcionar suavemente. Contiene un centro quiral extra, marcado con asterisco en la figura.

pK_1 α -COOH 2.09; pK_2 α -NH₃⁺ 9.10.

Formula empírica	C ₄ H ₉ NO ₃
Peso molecular	119.12
aspecto	crystal blanco
olor	Inodoro
pH	5-6(100g/l)
Punto de fusión	265-270°C
Solubilidad	90 g/l en agua a 20°C. HCl

3.1.6.4 Leucina

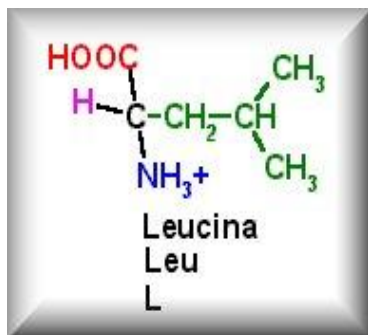


Figura 5. Estructura leucina

Es un aminoácido esencial.

Junto con la isoleucina provee de unidades para la fabricación de componentes bioquímicos esenciales, algunos de los cuales se utilizan para la producción de energía, estimulantes del cerebro superior y ayuda al organismo a estar alerta.

pK₁ α-COOH 2.33; pK₂ α-NH₃⁺ 9.74

Formula empírica	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Peso molecular	131.18
aspecto	sólido
olor	débil
pH	(20 g/l H ₂ O, 20 °C) 5,5 - 6,5
Punto de fusión	265-270°C
Solubilidad	24 g/l en agua a 20°C. en etanol (20 °C poco soluble. HCl.

3.1.6.5 Valina

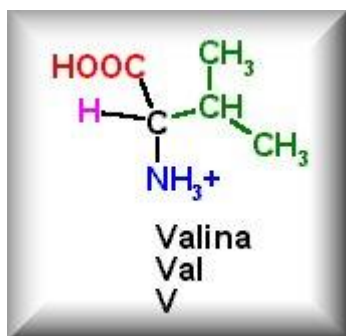


Figura 6. Estructura valina

Es un aminoácido esencial.

Promueve el vigor mental, la coordinación muscular y ayuda a calmar las emociones nerviosas.

pK₁ α-COOH 2.29; pK₂ α-NH₃⁺ 9.74.

Formula empírica	C ₅ H ₁₁ NO ₂
Peso molecular	117,15
aspecto	Sólido blanco
olor	Inodoro.
pH	5,5- 6,5 10
Punto de fusión	315°C
Solubilidad	85 g/l en agua a 20°C HCl,

3.2 Cromatografía.

La cromatografía se define como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la separación de las velocidades de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil la cual puede ser líquida o gaseosa, a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria que igual puede ser líquida o sólida.

La cromatografía como tal es considerada una de las técnicas más versátiles de separación, ya que es aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil.

Generalmente las técnicas suelen dividirse en cromatográficas y no cromatográficas, la elección de estas técnicas depende de la naturaleza y la cantidad de la muestra, cabe mencionar que como toda técnica de separación tiene sus limitaciones. Una de ellas son el tiempo de elución y la disponibilidad del equipo.

La cromatografía, al igual que las demás técnicas de separación tiene como objetivo prioritario la mejora de la selectividad del proceso analítico, que junto a la sensibilidad, precisión y rapidez constituyen las características esenciales del mismo.

3.2.1 Cromatografía de Gases.

En cromatografía de gases se incluyen todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas (gas portador), siendo la fase estacionaria un líquido (CGL) o un sólido (CGS). Se desarrolla en una columna cerrada en la que se encuentra retenida la fase estacionaria y por la que se hace pasar el gas portador, la técnica de separación es la elución.

Iniciado el proceso cromatográfico, los componentes de la mezcla se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil; la elución tiene lugar forzando el paso de un gas inerte a través de la columna. La fase móvil no interacciona con el analito y su única misión es la de transportar la muestra.

La cromatografía gas-sólido tiene una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos debido a la adsorción física sobre la superficie del sólido. Esta técnica ha tenido una aplicación limitada debido a la tendencia de los picos de elución a formar colas y a la retención semi-permanente de gases activos sobre la fase estacionaria.

La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida, inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (soporte) o en las paredes interiores de la columna, si ésta es capilar.

La cromatografía de gases, trata compuestos orgánicos de bajo peso molecular (P.M. 300 o menos). De forma general, la técnica ha sido ampliamente desarrollada en los últimos años para separar y analizar mezclas cuyos constituyentes tengan punto de ebullición inferior a 400°C y que sean térmicamente estables. La limitación es debida a que las muestras se deben de introducir como gas en cabeza de columna; cuando son líquidas se volatilizan instantáneamente en el bloque de inyección del cromatógrafo. Martin y Synge, en 1941, definieron la técnica y en 1955 aparece en el mercado el primer cromatógrafo.

Esta técnica cromatográfica es la que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles; su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización.

La cromatografía de gases requiere muestras volátiles, por lo que los compuestos que no lo son (azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, etc.) tienen que ser derivatizados, lo que significa transformar químicamente los grupos químicos que originan puntos de presión bajas (punto de ebullición alto) en compuestos más volátiles (en azúcares bloqueo de OH con cloruro de sílice trimetilado, en ácidos grasos se producen sus ésteres metílicos, etc.). La derivatización también puede ser empleada cuando los componentes reaccionan para dar grupos que proporcionan una fuerte respuesta en el detector empleado (adición de cloruros cuando se usa un detector de captura electrónica, etc.).

3.2.2 INSTRUMENTACIÓN.

En cromatografía de gases como se ha mencionado anteriormente, es una separación en la cual se considera la volatilidad de los componentes de la mezcla a analizar [46]. La mezcla se hace pasar a través de un tubo largo y estrecho llamado Columna. Con la ayuda de un gas inerte, la separación se basa en la diferencia de velocidad de los solutos a su paso por la columna los cuales se dirigen al sistema de detección, donde se obtienen una serie de señales que quedan registradas en forma de una serie de picos que contienen el cromatograma.

La figura 7 presenta los elementos de un cromatógrafo de gases:

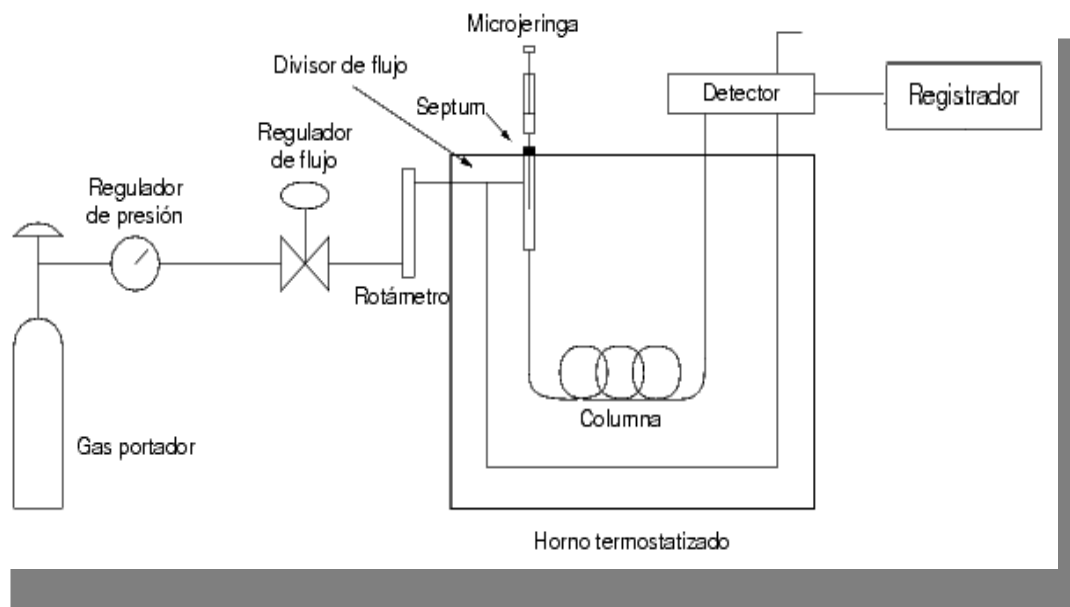


Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de gases [49].

- **GAS PORTADOR.**

El gas portador es un gas inerte, generalmente de helio nitrógeno o argón, de elevado grado de pureza. El caudal del mismo que pasa por la columna, debe ser conocido y controlado. Para llevar a cabo la elección de estos gases, es necesario tomar en cuenta una de las principales características como son la pureza, viscosidad (ya que tiene influencia sobre la dispersión de los compuestos en la fase estacionaria y sobre la difusión en la fase móvil) y peso molecular de la mezcla a tratar.

La pureza es de suma importancia, ya que ayuda a no producir ruido de fondo en la señal registrada, con el fin de obtener resultados reproducibles.

Para el uso del gas es conveniente saber que el peso molecular debe ser alto porque en éste los solutos se difunden menos, ya que es conveniente que los picos sean más esbeltos posible.

Las presiones de entrada en la columna generalmente son entre 10 y 50 psi (lb/in²) proporcionando velocidades de flujo de 25 a 50 mL/min.

- **INYECCIÓN DE LA MUESTRA.**

La muestra se introduce en el inyector con una microjeringa a través de un *septum* de goma. Allí se produce la vaporización instantánea de la misma y su introducción en la corriente de gas. Para volatilizar las muestras de una forma rápida y de modo que todas las partículas inicien el proceso de separación en el mismo punto, la temperatura del inyector debe ser muy elevada; unos 100 °C mayor que la de la columna. En la figura 8 se muestra en forma esquemática el procedimiento de inyección.

En las columnas analíticas por lo general, los tamaños de muestra oscilan entre pequeñas décimas de microlitos hasta 20µL, pero en las columnas capilares se requiere de muestras muchas más pequeñas.

Las características de los inyectores así como la de los modos de inyección dependen del tipo de columna que se utilice.

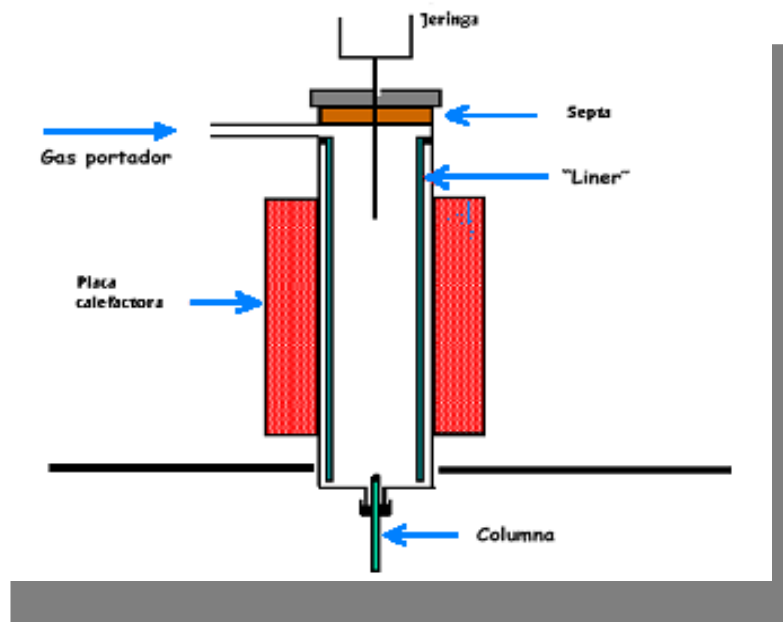


Figura 8. Introducción de la muestra en el puerto de inyección [50].

- **TIPOS DE INYECTORES.**

La principal función del inyector es evaporizar y mezclar la muestra con el gas portador antes de que ingrese a la columna. La inyección es un proceso importante para que la separación de los picos sea reproducible.

Los inyectores se usan, dependiendo del tipo de columna que se utilice en un determinado análisis; a continuación se mencionan los inyectores más utilizados (o comunes).

Inyección de vaporización directa.

Este tipo de inyección se refiere a la introducción directa de la muestra, dependiendo del tipo de columna que se utilice así como el volumen que se inyecta.

Este tipo de inyectores se caracteriza por el tipo de montaje que utiliza, el cual es un tubo de metal cubierto en el interior por una cubierta de vidrio, en el cual se hace pasar el gas acarreador calentando hasta llegar a la temperatura correspondiente.

Este tipo de inyector tiene la característica de que toda la muestra que es inyectada pasa por la columna para ser analizada.

Inyectores con o sin división (Split o splitless).

La inyección de muestras con *splitless* es frecuentemente usada para análisis de componentes donde una gran cantidad de muestra es inyectada a la columna.

Durante el muestreo con *splitless*, la muestra se inyecta dentro de la columna caliente y forma un vapor que consiste de muestra, solvente y gas. Parte del gas sale por el respirador al pasar en el alineador. El muestreo con *splitless* puede ser optimizado usando “concentración de muestra / solvente” para volver a concentrar la muestra en la columna caliente.

Esta técnica es extremadamente útil para adelgazar los picos y eliminar las trazas de solvente y la interferencia de vapor retenido momentáneamente en la fase estacionaria. El solvente humedece la fase estacionaria para retener a los solutos, por lo cual, esto permite una rápida elución de los solutos. Para que ocurra la retención, la temperatura inicial del horno debe ser 20°C abajo del punto de ebullición del solvente.

El muestreo tipo *split* es el método más popular porque inyectar muestras de 0.1 a 2 µl no impide que haya una buena altura y sensibilidad en el pico. Si se obtiene la cantidad máxima de eficiencia de la columna, las áreas del pico más pequeñas asociadas con el muestreo tipo *split* reflejan una reducción en lo ancho en lugar del alto del pico. Mejora la simetría del pico permite una mejor reproducibilidad y por lo cual da una mejor cuantificación del área de los picos. Otra ventaja del *split*, es que se pueden usar columnas más estrechas para tener una mejor resolución sin tener que volver a muestrear la columna.

Quizá el único inconveniente del *split* es que la cantidad inyectada a la columna podría no ser representativa si la muestra no es completamente vaporizada. Esto es porque la muestra entra en el alineador con el respirador *split* abierto y el extracto de la muestra y el acarreador son purgados antes de que entren a la columna. Por esta razón, este método debe ser monitoreado siempre corriendo soluciones estándares de concentraciones conocidas y analizar su reproducibilidad.

Inyección On-column.

Por la sensibilidad de los componentes en la mezcla; es decir, debido a la inestabilidad de los componentes, se utiliza la inyección *on-column* introduciendo la solución directamente dentro de la columna y manteniendo la temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente. De ser necesario, la zona de inyección se refrigera con aire.

Este tipo de inyectores se utiliza para aquellos solutos que son termolábiles y para los que tienen puntos de ebullición altos.

3.2.3 Tipos de Columnas.

La columna es el elemento esencial de la cromatografía de gases, ya que es en donde se lleva a cabo el proceso fisicoquímico en los que se fundamenta la separación.

Existen dos tipos de columnas cromatográficas de uso común: columnas empacadas y columnas tubulares abiertas.

- **Columnas Empacadas.**

Son tubos de de acero inoxidable rellenos con las partículas del sólido inerte; recubierto con una fase líquida no volátil formado por partículas de sílice recubiertas con líquido (100-300 μm diámetro) en un tubo de vidrio. Para mejorar la eficacia de estas columnas se puede disminuir el tamaño de partícula o aumentar su longitud. El flujo que se utiliza para este tipo de columnas varía desde 10 a 40 ml/min de gas acarreador.

Hoy en día las columnas empacadas han sido sustituidas en su mayoría por las columnas capilares.

- **Columnas Capilares.**

Hoy en día las columnas capilares son las más utilizadas en cromatografía de gases. Las columnas capilares son tubos largos y de diámetro muy pequeño de vidrio, en la actualidad más frecuentemente de sílice fundida, en las que la fase estacionaria está retenida sobre la pared interna de la columna. Este tipo de columnas son ideales para una mayor velocidad de análisis y eficacia; pero sólo son aplicables para muestras pequeñas.

Estas columnas, la fase estacionaria como se ha dicho anteriormente es retenida sobre la pared interna de la columna. De acuerdo a ello se pueden distinguir dos tipos de columnas:

- WCOT (*wall coated open tubular*) < 1 μm de liquido recubriendo el interior de un tubo de sílice. Actualmente, se utilizan capilares de sílice fundida con un recubrimiento externo protegido de poliimida.
- SCOT (*support coated open tubular*) 30 μm de liquido soportado en el interior de un tubo de sílice. La superficie interna está revestida de una capa fina tal como tierra de diatomeas.

La relación de fases es más baja en las WCOT, siendo especialmente útiles para la separación de compuestos orgánicos volátiles a temperatura por encima de la temperatura ambiente.

En la tabla 1, se muestra una recopilación acerca de las propiedades y características para columnas cromatográficas.

Tabla 1. Propiedades y características de las columnas para cromatografía de gases.

	Tipo de columna*			
	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: Columnas abiertas de pared recubierta.
 SCOT: Columnas abiertas recubiertas con soporte.

3.2.4 Detectores.

Un detector es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica [33]. Podemos expresar que el detector son los "ojos" de un cromatógrafo. Es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecemos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

Los detectores pueden ser clasificados:

- Detectores según su Grado de Selectividad :
 1. Universales. Responde a la mayoría de los solutos que pasan por él.
 2. Específicos ó Selectivos. Exhibe una gran respuesta a un grupo particular de sustancias con un mínimo de respuesta a otras.
- Detectores Destructivos y No destructivos. Esta clasificación, obviamente, es en referencia a si la muestra es destruida o no.
- Detectores según su Modo de Respuesta:
 1. Dependientes del Flujo Másico. Producen una señal que es proporcional a la cantidad de soluto que pasa a través de él en la unidad de tiempo pero es independiente del volumen de gas portador requerido para la elución.
 2. Dependiente de la Concentración. Dan una señal proporcional a la cantidad de soluto por unidad de volumen de gas portador que pasa a través de él.
- Detectores según el proceso de detección Ionización, Óptico-espectroscópico, Electroquímico, etc.

3.3 DERIVATIZACION.

Las tres principales dificultades que pueden presentar una muestra al ser introducida directamente en el cromatógrafo, son:

- 1.- La complejidad en la matriz, la cual origina graves perturbaciones en la determinación cromatográfica las cuales pueden ser la determinación de moléculas de bajo peso molecular.
- 2.- Los analitos de interés se encuentren excesivamente diluidos, donde las concentraciones estarán por debajo del límite de detección y cuantificación del sistema cromatográfico.
- 3.- La incompatibilidad de la muestra con el sistema cromatográfico la cual se origina de las características básicas de dicho sistema y de los analitos.

En general son escasas las muestras que pueden introducirse al cromatógrafo de gases sin algún tipo de operación previa para la adecuación de la muestra y evitar las dificultades antes mencionadas.

Por tal motivo, como se ha dicho, se lleva un pre-tratamiento de la muestra. Para ello existen dos tipos de procesos que en ocasiones son tratados de manera adjunta. Uno de ellos comprende desde la preparación de la muestra, orientada a evitar las dificultades derivadas de la complejidad de la matriz y de la excesiva dilución de la muestra. Estos aspectos son meramente procesos físico-químicos en los que frecuentemente se emplean dos fases para llevar a cabo la separación global con o sin preconcentraciones. Entre estos procesos se encuentran la sorción, partición, extracción líquido-líquido, destilación o volatilización, etc.

El otro proceso es la derivatización, la cual consiste en una amplia gama de reacciones químicas irreversibles, que son orientadas hacia la transformación de los analitos en nuevas especies que sean compatibles con el sistema cromatográfico en sus diferentes módulos y con el detector continuo.

En cromatografía de gases, la preparación de la muestra comprende una serie de reacciones continuas y discontinuas, cuya función principal es adecuar la porción de la muestra tomada y conservada para su introducción directa en la unidad de inyección del cromatógrafo de gases.

En cromatografía de gases la derivatización se utiliza fundamentalmente para mejorar y posibilitar la separación cromatográfica, es decir para que se lleve a cabo la separación de los analitos en estudio.

Cabe mencionar que un objetivo primordial para que se lleve a cabo la derivatización es evitar las pérdidas por adsorción, volatilización, descomposición térmica, reacciones químicas, entre otras. Esto se puede observar desde la toma de muestra hasta el momento de su introducción en el cromatógrafo.

3.3.1 Reacciones de Derivatización.

En resumen, la mayor parte de los artículos publicados sobre análisis de aminoácidos por cromatografía de gases en el periodo 1956 a mediados de 1974, se pueden dividir en tres partes [19]:

- 1) Procedimientos y técnicas degradantes para convertir el aminoácido en otro producto químico.
- 2) Procedimientos basados en la esterificación del grupo carboxilo y de la derivatización del grupo amino y de los otros reactivos en por lo menos dos pasos.
- 3) Procedimientos basados en una derivatización simultánea de los grupos carboxilo o el grupo amino en la reacción.

Como ya se mencionó, la cromatografía de gases es una técnica de gran poder de resolución y muy reproducible, siempre y cuando las condiciones de operación estén perfectamente controladas [6-27]. Debido a las características de esta técnica, los analitos a separar deben presentar una serie de propiedades para llevar a cabo su análisis, tales como:

- a) Ser volátiles a la temperatura de trabajo.
- b) Ser térmicamente estables.
- c) No presentar interacciones indeseables dentro de la columna.

El sistema de detección utilizado debe dar una respuesta suficientemente sensible a los analitos separados. He aquí donde nos auxiliamos de la derivatización, ya que no siempre se cumplen estos requisitos. Generalmente las técnicas de derivatización son conocidas como cromatoquímica de gases. Los principales objetivos de la derivatización en gases son:

- Hacer posible la utilización de la técnica mejorando, la estabilidad térmica de los analitos. La resolución cromatográfica evitando la formación de picos indeseables y las adsorciones irreversibles o combinando las propiedades separativas del analito mediante un ajuste adecuado de su volatilidad para eliminar solapamiento de los picos.

- Variar indirectamente la sensibilidad del detector introduciendo la molécula del soluto, con grupos orgánicos adecuados que mejoren la sensibilidad del mismo; de esta forma facilita su análisis cualitativo y cuantitativa.

El principal objetivo para llevar a cabo una reacción de derivatización es el de transformar los solutos en derivados que presenten propiedades cromatográficas adecuadas; de forma general, se clasifican en dos grupos:

- reacciones sustractivas
- reacciones no sustractivas

- **Reacciones Sustractivas.**

En este tipo de derivatización el grupo funcional de un analito se hace reaccionar con un reactivo para originar un derivado no volátil, el cual no es arrastrado por el gas portador. En el cromatograma se observará después de la reacción de sustracción; la ausencia de un pico en éste se indicará que la muestra contenía un soluto con dicho grupo funcional; la utilización de estas reacciones permiten obtener datos sobre la presencia de grupos de compuestos así como también la simplificación de cromatogramas complejos o mal resueltos y la eliminación del pico correspondiente al componente mayoritario que puede solapar a los picos de los constituyentes de la muestra a nivel de trazas.

- **Reacciones no Sustractivas.**

Se han descrito diversas reacciones de derivatización con el objeto de formar compuestos volátiles y con buenas propiedades cromatográficas aumentando la respuesta del detector.

En general, las reacciones no sustractivas son de tipo discontinuo, llevándose a cabo en un reactor o recipiente de mezcla, y una vez completada, los productos se introducen en el cromatógrafo.

A continuación se describen las reacciones más utilizadas, dentro de las reacciones de derivatización:

- **Reacciones de Sililación.**

Este tipo de reacciones son las más ampliamente utilizadas en cromatografías de gases. La mayoría de los grupos funcionales cuya presencia en los solutos origina problemas para el análisis en cromatografías de gases, se transforman en derivados sililados.

Se denomina sililación a la sustitución de un hidrógeno activo de un grupo funcional por un grupo sililo, el cual esta formado por un átomo de silicio trisustituido. El grupo sililo más utilizado es el trimetilsililo, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (TMS).

El reemplazo del hidrógeno activo por el grupo sililo produce efectos importantes en la molécula del soluto:

- Reduce su polaridad.
- Reduce la posibilidad de formación de enlaces de hidrogeno intermoleculares.
- Aumenta su volatilidad y su estabilidad térmica.

Las ventajas que conlleva la utilización de este tipo de reacciones, son mejorar la resolución de los picos, la reducción de interacciones indeseables en la columna, tales como adsorciones irreversibles y la reducción a la simetría de los picos.

Este tipo de reacciones es de tipo discontinuo, ya que se lleva a cabo en condiciones anhidras en frascos de vidrio forrados con teflón; la mayoría de ellas son rápidas, produciéndose de manera instantánea a temperatura ambiente o si las reacciones son lentas basta con elevar la temperatura; por lo general suele estar dentro del intervalo de $60^\circ\text{-}150^\circ\text{C}$ dependiendo el proceso, ya que en ocasiones puede elevarse a 200°C . Si se utiliza trimetilclorosilano (TMCS), el cual actúa como catalizador, una vez completada la reacción, se inyecta de forma directa al cromatógrafo.

En la tabla 2 se muestran los grupos funcionales que forman derivados trimetilsililo.

Tabla 2. Grupos funcionales que forman derivados trimetilsililo.

NH → NTMS	N(TMS) ₂	CONH ₂ → CONHTMS	CH ₂ CO → -CH=COTMS
NH ₂ → NHTMS		BOH → BOTMS	NOH → NOTMS
OH → OTMS		SH → STMS	COOH → COOTMS
POH → POTMS		SOH → SOTMS	

El orden de los grupos funcionales, para aceptar el grupo sililo es: alcohol > fenol > ácido carboxílico > amina > amida. Los grupos funcionales primarios son más reactivos que los secundarios.

Por otro lado la capacidad donadora de los grupos sililo es TMSIM > BSTFA > MSTFA > THSDEA > MSTA > TMCS > HMSD. Sin embargo la mezcla con mayor poder de sililación presenta es TMSIM-BSTFA-TMCS, en relación 1:1:1, ya que el TMCS hace la función catalítica, que anteriormente se ha mencionado.

La capacidad donadora de los grupos sililo y la aceptora de los grupos funcionales, otro factor que debe de considerarse en este tipo de reacciones de sililación es el posible impedimento estérico que dificulta el acceso del reactivo a los grupos funcionales, lo cual determinará la velocidad de formación del derivado.

Particularmente en los aminoácidos, la presencia de los grupos amino y carboxilo en estos compuestos los hacen menos volátiles, y por lo tanto poco adecuados para separarlos y analizarlos directamente por cromatografía de gases. Sin embargo, la formación de derivados trimetilsililo es una forma fácil de llevar a cabo la separación de aminoácidos mediante esta técnica. Cabe mencionar que alguno de sus derivados no son estables tal es el caso de la histidina, ya que se descompone en un tiempo aproximado de dos horas. Para evitar la descomposición en el inyector, es preferible la inyección directa en la columna. En la tabla 3 se resumen algunas características (reactivos, temperatura y el tiempo de reacción) de la formación de estos derivados.

Tabla 3. Separación de aminoácidos mediante formación de derivados trimetilsililo.

Tipo de aminoácido	Reactivo*	Tiempo	Temperatura (°C)
General	BSTFA-MeCN	15 min	125
General	BSA-TMCS-Py	12-14 h	60
General	TMSDEA	1 h	reflujo
General	MSTA	5 min	25
General	MSTFA-TMCS-MeCN	1 h	120
Sulfurado	BSTFA	5 min	150
Glicina, lisina, arginina	BSTFA-MeCN	15 min	135

- **Reacciones de alquilación.**

De igual forma, en las reacciones de alquilación se sustituye un átomo de hidrógeno activo por un grupo alquilo o un grupo arilo.

Generalmente, los reactivos más utilizados para llevar a cabo la reacción de alquilación son los haluros de alquilo en presencia de un catalizador como óxido de plata., y los bromuros y yoduros de hidrocarburos de bajo peso molecular.

Para obtener estos derivados, “se utiliza la técnica discontinua en la que el catalizador se añade al soluto en presencia de un exceso de agente derivatizador y la mezcla se agita en la oscuridad hasta que se completa la reacción” [42]. En la tabla 4 se muestran los grupos funcionales que pueden originar derivados alquilo.

Tabla 4. Grupos funcionales que originan derivados alquilo.

COOH → COOR	SO ₂ OH → SO ₂ OR	OH → OR
SH → SR	NH ₂ → NR ₂	NHR' → RNR'
CONH ₂ → CONR ₂	SO ₂ NH ₂ → SO ₂ NR ₂	
R'COCH-COR'' → R'-COCH=C(OR)R''		

R: grupo alquilo

- **Reacciones de esterificación.**

Por lo general se utiliza este tipo de derivatización para derivatizar principalmente grupos funcionales ácidos tales como los ácidos carboxílicos. En este caso se utiliza los alcoholes como reactivos derivatizantes.

La mayoría de las reacciones de esterificación son lentas, es por eso que se aceleran con temperaturas elevadas o utilizando un catalizador como cloruro de hidrógeno, cloruro de tionilo, tricloruro de boro o ácido sulfúrico.

Si esto no es suficiente para que la reacción se lleve a cabo, entonces se desplaza el equilibrio de la reacción con la finalidad de eliminar el agua que se forma en la reacción de esterificación.

3.4 Técnica de Derivatización.

El derivatizante empleado bis (trimetilsilil) trifluoruro acetamida (BSTFA), tiene por mecanismo de reacción la sustitución de un hidrógeno activo(o hidrogeno ácido) por un grupo -Si (CH₃)₃. La presencia de este grupo en la molécula provoca que la volatilidad del aminoácido aumente, que la molécula sea menos polar y térmicamente estables; haciendo posible su análisis por cromatografía de gases. A pesar de la gran variedad de derivados y métodos existentes, y en desarrollo, se puede observar que los más usados son los acetilados y sobre todo los trimetilsililderivados.

Los compuestos trimetilsilil derivatizados se caracterizan en general por ser muy volátiles. La separación cromatográfica se realiza en columnas no-polares. La fase estacionaria de uso más amplio para los compuestos en estudio es la metilsilicona [11, 12]. Los agentes silanzantes son sensibles al agua, razón por la cual es importante trabajar bajo condiciones anhidras.

Una de las ventajas al usar BSTFA +1%TMS referente a otros reactivos de sililación, es la volatilidad de sus productos derivados, tal es el caso de mono (trimetilsilil) trifluoruro. Por ejemplo, en cromatografía de gases, algunos de los derivados TMS en aminoácidos con puntos de ebullición bajos y ácidos del ciclo de Krebs, los tiempos de retención de estos derivados son la causa por la cual co-eluyen con los subproductos de la mayoría de los reactivos de derivatización TMS. Se han obtenido buenas separaciones cromatográficas con el derivatizante BSTFA+1%TMS, en donde comúnmente los productos de este reactivo eluyen generalmente frente al disolvente

Los mejores resultados se obtienen cuando los productos de la reacción de sililación son solubles en la mezcla de reacción final. Cuando se añade, un catalizador como trimetilclorosilano, muchos compuestos pueden ser derivatizados satisfactoriamente, como en el caso amidas y muchas aminas secundarias. Cabe mencionar que los átomos de flúor tienden a ensuciar menos los detectores de ionización de flama del cromatógrafo de gases.

El producto utilizado para esta tesis, fue una mezcla de BSTFA + 1% TMCS. El BSTFA puede actuar como su propio disolvente que en este caso es el TMCS mismo que tiene la función de catalizador dentro de la reacción.

Esta mezcla es extremadamente sensible a la humedad, por lo que es de importancia trabajar en condiciones anhidras, ya que de lo contrario la reacción no procede.

3.5 Método de estándar interno para la cuantificación en cromatografía de gases capilar.

El método estándar interno es una sustancia que se añade a todas las muestras y estándares en cantidad conocida y suficiente para poder determinarse sin problemas, generalmente se utiliza una sustancia que no está presente en la muestra a analizar, y cuyo pico cromatográfico no coincida o solape con los del soluto de la muestra. Este método se utiliza generalmente cuando se desea cuantificar uno o más componentes de una mezcla en general; el método es susceptible a errores sistemáticos como al azar.

El método está basado en que cuando las señales del analito y del estándar interno corresponden proporcionalmente a las fluctuaciones del método y del instrumental empleado, entonces la razón de estas señales es dependiente de tales fluctuaciones. De tal forma que el método se compensa por errores provenientes de la manipulación de la muestra a analizar.

Este método generalmente se emplea en una curva de calibración, empleando una serie de soluciones que contiene una cantidad igual de estándar interno e incrementos en la cantidad del analito. Se lleva a cabo la inyección manual con jeringa, ya que no se necesitan sistemas de introducción de la muestra extremadamente precisos. Además, no es necesario que la respuesta del detector sea perfectamente constante, ya que la variación en ella no afecta a la relación de áreas. Es decir del cromatograma se obtiene el área, se calcula la relación de áreas del analito y el área del estándar interno ($A_{\text{analito}} / A_{\text{Est. Int.}}$), y se grafica en función de la concentración del analito en cada solución (Fig. 9).

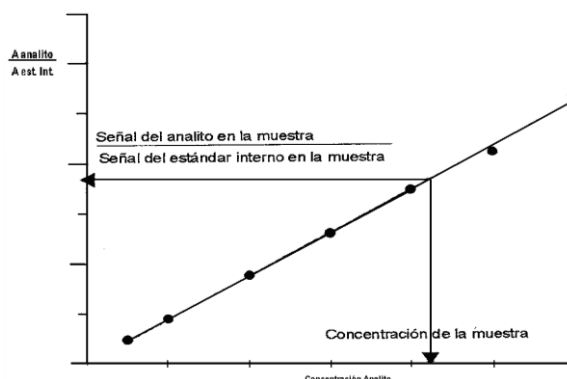


Figura 9. Curva de Calibración (Estándar Interno) [51].

La relación matemática que se obtiene de la figura 9 es: realizar una regresión lineal por mínimos cuadrados, es decir; $y=mx+b$, donde, m es la pendiente de la recta, b es la ordenada al origen. Para obtener el valor de la concentración del analito en estudio basta con realizar la interpolación lineal. Finalmente se interpola en la gráfica obtenida el valor de la razón de áreas de una muestra conocida, la cual debe de contener la misma cantidad de estándar interno que los patrones.

El principal problema de este método es encontrar un estándar interno adecuado, el cual debe de dar un pico cromatográfico suficientemente separado de los picos de los solutos, pero próximo al pico del soluto que se requiere cuantificar. Cuando se tratan de mezclas complejas se añaden uno o dos estándares internos, debido a los problemas de solapamiento no siempre es posible añadir una sustancia ajena a la muestra, por lo que generalmente se añade como estándar uno de los componentes de la misma.

3.6 Método de calibración absoluta.

Este método hace referencia a la utilización de un estándar externo en donde se emplean mezclas sintéticas de concentración de analito conocidas con precisión. La curva de calibración para cada analito, se establece al relacionar directamente su área obtenida a partir de los cromatogramas con la correspondiente cantidad de analito.

Cuando se inyecta igual volumen de mezcla problema, el área obtenida se correlaciona directamente con la cantidad de soluto a determinar a través de la curva de calibrado. Este método resulta ser más fácil que el de curva de calibración, pero para ello debe de considerarse disponer de mezclas sintéticas del analito con una composición similar a la de la muestra problema; en este método la inyección debe ser extremadamente precisa; así, cuando se utilizan válvulas de inyección es la técnica recomendada.

4. METODOLOGÍA

La metodología experimental usada para llevar a cabo la determinación y cuantificación de los aminoácidos es presentada en la figura 10.

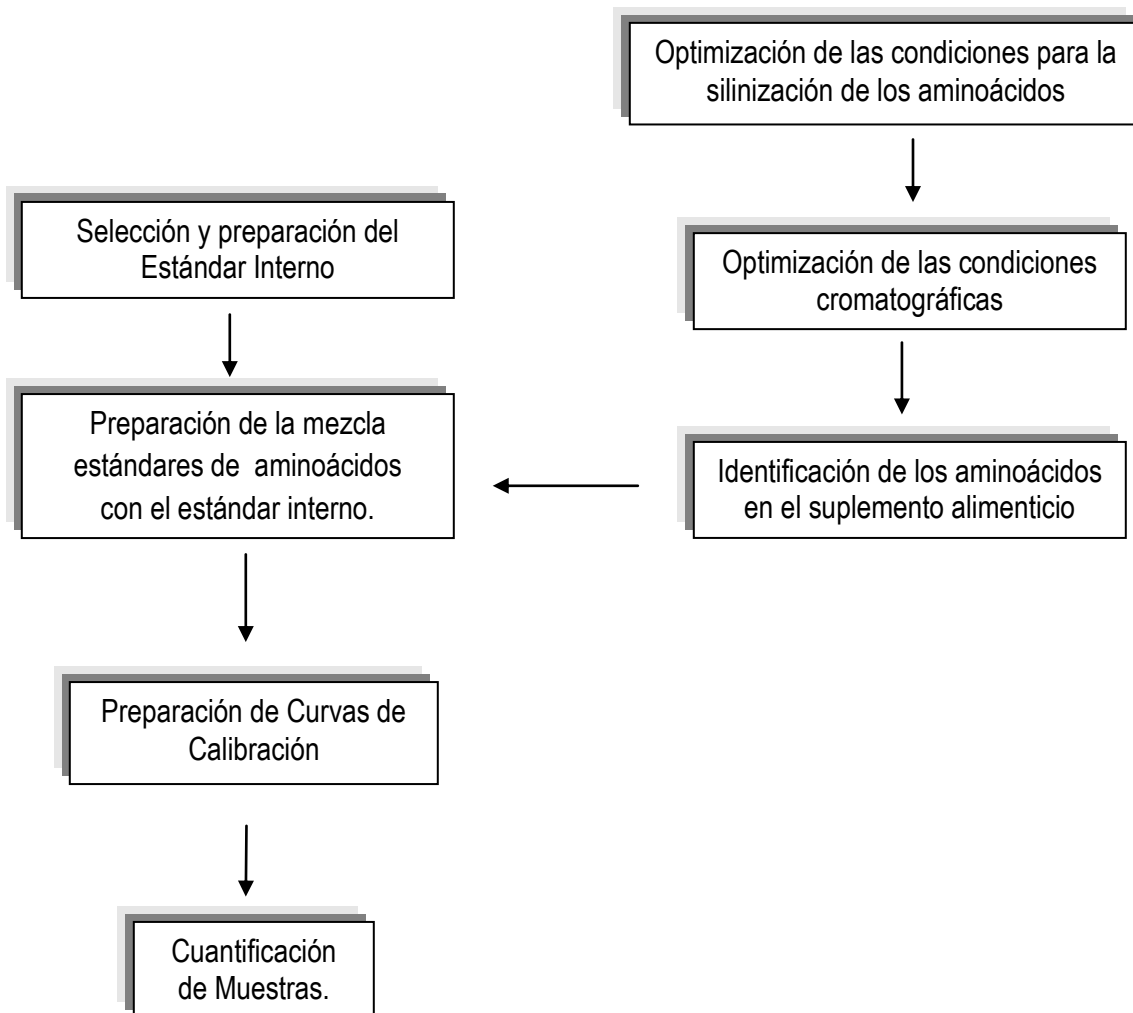


Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología experimental.

5. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental consistió en implementar un método por cromatografía de gases capilar para la identificación y cuantificación de los aminoácidos seleccionados, mediante la inyección directa de sus derivados usando BSTFA como agente derivatizante.

Las condiciones cromatográficas y las condiciones de reacción fueron optimizadas, tomando en cuenta diversos factores:

- Tratamiento previo de los estándares de aminoácido
- Temperatura de reacción de derivatización
- Tiempo de reacción de derivatización
- Definición y resolución de los picos de cada uno de los aminoácidos en estudio, reproducibilidad de las áreas, etc.

5.1 MATERIAL Y EQUIPO

A continuación se enlista los materiales y reactivos utilizados para llevar a cabo la parte experimental.

Material de Laboratorio

- Vasos de precipitado de 20ml, 50ml, 100ml, 250ml.
- Matraces volumétricos 10ml, 250ml.
- Micropipeta Marca ThermoLabsystems (10 μ L a 100 μ L).
- Viales para cromatógrafo de 5ml.
- Matraz Kitasato 250ml.
- Agitador de vidrio.
- Espátula.

Equipo

- Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AB204 (± 1 mg).
- Baño con recirculación; Marca PolyScience.
- Estufa marca Mettler.
- Cromatógrafo de Gases Buck Scientific 910; Figura 11.



Figura 11. Cromatógrafo de Gases Buck Scientific 910, ubicado en la sección de química analítica L-113.

En la figura 11 se muestra el cromatógrafo de gases utilizado en la experimentación, ubicado en la sección de química analítica L—113.

- **Columna Cromatográfica.**

Columna: Megabore DB-5MS (95 % metil silicon %5 fenil polisiloxano) no polar.

Dimensiones:

Longitud= 30m

DI = 0.53 mm.

Df= 1.5 micras de espesor de película

5.2 Reactivos.

- Ácido Clorhídrico (HCl); marca Baker, pureza 37%
- Acetonitrilo (CH₃CN) J.T. Baker 99.98%.
- Cloruro de Metileno (CH₂Cl₂) J.T. Baker 99%.
- Agua desionizada.

Gas.

- Nitrógeno. Alta Pureza. Praxair
- Hidrógeno. Alta Pureza. Praxair

Derivatizante.

- BSTFA + 1% TMCS (Regis Technologies Inc USA). (Anexo B).

Estándares de aminoácidos.

- Ácido glutámico. Merck al 99 %
- Ácido aspártico. Merck al 99 %
- Treonina. Merck al 99 %
- Leucina. Merck al 99 %
- Valina. Merck al 99 %

Estándar interno.

- Antraceno grado analítico. Merck al 99 %

6. Preparación de Soluciones.

6.1 Solución de estándar de aminoácidos:

Se pesan 20 mg de cada aminoácido (valina, leucina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico) los cuales se disuelve y afora en 10ml de agua ácida (pH =0). La curva de calibración se prepara siguiendo los volúmenes indicados en la tabla 5.

$$[\text{Concentración aminoácido}] = 20\text{mg} / 10\text{ml} = 2\text{mg} / \text{ml}$$

6.2 Preparación de estándar interno (E. I.):

Se pesan aproximadamente 10 mg de Antraceno, se disuelve y afora en 10 ml de acetonitrilo. Esta solución se preparó de esta manera debida que este compuesto es soluble en acetonitrilo y que al mismo éste, es solvente de la reacción para llevar a cabo la transformación a derivados trimetilsilil de los aminoácidos.

$$[\text{Concentración estándar interno}] = 10\text{mg} / 10\text{ml} = 1\text{mg} / \text{ml}$$

La tabla 5 ilustra la manera en que fueron preparados los sistemas para la obtención de la curva de calibración.

Tabla 5. Preparación de los sistemas para la curva de calibración.

Sistema	Volumen (ml) aminoácido	Antraceno 1 mg/mL (Estándar Interno) (ml)	Derivatizante (ml)	Conc. aminoácidos (mg /ml)
1	0.2	0.25	0.5	0.533
2	0.4	0.25	0.5	1.067
3	0.6	0.25	0.5	1.600
4	0.8	0.25	0.5	2.133
5	1.0	0.25	0.5	2.667
6	1.2	0.25	0.5	3.200

6.3 Procedimiento para la curva de calibración.

Procedimiento de derivatización.

- A partir de las soluciones estándar preparadas, en un frasco vial se coloca la cantidad indicada en la tabla 5 de cada aminoácido, a continuación el frasco vial es introducido en la celda la cual mantiene una temperatura constante de 70°C, burbujeando las soluciones en una atmósfera de nitrógeno hasta eliminar el agua, (figura 12).
- Con el fin de remover las trazas de agua, se agregan dos porciones sucesivas de 0.5ml de cloruro de metileno y se evaporan con nitrógeno, hasta aquí se lleva a cabo tal y como se muestra en la figura 12. Es muy importante que en este paso se elimine totalmente el agua de la muestra a analizar, ya que de lo contrario la reacción no se llevara a cabo.
- Una vez que se ha eliminado toda el agua se agregan las cantidades indicadas en la tabla 5 de E. I., posteriormente se agrega 0.50mL de reactivo derivatizante (BSTFA+ 1% TMCS), indicado en la tabla 5. Posteriormente se lleva al horno a 120°C por 30 minutos.

Nota:

Los sistemas se preparan en frascos reactivos, se tapan con teflón antes de llevar al horno. De los sistemas se inyecta 1µL en el CG.



Figura 12. Procedimiento previo a la derivatización de los aminoácidos.

6.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS COMERCIALES.

El tratamiento para analizar y cuantificar las muestras comerciales, como a continuación se describe. La información del marbete correspondiente a cada muestra analizada, se encuentra reportada en el anexo B (Véase B-5 y B-6).

- **Tratamiento de la muestra (AMINO 2000):**

A continuación se describe el procedimiento, para llevar a cabo el análisis de este suplemento alimenticio:

Se trituran las tabletas. Una vez trituradas se pesaron 5631.5mg de muestra comercial y se llevan a un aforo a 250 ml agua ácida (pH=0). Agitando previamente hasta que se disuelvan las tabletas. De esta solución se coloca en un frasco vial, una alícuota de 800 μ L.

Una vez tomada la muestra se lleva a una atmósfera de nitrógeno a 70°C, paso seguido se agregan dos porciones sucesivas de 0.5ml de cloruro de metileno y se nitrogena de nuevo, con el fin de eliminar las trazas de agua que pudiesen haber quedado.

Una vez que se ha eliminado toda el agua, se agrega 250 μ L de estándar interno, y 500 μ L de reactivo (BSTFA). Posteriormente, se lleva al horno a 120°C por 30 minutos.

Al igual que las muestras para la curva de calibración, cada muestra se debe tapar con teflón antes de llevarse al horno. Se inyecta 1 μ L de las muestras comerciales al CG. Cabe mencionar que las condiciones cromatográficas utilizadas son las mismas que se utilizaron para la curva de calibración.

- **Tratamiento de la muestra (AMINO 1800):**

Se pesaron 495.7 mg del suplemento alimenticio AMINO ACIDS 1800 y se colocaron en un frasco vial, se agregaron 250 μ L de estándar interno y 500 μ L de reactivo (BSTFA). Se selló con teflón y se tapó. Se calentó a 120°C por 30 minutos. Dejar enfriar

Inyectar 1 μ L de la muestra derivatizada (utilizando el programa de temperaturas) e identificar los aminoácidos presentes en la misma.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Para seleccionar las condiciones cromatográficas empleadas en la experimentación, se realizaron ensayos donde se variaba el programa de temperaturas, con la finalidad de obtener una buena resolución de cada uno de los aminoácidos que se desea identificar. En la tabla 6, se presentan los diferentes programas de temperatura que se realizaron.

TABLA 6.- Pruebas de diferentes programas de temperatura para definir las condiciones cromatográficas para desarrollar el presente proyecto.

Programa Temperatura	
1	T _i 70°C, 1 min. Rampa 10°C/min. Hasta 270 °C; T _f 270°C por 10 min.
2	T _i 100°C, 0.5 min. Rampa 10°C/min. Hasta 270 °C; T _f 270°C por 10 min.
3	T _i 100°C, 1 min. Rampa 10°C/min. Hasta 270 °C; T _f 270°C por 5 min.

Para lograr una buena separación de los aminoácidos mediante cromatografía de gases, se consideró las condiciones de operación cromatográficas reportadas en la tabla 7. El programa 1 se descarto debido a que el tiempo muerto en los cromatogramas era notable. El programa que se uso en este trabajo fue el programa 3, ver cromatograma (A- a A-).

Tabla 7. Información general de las condiciones cromatográficas utilizadas en la separación de los derivados de aminoácidos

Columna	Megabore DB-5MS, L = 30 m, DI = 0.53 mm, df=1.5 μm
Programa de Temperatura	T _i 100°C, 1 min. Rampa 10°C/min. Hasta 270 °C; T _f 270°C por 5 min.
Inyector	On-column.
Temperatura de Detector	310° C (FID).
Flujo gas acarreador	Nitrógeno, 7 psig
Presión Hidrogeno	20 psig
Vol. Inyección	1 microlitro.

La reacción general de derivatización utilizando BSTFA+ 1% TMCS se muestra en la figura 13, donde se observa la obtención del producto principal de la reacción de derivatización que se lleva a cabo en los α -aminoácidos. De acuerdo a la figura 13, se realiza la sustitución de un átomo del hidrógeno ácido (hidrogeno activo) por un grupo trimetilsilil -Si (CH₃)₃ (ver sección 3.4). Debido a la estabilidad de la reacción el producto obtenido principalmente es el aminoácido en su forma derivada trimetilsilil el cual es un producto con mayor estabilidad térmica, menor polaridad y más volátil.

Como se ha mencionado anteriormente, esta reacción es extremadamente sensible a la humedad, ya que si existiera la mínima cantidad de humedad, la reacción no se llevaría a cabo. Para que se lleve a cabo la reacción también dependen de las condiciones cromatográficas y de las condiciones de reacción establecidas y del tipo de aminoácido que se esté analizando para que se obtengan resultados satisfactorios.

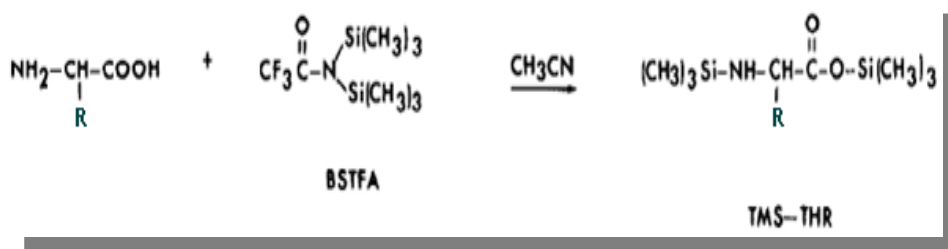


Figura 13. Reacción general de derivatización.

Se realizó la inyección de 1 μL de cada uno de los aminoácidos, para observar su comportamiento por separado bajo las condiciones de reacción previamente establecidas. En la figura 14 se muestra el cromatograma de uno de los aminoácidos (treonina). Los cromatogramas correspondientes a cada uno de los aminoácidos se encuentran en el Anexo A (Figura A-3 a A-7).

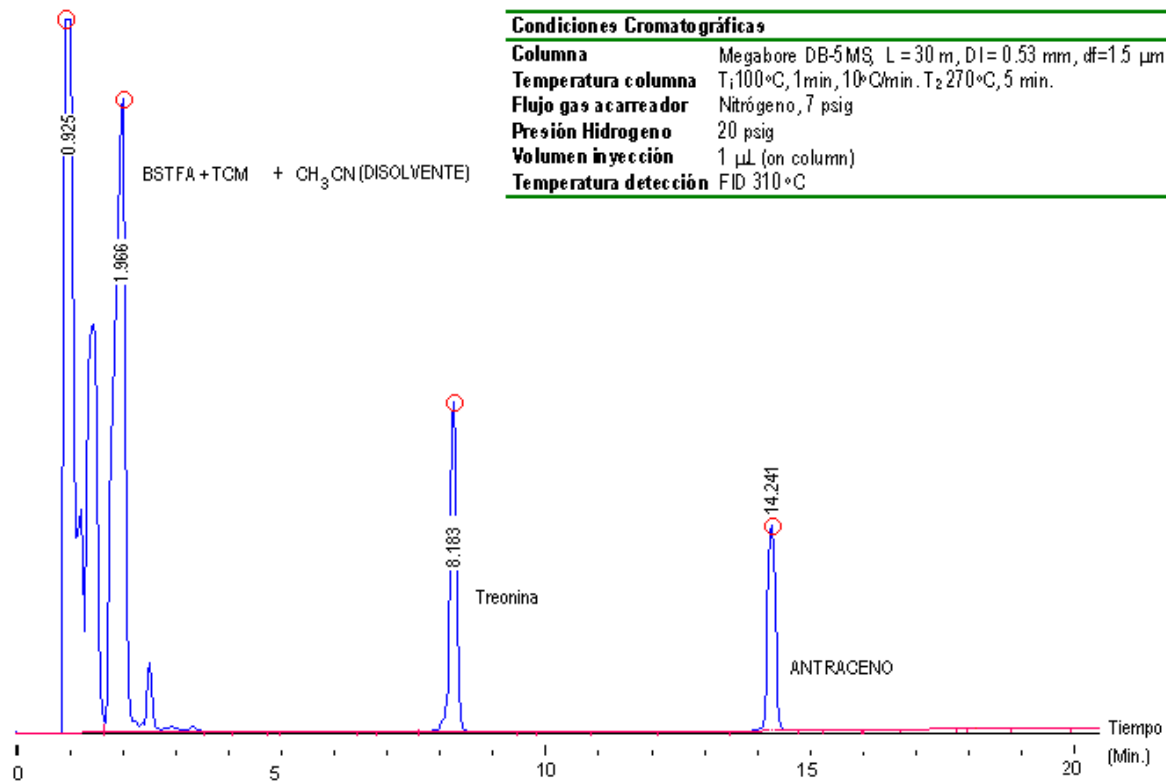


Figura 14. Cromatograma de treonina en su forma trimetilsilil.

En la figura 14 se presenta el cromatograma del derivado treonina y en la figura 15 la reacción de derivatización muestra la reacción de formación del derivado de trimetilsilil correspondiente con el BSTFA como reactivo derivatizante.

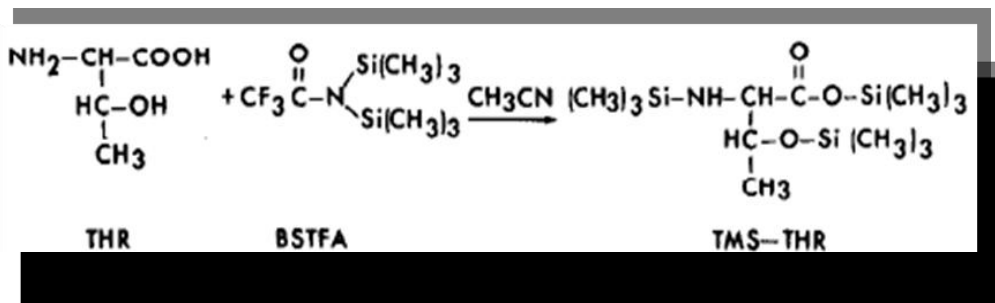


Figura 15. Reacción de derivatización para la treonina.

Para observar el comportamiento de los aminoácidos a analizar bajo las condiciones cromatográficas establecidas; en la figura 16 se muestra un cromatograma correspondiente a una inyección de 1 μ L que contiene la mezcla de los estándares de aminoácido en su forma derivada trimetilsilil. En esta figura las primeras señales corresponden al BSTFA + 1% TMCS (Bis trimetilsilil trifluoruro acetamida) y al disolvente acetonitrilo. Para corroborar lo antes mencionado, en el anexo A figura A-1 se muestra un cromatograma en el cual se muestra el blanco formado respectivamente por BSTFA + 1% TMCS (Bis trimetilsilil trifluoruro acetamida) y acetonitrilo.

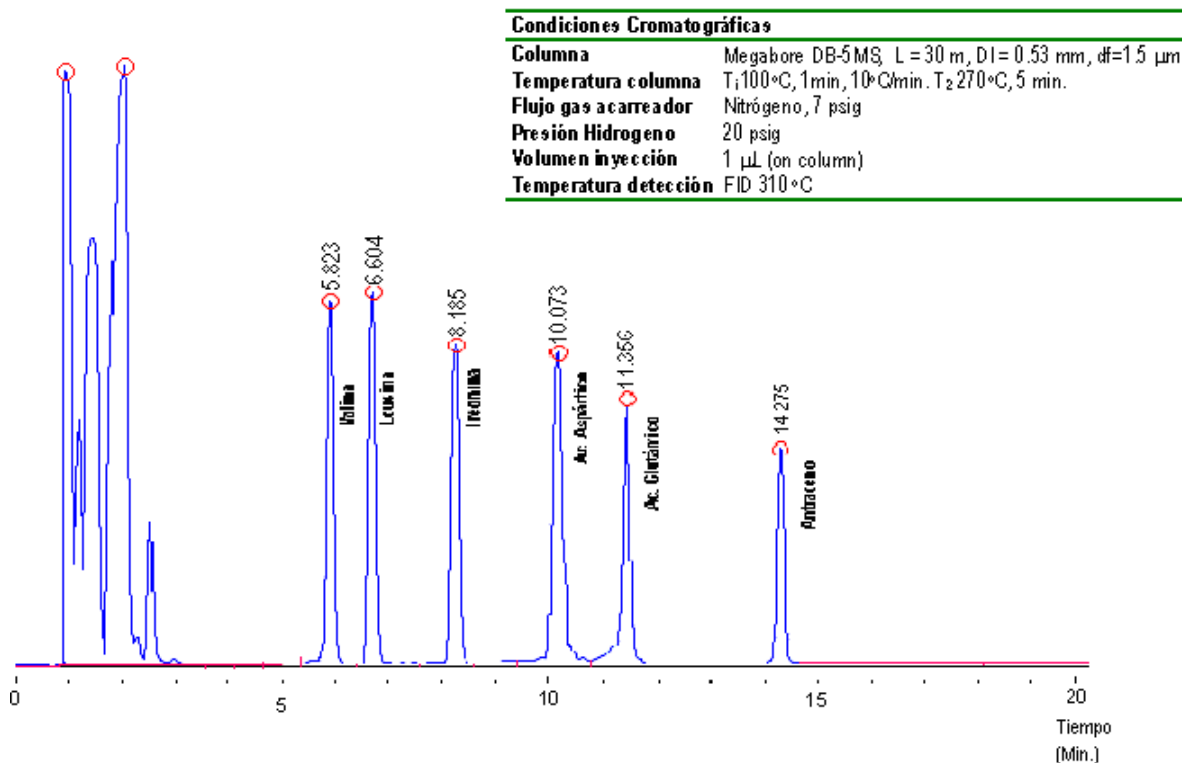


Figura 16. Cromatograma de estándares de aminoácidos en forma de su derivado trimetilsilil.

La inyección de 1 μ L de la mezcla de estándares de aminoácidos en su forma derivatizada trimetilsilil (Figura 16) se llevó a cabo con el fin de determinar el tiempo de retención de cada uno de los aminoácidos en las condiciones cromatográficas seleccionadas, así como identificar el orden de elución de cada uno de los aminoácidos. En la figura 16 se observa la obtención de picos bien definidos con un comportamiento gaussiano y se observa que no hay traslape.

Posteriormente para realizar la cuantificación de cada uno de los aminoácidos, se procedió a realizar las curvas de calibración para cada uno de los aminoácidos.

En la tabla 8 se encuentran reportados los tiempos de retención correspondientes al promedio de 4 muestras inyectadas en el cromatógrafo de Gases de la mezcla de aminoácidos. Se puede observar que al trabajar bajo estas condiciones cromatográficas, con esta técnica, se obtiene una buena resolución de los diferentes aminoácidos.

Tabla 8. Tiempos de retención promedio de los aminoácidos en estudio bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

Compuestos	t_R (min.)*	C. V. (%)*
Valina	5.823	0.01
Leucina	6.604	0.19
Treonina	8.185	0.05
Ácido Aspártico	10.073	0.04
Ácido Glutámico	11.356	0.03

*Resultados correspondientes a un promedio de 4 muestras inyectadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 8, el coeficiente de variación que se obtuvo para cada uno de los aminoácidos en su forma derivada trimetilsilil es menor a 2%, lo cual cumple con el criterio de aceptación de reproducibilidad en cada caso en particular.

A partir de los resultados presentados en los cromatogramas, se realizó el cálculo de la R_s , tomando como ejemplo los pares mostrados en la tabla 9. Las resoluciones obtenidas para cualquier caso es de $R_s > 1.5$; de acuerdo a estos resultados se puede observar que existe una buena eficiencia de separación en cada par de los aminoácidos bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

TABLA 9. R_s de los aminoácidos correspondientes.

Compuestos	R_s
Valina – Leucina	2.67
Leucina – Treonina	2.46
Treonina – Acido Aspártico	2.87
Ácido Aspártico - Ácido Glutámico	2.75

7.2 Selección del Estándar Interno.

En cromatografía de gases es importante seleccionar el estándar interno para realizar la cuantificación de los analitos en estudio, para minimizar el error de la reproducibilidad de la inyección.

Para elegir el estándar interno, en este caso, se tomaron en consideración varios factores:

- En el presente trabajo no fue posible seleccionar a un aminoácido como estándar interno no presente en las muestras comerciales, ya que de acuerdo con el marbete contienen un número importante de aminoácidos.
- De acuerdo a la literatura [27-28], se indica que el fenantreno o antraceno pueden ser utilizados en la cromatografía de gases como estándares internos. Son compuestos que no reaccionan directamente con el derivatizante (BSTFA +1% TMCS) y presentan un comportamiento de retención similar respecto a los derivados de aminoácidos.

En este caso, se eligió al antraceno como estándar interno porque es uno de los reactivos existentes en el laboratorio con alta pureza (99%). La estructura molecular del antraceno (hidrocarburo aromático policíclico) se muestra en la Figura 17.

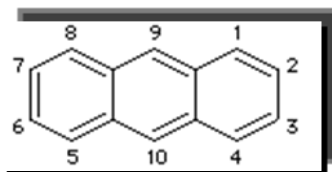


Figura 17. Estructura del Antraceno, estándar interno.

Se realizó la inyección de un blanco el cual sólo contenía el estándar interno y el disolvente (CH_3CN) (Anexo A figura A-2). El resultado fue la obtención de un pico bien definido, el área reportada no se traslapó con los aminoácidos en estudio, tiene una buena resolución respecto a los aminoácidos, así como su tiempo de retención ($t_R = 14.325$) es en tanto mayor que el de éstos por lo que es factible distinguirlo.

7.3 Obtención de las curvas de calibración.

Para realizar las curvas de calibración se eligieron sólo tres aminoácidos (valina, leucina, treonina). Para la elaboración de las curvas correspondientes, se consideró el procedimiento experimental descrito en la sección 6.1.

En la tabla 10, se muestran las concentraciones experimentales reportadas para los sistemas.

Tabla 10. Concentración de los aminoácidos para la curva de calibración.

Sistema	Conc.	Conc.	Conc.
	Valina (mg /mL)	Leucina (mg /mL)	Treonina (mg /mL)
1	0.596	0.624	0.538
2	1.052	0.971	1.077
3	1.528	1.577	1.616
4	2.135	2.176	2.154
5	2.617	2.782	2.693
6	3.269	3.227	3.232

Para realizar cada una de las curvas se inyectó 1 μ L por separado de cada sistema, del cual se obtuvo el cromatograma y el reporte correspondiente. Las curvas de calibración se obtuvieron graficando la relación de áreas ($A_{\text{aminoácido}} / A_{\text{antraceno}}$) en función de la concentración del aminoácido de interés.

La figura 18, muestran la curva de calibración de leucina, uno de los aminoácidos analizados; posteriormente en el anexo A, se encuentran las curvas de calibración de los demás aminoácidos obtenidas con una buena correlación.

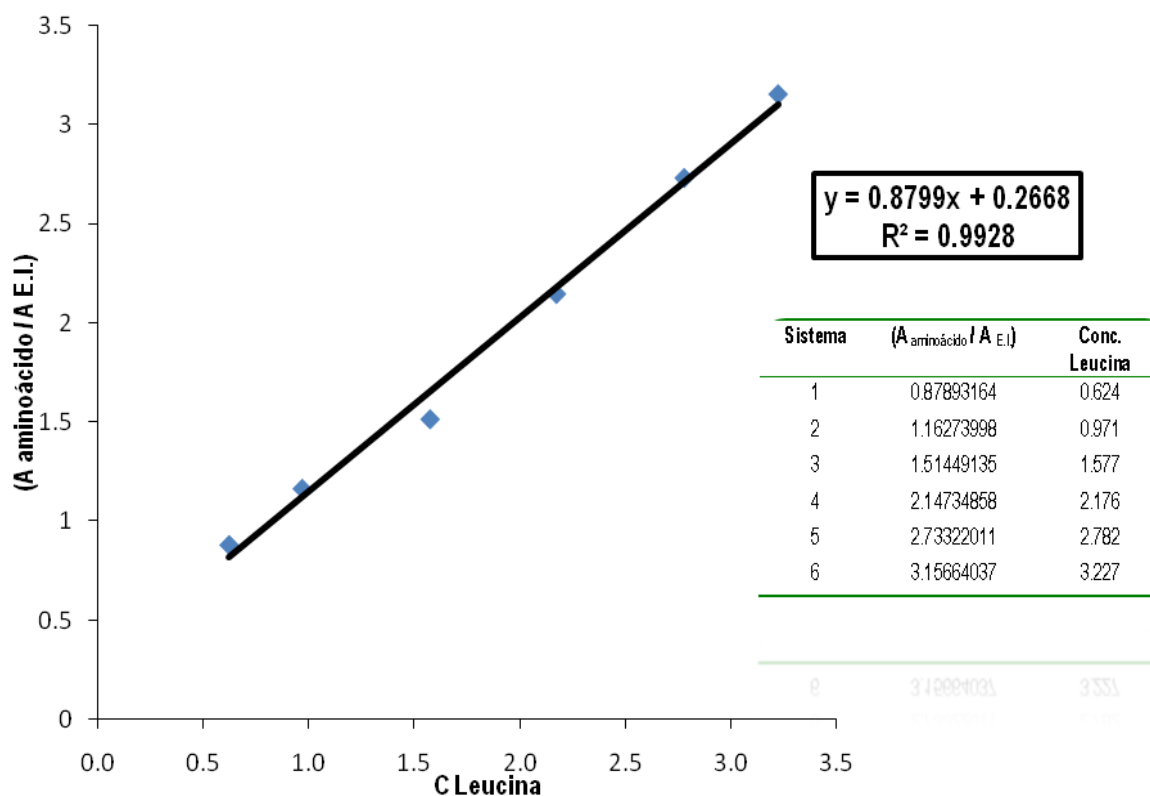


Figura 18. Curva de Calibración de leucina.

En la figura 18 se puede observar que la curva tiene una linealidad aceptable ($r^2 >> 0.99$). De esta misma forma fueron se construyeron las curvas para los demás aminoácidos; las cuales se encuentran en el anexo A (Fig. A-10 y A-11). En el anexo a de las tablas A-1 a A-9 se encuentra la recopilación de los datos para cada una de las curvas de calibración.

Haciendo referencia a los gráficos obtenidos de las curvas de calibración, se resume que presentan una linealidad aceptable. La tabla 11 es una recopilación de los resultados de las curvas de calibración.

Tabla 11. Recopilación de datos correspondientes a las curvas de calibración de cada aminoácido.

Compuesto	[Pendiente] m	[Ordenada al origen] B	R ²
Valina	1.1728	0.4028	0.9968
Leucina	0.8799	0.2668	0.9928
Treonina	1.6986	0.5297	0.9897

Como se puede observar en la tabla 11, la curva de calibración de treonina no se obtuvo una correlación superior a 0.99, sin embargo se encuentra en los límites por lo que se tomara en cuenta para llevar a cabo la cuantificación.

Las curvas de calibración de relación de áreas vs. concentración, fueron obtenidas en un intervalo de 0.53 - 3.20 ppm de cada aminoácido. El factor de respuesta determinado mediante la ecuación (1).

$$\frac{\text{área amino ácido}}{\text{área antraceno}} = F \frac{\text{concentración amino ácido}}{\text{concentración antraceno}} \quad (1)$$

De acuerdo a la ecuación 1 se calculo el factor respuesta para cada uno de los aminoácidos.

En la tabla 12 se muestran los resultados del método de factor respuesta obtenido para los aminoácidos: treonina, leucina y valina.

Tabla 12. Valores del factor respuesta de los aminoácidos con respecto al antraceno.

Aminoácido	Factor respuesta
Valina	0.244
Leucina	0.298
Treonina	0.560

7.4 Cuantificación de las muestras.

Las muestras comerciales, fueron preparadas utilizando la metodología citada en la sección 6. Posteriormente se inyectan 1 μ L al cromatógrafo de gases. En la figura 19 se muestra el cromatograma de la muestra comercial AMINO 2000. Cabe mencionar que en todas las inyecciones realizadas no se observó la presencia de ácido aspártico. En la figura 20 se muestra el cromatograma de la muestra AMINO 1800.

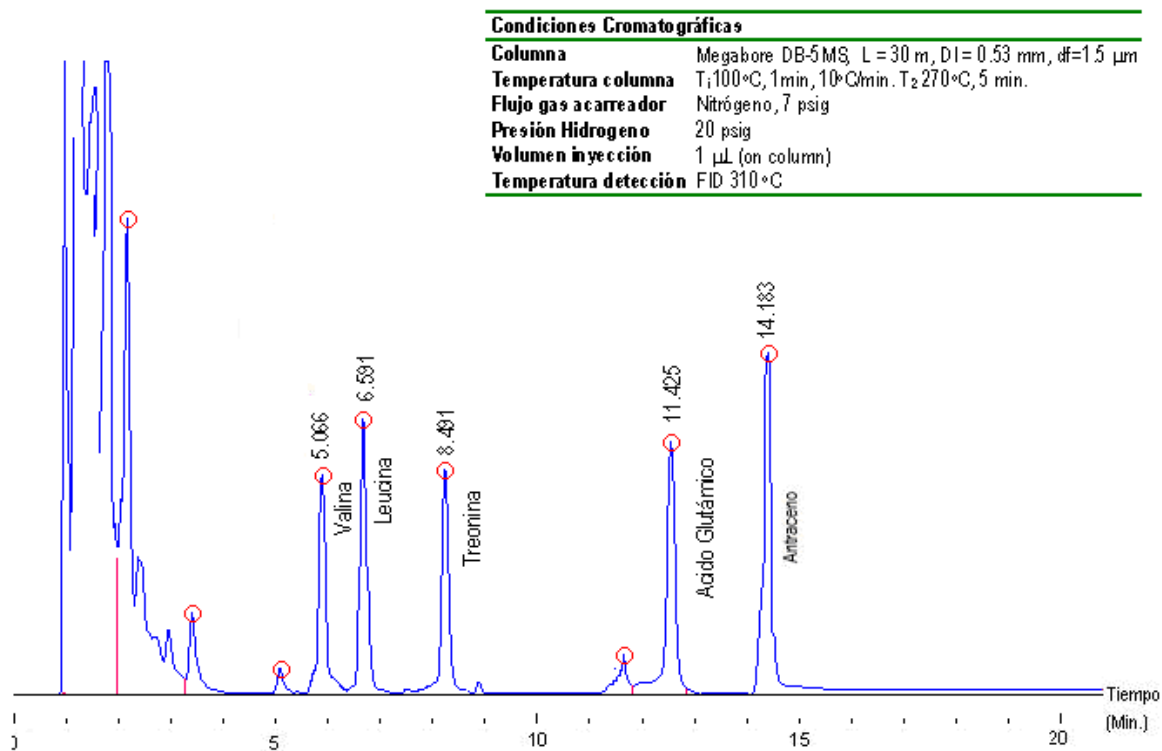


Figura 19. Cromatograma de una muestra comercial AMINO 2000.

Como se puede observar, al igual que en los cromatogramas de los estándares, se obtienen picos definidos, los cuales presentan un tiempo de retención similar al de los estándares. Cabe mencionar que de igual manera, las áreas son reproducibles en los dos suplementos alimenticios analizados.

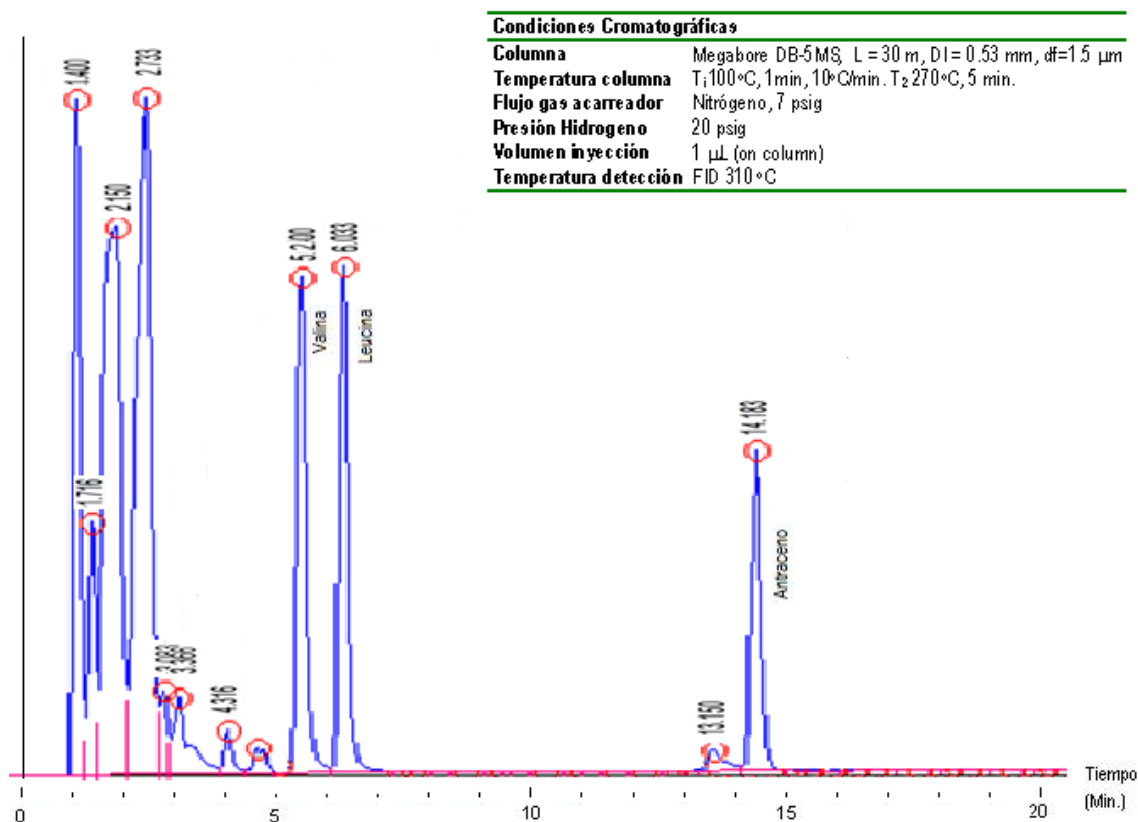


Figura 20. Cromatograma de una muestra comercial AMINO ACIDS 1800.

Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes a cada muestra analizada, los suplementos son analizados de manera individual.

Las muestras fueron inyectada por triplicado utilizando las mismas condiciones cromatográficas usadas en los estándares. Una vez obtenidos los cromatogramas para ambas muestras (Figura 21 y 22 respectivamente), se compararon los tiempos de retención de las muestras comerciales con las que se obtuvieron en los estándares y posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de dichas muestras.

La tabla 13 presenta los tiempos de retención promedio de la muestra comercial AMINO 2000 para cada uno de los compuestos identificados: valina, leucina, treonina, ácido glutámico (este aminoácido no se cuantifico solo se identifico), así como también la del estándar interno.

Para realizar la cuantificación de la muestra comercial AMINO 2000 se realizó por triplicado la muestra.

TABLA 13.- Tiempos de retención y parámetros estadísticos para la muestra AMINO 2000.

Aminoácido	T _r (min.) promedio	C. V. %	σ
Valina	5.088	0.122	0.562
Leucina	6.648	0.547	1.076
Treonina	9.158	0.215	0.621

En la tabla 13 se encuentran reportados los tiempo de retención, la desviación estándar y el coeficiente de variación para los componentes de la muestra comercial amino 2000. Esta tabla muestra la reproducibilidad del método bajo las condiciones experimentales de trabajo. Este comportamiento está íntimamente relacionado, principalmente, con la técnica de derivatización y la repetibilidad de la inyección.

De igual manera se realizó el mismo procedimiento para la muestra AMINO 1800. Estos resultados están reportados en la tabla 14.

TABLA 14.- Tiempos de retención y parámetros estadísticos para la muestra AMINO ACIDS 1800.

Aminoácido	T _r (min.) promedio	C. V. %	σ
Valina	5.016	0.129	0.136
Leucina	6.200	0.205	0.198

Los resultados de las tablas 13 y 14 corresponden los tiempos de retención obtenidos para cada una de las muestras comerciales analizadas. Cada muestra fue inyectada por triplicado utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para los estándares, los tiempos de retención obtenidos son comparados con los que se obtuvieron en los estándares. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede corroborar que efectivamente hay una buena resolución entre la mezcla de los aminoácidos; asimismo, los tiempos son similares a los de los estándares; se obtuvieron áreas reproducibles Anexo A (tablas A-10 a A-13), en todos los casos.

En la tabla 15 se reportan los resultados obtenidos, así como el contenido de las muestras en el suplemento alimenticio AMINO 2000.

Tabla 15. Resultados comparativos de la muestra comercial AMINO 2000.

Aminoácido	Área del Problema / Área de Antraceno	mg encontrados	mg reportados	Porcentaje Pureza respecto al marbete
Valina	1.1064	47.982	84.1667	57.00
Leucina	2.0798	162.895	204.167	79.78
Treonina	2.3140	83.060	95.000	87.43

De manera similar se llevó a cabo el tratamiento experimental para la muestra comercial AMINO 1800. Estos resultados se reportan en la tabla 16.

Tabla16. Resultados comparativos de la muestra comercial AMINO 1800.

Compuesto	mg encontrados	mg reportados	Porcentaje pureza
valina	3 132.6825	3 026	103.5255
leucina	10 358.9473	10 089	102.6756

Los resultados reportados en la tabla 15, corresponden a la cuantificación del suplemento alimenticio AMINO 2000. En esta tabla se puede observar que no se obtuvo un rendimiento del 100% en base a lo reportado en el marbete; sin embargo se puede decir que el desarrollo del método analítico se desarrollo.

En base a los resultados obtenidos en la tabla 16, se puede constatar que los resultados obtenidos en el suplemento alimenticio AMINO 1800 son aceptables con los reportados en el marbete. En analogía con el otro suplemento alimenticio.

8. Conclusiones

- Se desarrollo un método analítico, que permite obtener una separación y cuantificación de aminoácidos mediante cromatografía de gases capilar y pretende ser un método alternativo para el análisis de aminoácidos referente a las demás técnicas (potenciometría, electroforesis capilar, HPLC); obteniendo resultados satisfactorios; es decir, minimizando el tiempo de reacción, tiempo de derivatización y al mismo tiempo reducir el costo en equipos así como en reactivos.
- Se optimizaron las condiciones de reacción para llevar a cabo la silinización de los aminoácidos usando BSTFA como agente derivatizante, obteniendo resultados reproducibles.
- Se establecieron las condiciones cromatográficas para llevar a cabo el análisis adecuado de los aminoácidos seleccionados mediante cromatografía de gases capilar.
- Se obtuvieron curvas de calibración con una buena tendencia lineal ($r^2 >> 0.99$) para cada uno de los aminoácidos seleccionados.
- Se identificaron y se determinaron el contenido de los distintos aminoácidos presentes en los suplementos alimenticios utilizando antraceno como estándar interno, por cromatografía de gases capilar a partir de las correspondientes curvas de calibración establecidas mediante el uso de antraceno como estándar interno.
- De acuerdo con la información reportada en el marbete de cada suplemento analizado. El suplemento AMINO ACIDS 1800 presenta un resultado muy similar al reportado en el marbete. Por otro lado en el suplemento AMINO 2000 el contenido encontrado, varía en forma notable respecto a cada uno de los aminoácidos que se seleccionaron para su estudio. Se logró cuantificar a los aminoácidos seleccionados, comprobando que el método analítico es reproducible en el presente trabajo.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] C. Rodier, R. Sternberg, F. Raulin, C. Vidal-Madjar, *J. Chromatogr. A* 915 (2001) 199.
- [2] D.H. Spackman, W.H. Steine, S. Moore, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1190.
- [3] S. Oguri, K. Yokoi, Y. Motohase, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 253.
- [4] I. Revelsky, Y. Yashin, T. Sobolevsky, A. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 497.
- [5] P. Dallakian, H. Budzikiewicz, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 195.
- [6] I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 291.
- [7] D. Fekkes, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 682 (1996) 3.
- [8] Igor G. Zenkevich Chemical Research institute 57-58.
- [9] Z. Shen, Z. Sun, L. Wu, K. Wu, S. Sun, Z. Huang, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 227.
- [10] J.T. Smith, *Electrophoresis* 20 (1999) 3078.
- [11] C.W. Gehrke, H. Nakamoto, R.W. Zumwalt, *J. Chromatogr.* 45 (1969) 24.
- [12] K.-L. Woo, D.-S. Lee, *J. Chromatogr. B* 665 (1995) 15.
- [13] M.W. Duncan, A. Poljak, *Anal. Chem.* 70 (1998) 890.
- [14] H.J. Chaves das Neves, A.M.P. Vasconcelos, *J. Chromatogr.* 392 (1987) 249.
- [15] Z. Hell, A. Cwik, Z. Finta, Z. Horvath, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 184 (2002) 191.
- [16] *Analytical Biochemistry*, David J Holme third edition, ED: Logman 1998.
- [17] Ahmed H. Hikal, *J. Chromatogr.* 18 (1988).
- [18] I. Starke, E. Kleinpeter, B. Kamm, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 380.
- [19] Husek P. *J Chromatogr. Gas chromatography of amino acids.* 1975 Aug 6; 113(2):139-230
- [20] Frank H, Nicholson GJ, Bayer E. *Chromatogr. Enantiomer labeling, a method for the quantitative analysis of amino acids.* 1978 Dec 21; 167: 187-96.
- [21] P. Simek, A. Heydova, A. Jegorov, *J. High Res. Chromatogr.* 17 (1994) 145.
- [22] R. Zumwalt, D. Roach, C.W. Gehrke, *J. Chromatogr.* 53 (1970) 171.
- [23] Molnár-Perl, I., *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 181-195.
- [24] R. Piccaglia, G. C. Galletti, *J. Sci. Food Agric.*, 45 (1988) 203-213.
- [25] M. A. Andrews, *Carbohydr. Res.*, 194 (1989) 1-19.
- [26] S. Tisza, I. Molnár-Perl, *J. High Resolut. Chromatogr.* 165 (1994) 165-174.
- [27] Zs. F. Katona *Chromatography Supplement*, Vol 51, 2000.
- [28] Robert K. Murria, MMD, PHD, *Bioquímica Harper*, Decimaquinta Edición, pág. 76.
- [29] Leninger L. Albert, *Bioquímica*, Segunda Edición, Ed. Omega, Barcelona, 1990.

- [30] Peña Díaz Antonio et All, Bioquímica, Segunda Edición, Ed. Limusa, México, 19990.
- [31] Pato Pino, Bioquímica II, Ed. Alfa, Buenos Aires, 2008.
- [32] D. R. Knapp, Handbook of analytical derivation reactions, 1979, Wiley, New York.
- [33] K. Blau, G. S. King, in Handbook of derivatives for chromatography (K Blue, J. Halket eds), 1993, Heyden, London
- [34] Skoog, D.A., West, D.M., Holler F.J. — Fundamentos de Química Analítica” Ed. Reverté, S.A. (Barcelona) 1997.
- [35] Rubinson, J.F., Rubinson, K.A., —Química analítica contemporánea“ Pearson educación. 2000.
- [36] Pecsok, R.L., Shields, L.D. "Métodos modernos de análisis químico" Ed. LIMUSA, S.A. 1983.
- [37] Rubinson, K.A., Rubinson, J.F. "Análisis instrumental" Pearson educación, S.A. 2001.
- [38] Skoog, D.A., Leary, J.J. "Análisis instrumental" McGraw-Hill (Madrid) 1994.
- [39] Matissek, Schnepel, Steiner, —Análisis de los alimentos. Fundamentos, métodos y aplicaciones“. Ed. Acribia S.A. 1992.
- [40] Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H., —Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson“2ª ed. 1996.
- [41] Robards, K., Hadad, P.R., Jacksin, P.E., —Principles and practice of modern chromatographic methods“ Academic press (London)1994
- [42] Valcarcel Cases M. "Técnicas Analíticas de Separación" Ed. Reverté. S. A. Barcelona España 1988.
- [43] Carey F.A. and Sundberg R.J. *Advances in Organic Chemistry*. Plenum Press: New York London, 1977.
- [44] <http://www.uib.es/depart/dqu/dquo/pau/Cromatograf%92a/chrom10/chrom/GC/concept/main.html>
- [45] <http://www.redhucyt.oas.org/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.html>
- [46] <http://www.depapquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPpran2.html>
- [47] <http://ntri.tamuk.edu/hplc/mtamez.html>
- [48] <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/ms-intro.html>
- [49] http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Cromatografo_de_gases_diagrama.org
- [50] http://www.dacb.ujat.mx/material_academico/descarga/instrum_cromatografica.ppt -
- [51] www1.uprh.edu/jorcas/paginas_laboratorio/info_adicional_lab/estan_intergc2.pdf -

ANEXO A.

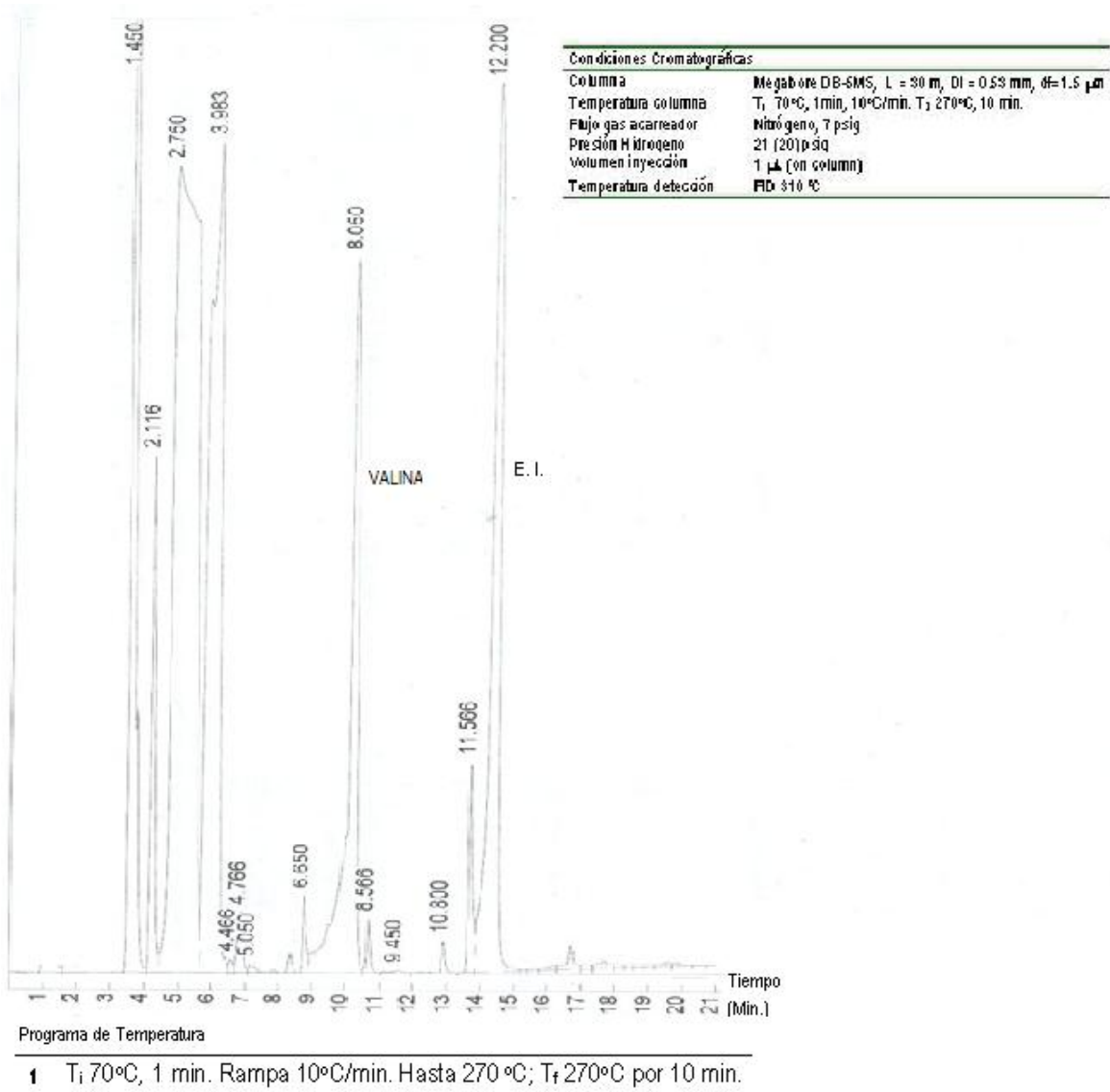


Figura A. 1- Cromatograma, prueba 1 para definir condiciones cromatográficas.

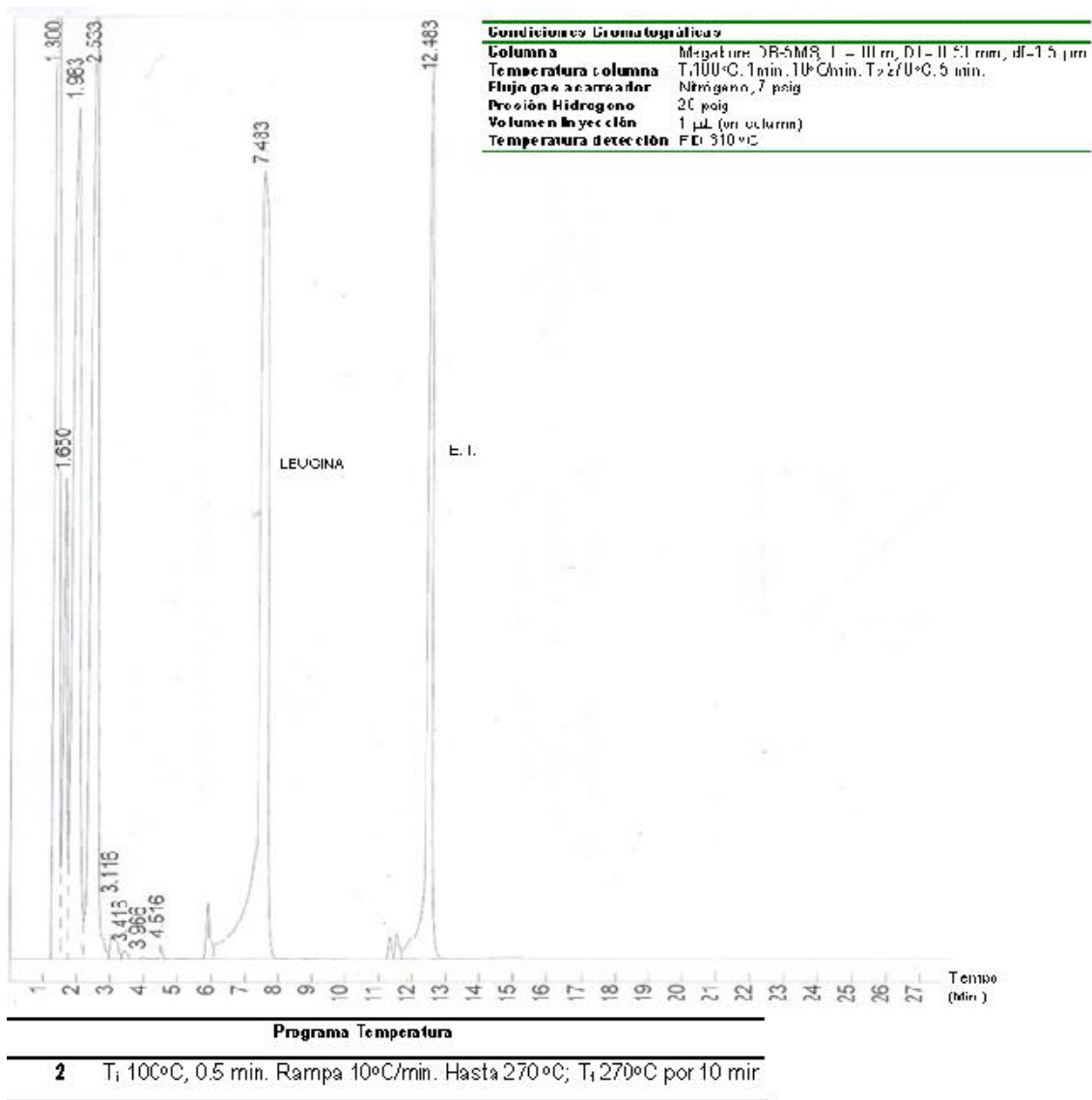


Figura A. 2- Cromatograma, prueba 2 para definir condiciones cromatográficas.

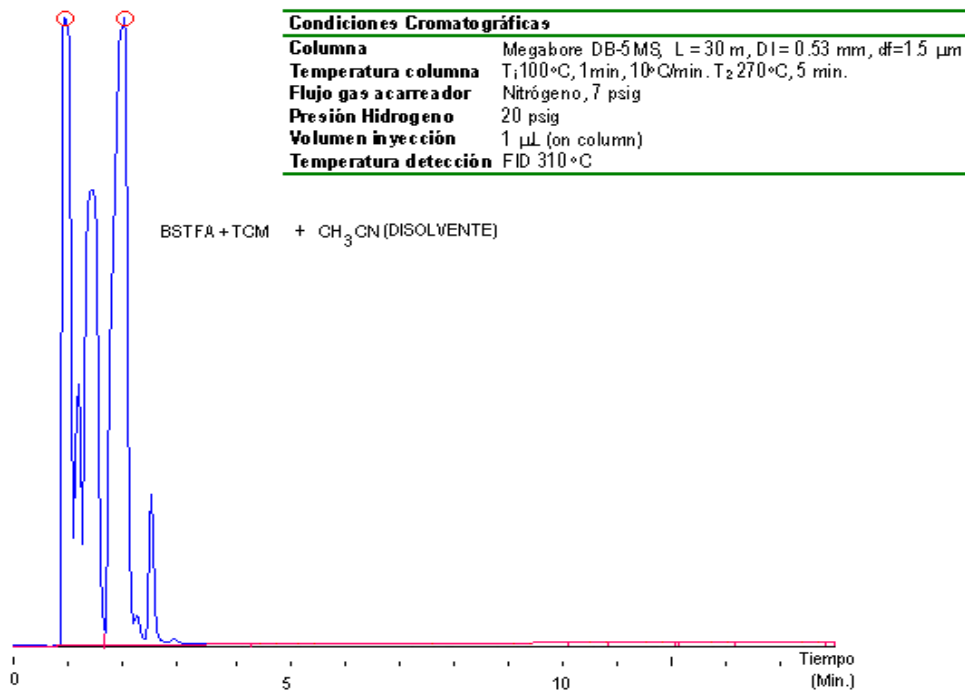


Figura A.3- Cromatograma del Blanco (derivatizante + acetonitrilo).

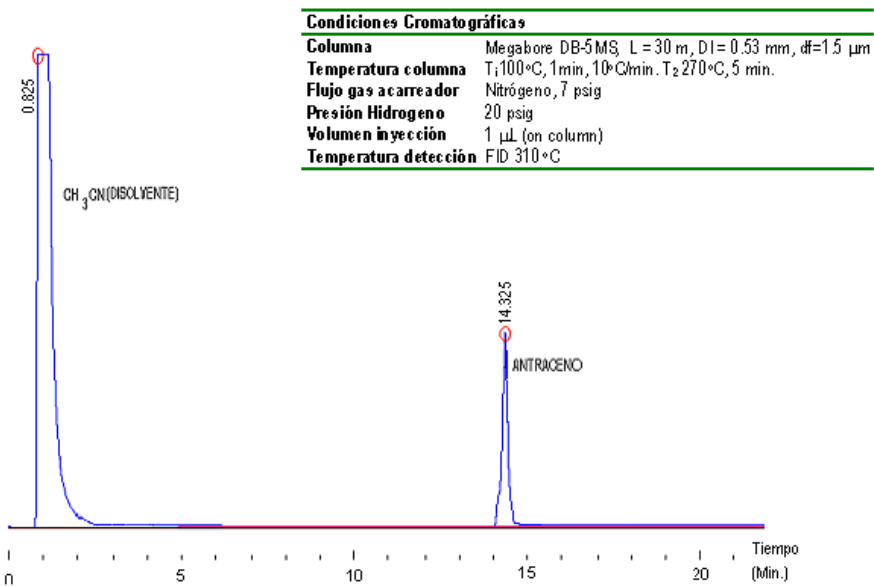


Figura A.4- Cromatograma del Blanco; correspondiente al antraceno (estándar interno) con Acetonitrilo, sin derivatización.

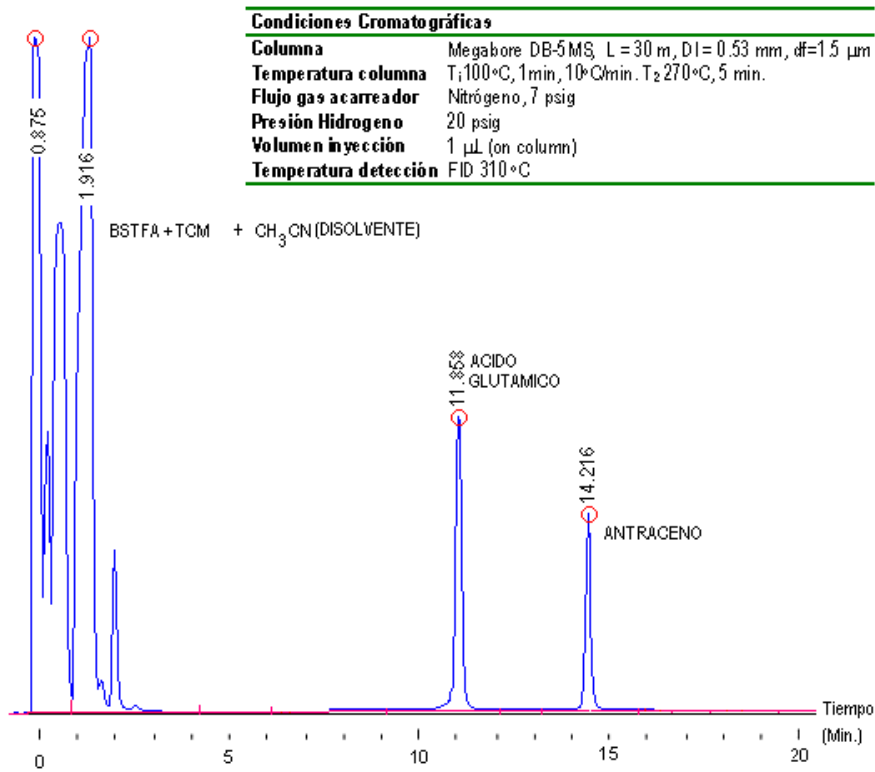


Figura A.5- Cromatograma acido Glutámico en su forma derivatizada trimetilsilil.

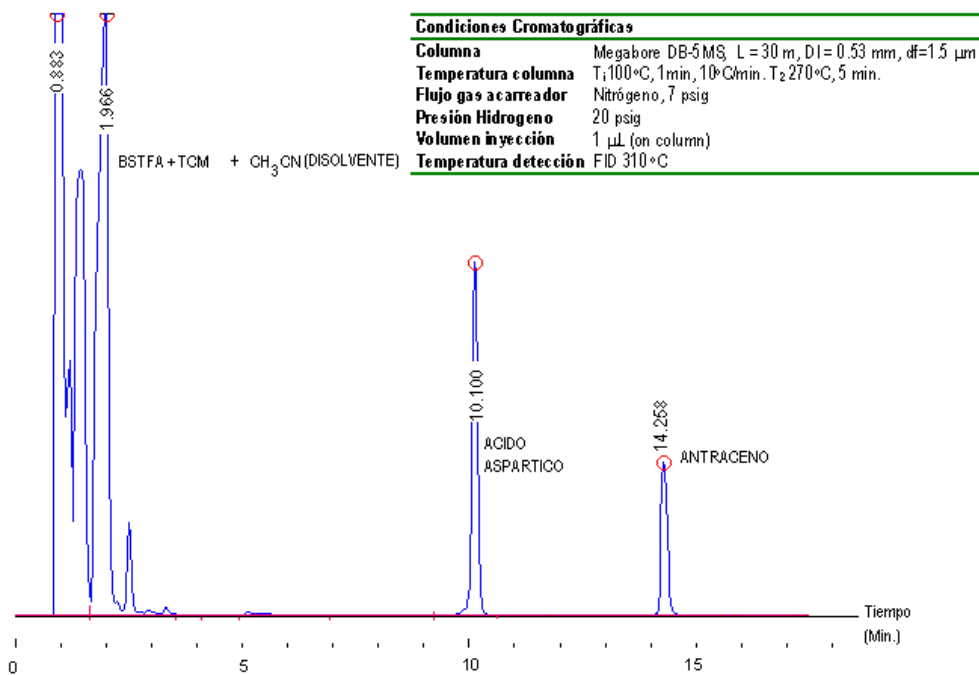


Figura A.6- Cromatograma acido aspártico en su forma derivada trimetilsilil.

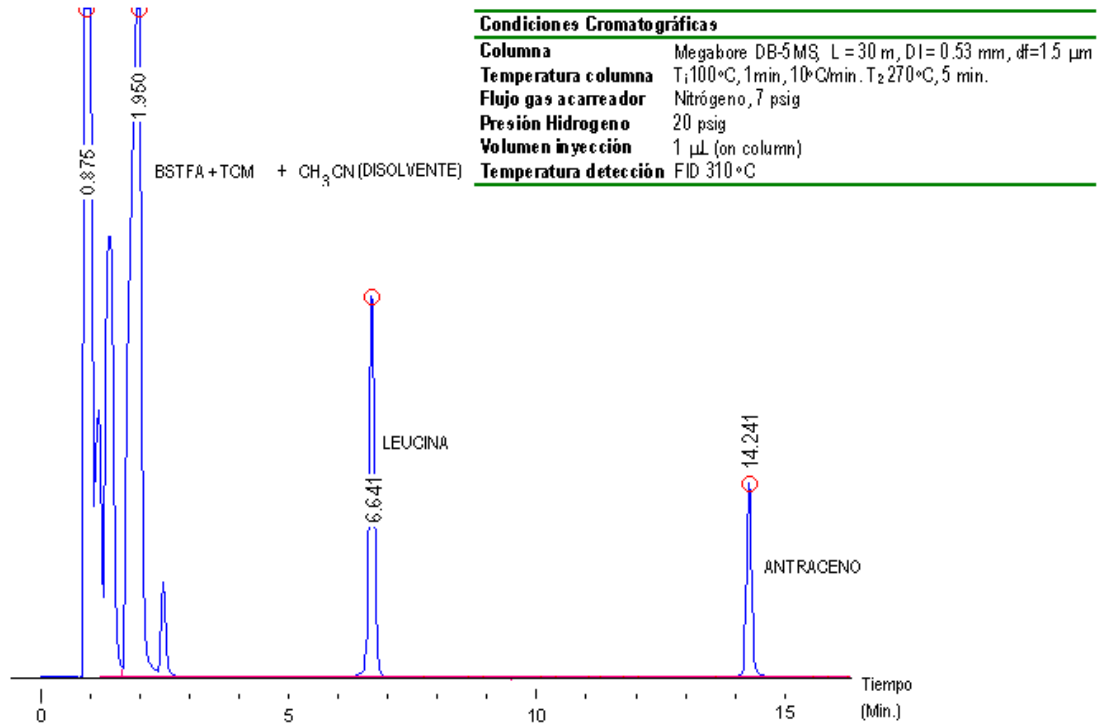


Figura A.7- Cromatograma leucina en su forma derivatizada trimetilsilil.

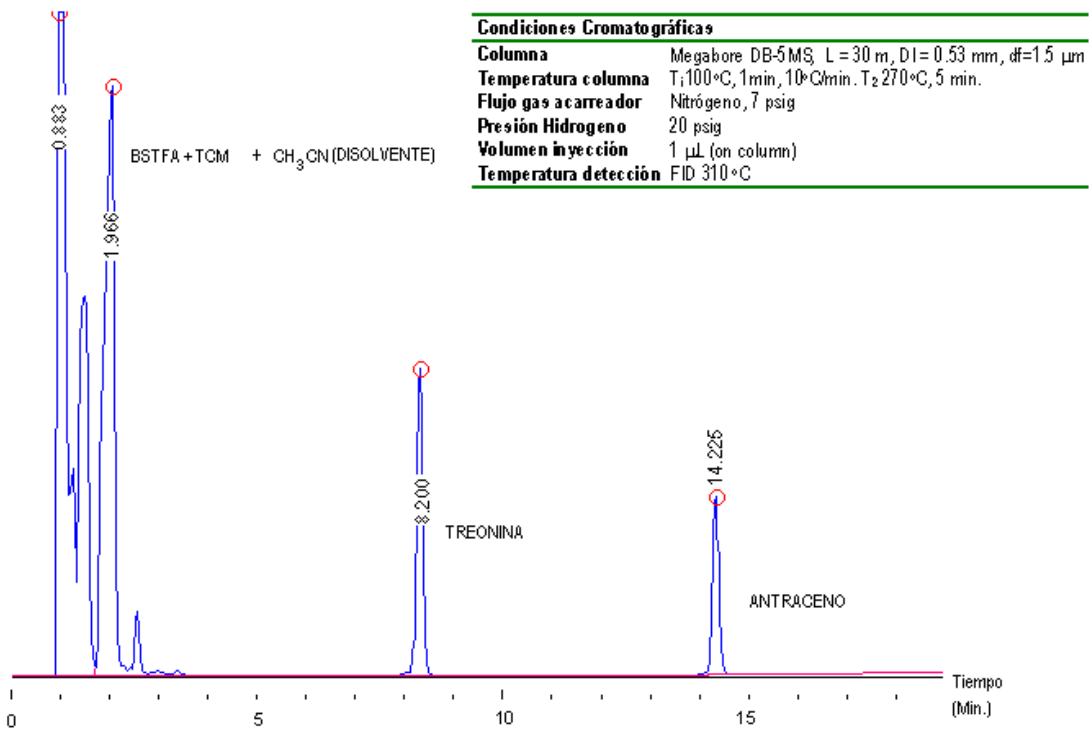


Figura A.8- Cromatograma treonina en su forma derivatizada trimetilsilil.

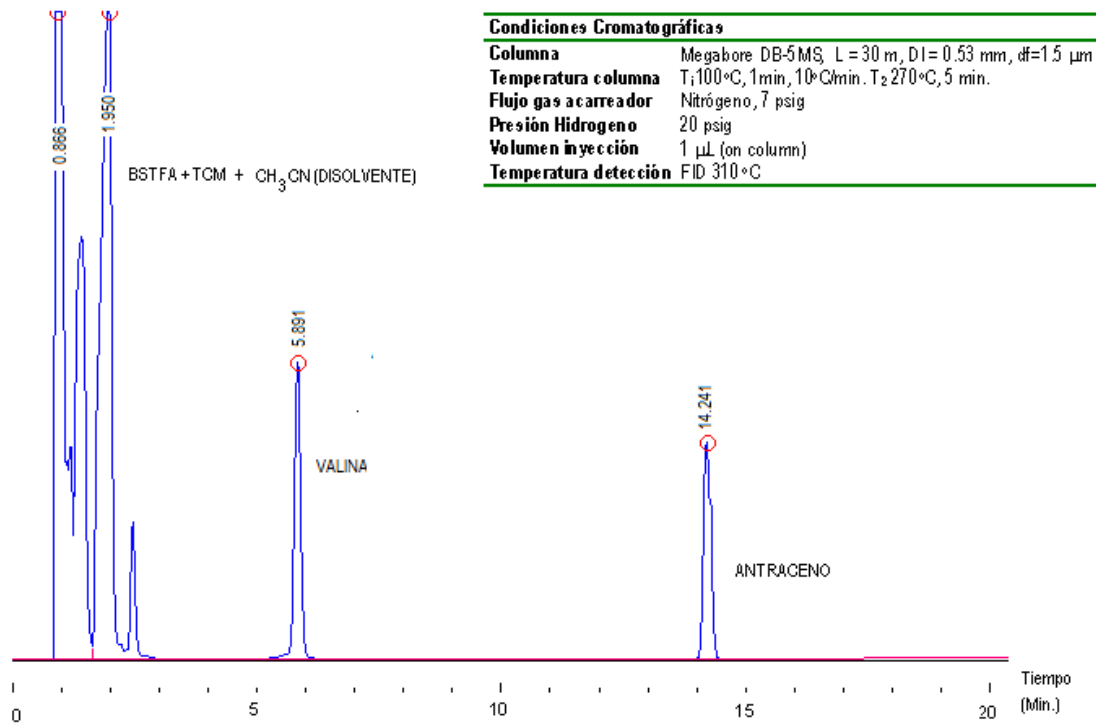
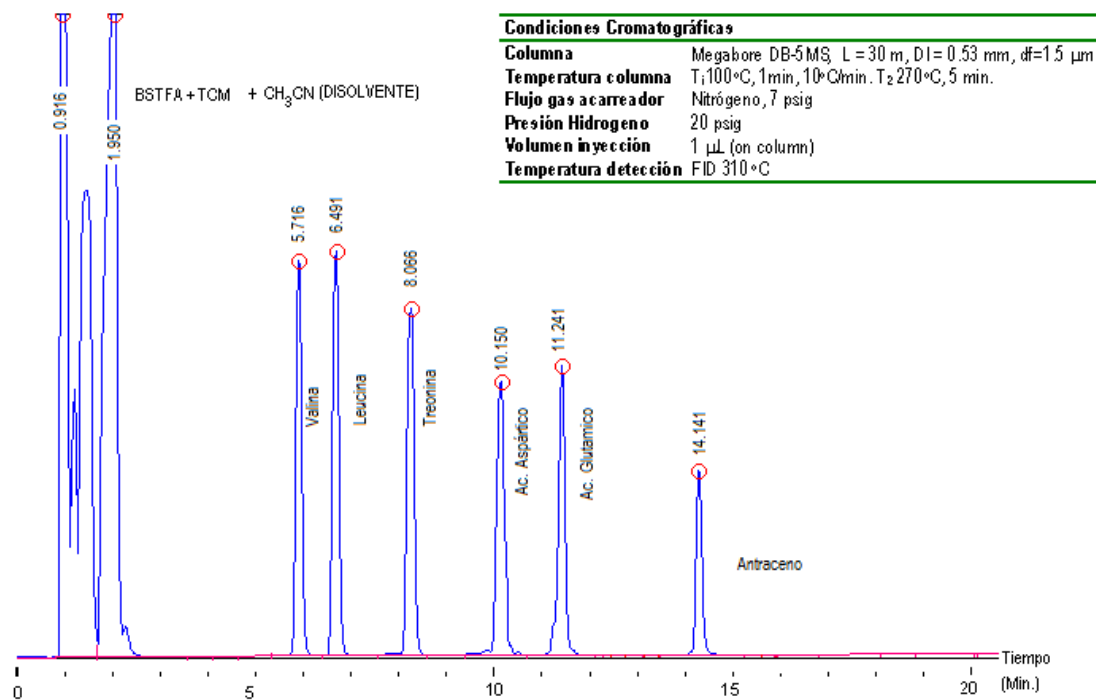


Figura A. 9-Cromatograma valina en su forma derivatizada trimetilsilil.



Figura

A. 10-Cromatograma de la separación de los derivados trimetilsilil con respecto al estándar interno.

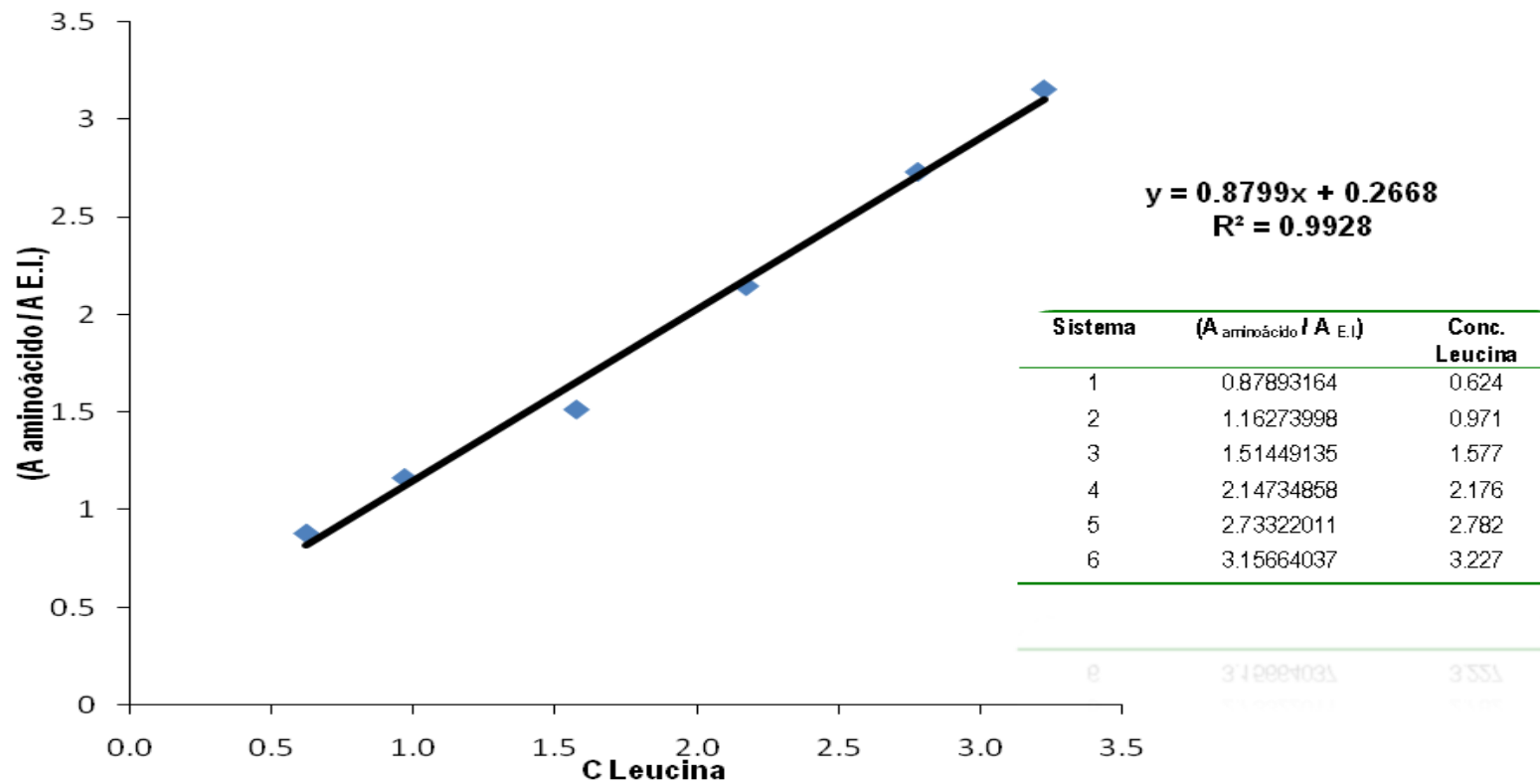


Figura A-11 Curva de calibração de Leucina.

Tablas (A-1 a A-3). Memorias de Calculo para trazar la curva de calibración de Leucina.

Tabla A-1. Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de leucina.

		t_R	Área ₁	t_R	Área ₂	t_R	Área ₃
Sistema 1	Leucina	6.583	3508.96	6.600	7582.00	6.583	4768.68
	Antraceno	13.183	5115.98	14.241	7600.63	14.241	5001.96
Sistema 2	Leucina	6.591	7582.00	6.600	10815.28	6.583	6525.28
	Antraceno	14.241	7600.63	14.241	8223.29	14.241	5115.98
Sistema 3	Leucina	6.650	12378.28	6.650	12378.28	6.716	13382.90
	Antraceno	14.241	8021.57	14.241	8348.55	14.250	8818.12
Sistema 4	Leucina	5.900	5694.32	6.691	15705.10	5.900	5694.32
	Antraceno	14.241	2734.98	14.258	6084.20	14.241	3201.35
Sistema 5	Leucina	6.691	15692.96	6.591	17885.82	6.675	19941.02
	Antraceno	14.258	5862.20	14.250	6807.06	14.250	6887.74
Sistema 6	Leucina	6.608	22336.98	6.650	14286.88	6.591	22361.63
	Antraceno	14.233	7575.90	14.250	4321.57	14.250	6954.21

Tabla A-2. Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-1.

	$(A_1 / A_{E.I.})$	$(A_2 / A_{E.I.})$	$(A_3 / A_{E.I.})$
Sistema 1	0.6858	0.9975	0.9533
Sistema 2	0.9975	1.2152	1.2754
Sistema 3	1.5431	1.4826	1.5176
Sistema 4	2.0820	2.5812	1.7787
Sistema 5	2.6769	2.6275	2.8951
Sistema 6	2.9484	3.3059	3.2155

Tabla A-3. Datos para trazar la curva de calibración de leucina relación de áreas y concentración de leucina.

Sistema	$(A_{\text{aminoácido}} / A_{E.I.})$	Conc. Leucina
1	0.8789	0.624
2	1.1627	0.971
3	1.5144	1.577
4	2.1473	2.176
5	2.7332	2.782
6	3.1566	3.227

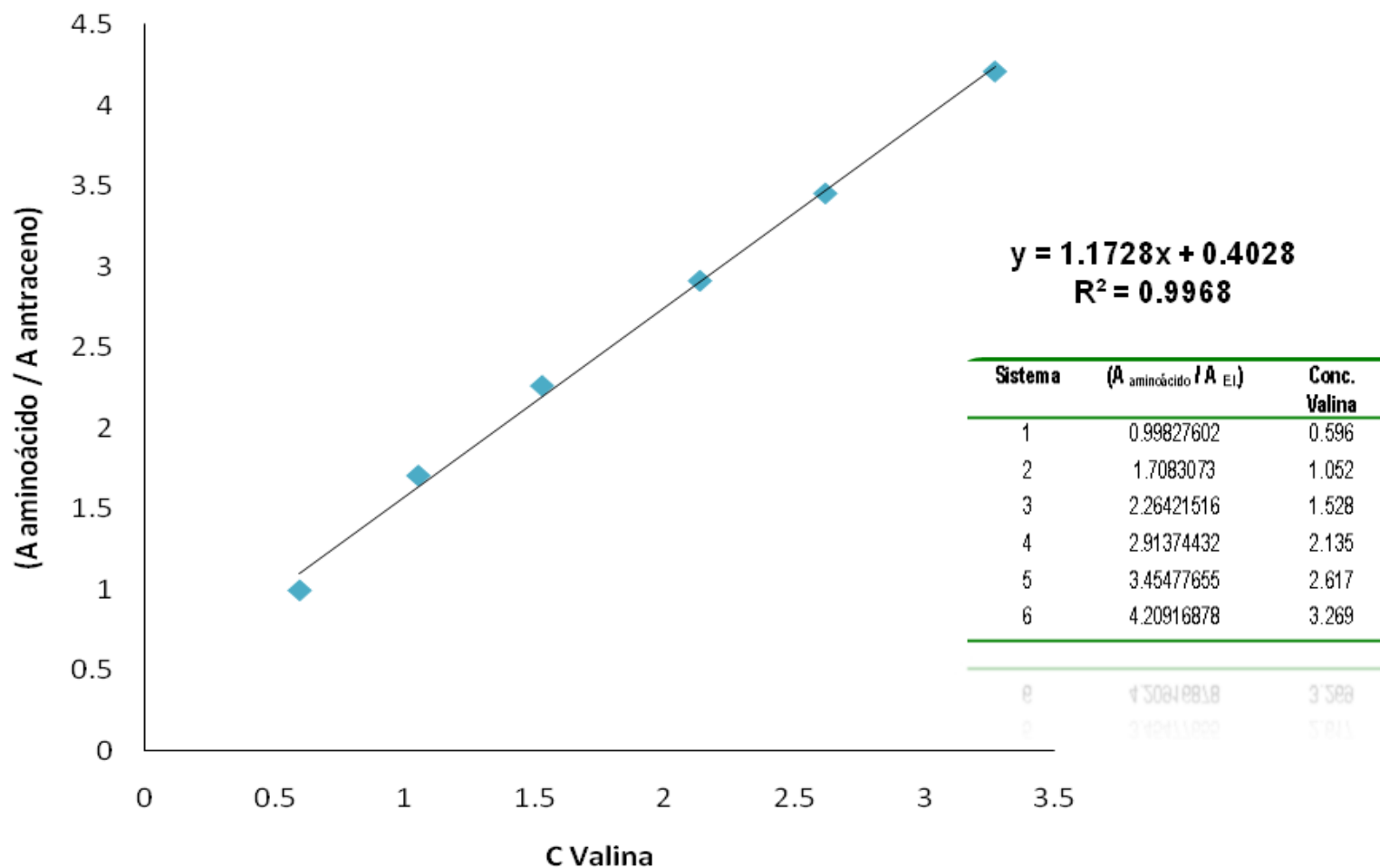


Figura A-12 Curva de calibración de Valina

Tablas (A-4 a A-6). Memorias de Calculo para trazar la curva de calibración de Valina.

Tabla A-4. Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de valina.

		t_R	Área ₁	t_R	Área ₂	t_R	Área ₃
Sistema 1	Valina	5.783	4162.56	5.833	4486.25	5.825	5191.13
	Antraceno	14.166	3914.84	14.200	4029.64	14.158	6344.28
Sistema 2	Valina	5.991	5899.56	5.866	5561.34	5.883	6204.02
	Antraceno	14.283	3049.20	14.258	3681.54	14.283	3693.89
Sistema 3	Valina	5.891	6394.52	5.825	6779.32	5.883	6346.91
	Antraceno	14.216	2663.25	14.208	2861.18	14.241	3138.59
Sistema 4	Valina	5.791	8464.40	5.858	8047.94	5.858	8546.36
	Antraceno	14.216	2737.57	14.250	2671.99	14.258	3240.53
Sistema 5	Valina	5.891	14764.51	5.841	11065.05	5.891	9294.52
	Antraceno	14.283	4061.81	14.250	3415.709	14.216	2663.25
Sistema 6	Valina	6.041	11938.12	5.925	12234.58	5.833	12422.71
	Antraceno	14.266	2706.33	14.225	3013.86	14.200	2988.45

Tabla A-5. Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-4.

	$(A_1 / A_{E.I.})$	$(A_2 / A_{E.I.})$	$(A_3 / A_{E.I.})$
Sistema 1	1.0632	1.1133	0.8182
Sistema 2	1.9347	1.5106	1.6795
Sistema 3	2.4010	2.3694	2.0222
Sistema 4	3.0919	3.0119	2.6373
Sistema 5	3.6349	3.2394	3.4899
Sistema 6	4.4111	4.0594	4.1569

Tabla A-6. Datos para trazar la curva de calibración de valina; relación de áreas y concentración de valina

Sistema	$(A_{\text{aminoácido}} / A_{E.I.})$	Conc. Valina
1	0.9982	0.596
2	1.7083	1.052
3	2.2642	1.528
4	2.9137	2.135
5	3.4547	2.617
6	4.2091	3.269

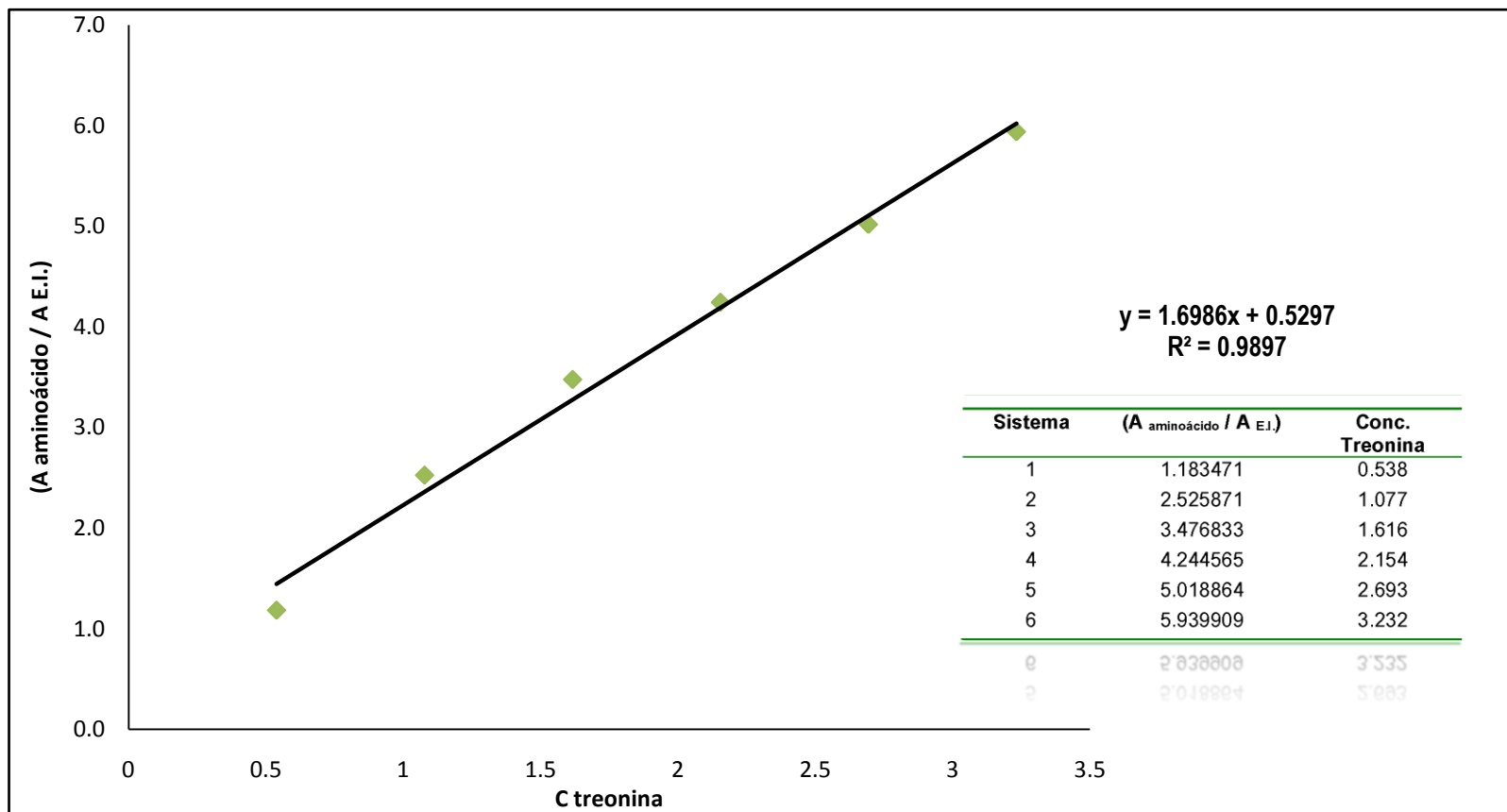


Figura A-13 Curva de calibración Treonina.

Tablas (A-7 a A-9). Memorias de Calculo para trazar la curva de calibración de Treonina.

Tabla A-7. Áreas obtenidas de los cromatogramas para realizar la curva de calibración de treonina

		t_R	Área ₁	t_R	Área ₂	t_R	Área ₃
Sistema	Treonina	8.133	3832.88	8.175	5114.40	8.166	4962.12
	Antraceno	14.166	3914.84	14.200	4029.64	14.208	3810.71
Sistema	Treonina	8.308	8012.18	8.216	9390.16	8.225	9001.72
	Antraceno	14.283	3040.20	14.258	3681.54	14.283	3763.89
Sistema	Treonina	8.225	9469.50	8.183	10157.33	8.241	10435.33
	Antraceno	14.216	2663.25	14.208	2861.18	14.241	3138.59
Sistema	Treonina	8.133	13110.76	8.166	11900.23	8.175	11301.62
	Antraceno	14.216	2737.57	14.25	2671.99	14.258	3237.53
Sistema	Treonina	8.216	18586.89	8.166	18454.01	8.166	18898.26
	Antraceno	14.283	4061.81	14.25	3415.70	14.258	3721.676
Sistema	Treonina	8.300	17086.09	8.225	17236.73	8.158	17294.83
	Antraceno	14.266	2706.33	14.225	3013.86	14.2	2988.4547

Tabla A-8. Relación de áreas de cada sistema presente en la tabla A-7

	$(A_1 / A_{E.I.})$	$(A_2 / A_{E.I.})$	$(A_3 / A_{E.I.})$
Sistema	0.9790	1.2691	1.3021
Sistema	2.6354	2.5506	2.3915
Sistema	3.5556	3.5500	3.3248
Sistema	4.7891	4.4536	3.4908
Sistema	4.5760	5.4026	5.0778
Sistema	6.3133	5.7191	5.7872

Tabla A-9. Datos para trazar la curva de calibración de valina; relación de áreas y concentración de treonina.

Sistema	$(A_{\text{aminoácido}} / A_{E.I.})$	Conc. Treonina
1	1.1834	0.538
2	2.5258	1.077
3	3.4768	1.616
4	4.2445	2.154
5	5.0188	2.693
6	5.9399	3.232

Resultados correspondientes al suplemento alimenticio AMINO 2000.

Tabla A-10. Resultados Muestra A, AMINO 2000.

Muestra A		Área	Área	Área del
Aminoácido	T _r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.850	6780.6435	7325.7230	0.9256
Leucina	6.641	13417.307	7325.7230	1.8315
Treonina	8.208	21167.1728	7325.7230	2.8894
Acido Glutámico	12.516	13164.095	7325.7230	1.7970

Tabla A-11. Resultados Muestra B, AMINO 2000.

Muestra B		Área	Área	Área del
Aminoácido	T _r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.176	1595.5405	1348.003	1.1836
Leucina	6.721	3488.9320	1348.003	2.5882
Treonina	9.356	2781.2945	1348.003	2.0633
Acido Glutámico	11.675	2455.1875	1348.003	1.8214

Tabla A-12. Resultados Muestra C, AMINO 2000.

Muestra C		Área	Área	Área del
Aminoácido	T _r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.066	3564.5023	3293.1295	1.0824
Leucina	6.591	2384.1838	3293.1295	0.7240
Treonina	9.356	6550.5885	3293.1295	1.9892
Acido Glutámico	11.425	5302.3440	3293.1295	1.6101

Resultados correspondientes al suplemento alimenticio AMINO ACIDS 1800.

Tabla A-13. Resultados de la muestra comercial AMINO 1800.

Muestra A		Área	Área de	Área del
Aminoácido	T_r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.166	28078.102	3849.864	0.9021
Leucina	6.983	29537.0495	3766.7	0.9490

Muestra B		Área	Área de	Área del
Aminoácido	T_r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.200	35494.098	3528.4900	0.9978
Leucina	6.000	28822.166	3272.646	0.8103

Muestra C		Área	Área de	Área del
Aminoácido	T_r (min.)	Problema	Antraceno	Problema/Área de Antraceno
Valina	5.166	36880.0625	4795.5000	1.2052
Leucina	6.983	36447.905	4694.4120	1.1911

ANEXO B.

Propiedades fisicoquímicas de los reactivos utilizados en la experimentación.

B-1. Acetonitrilo

Fichas Internacionales de Seguridad Química		
ACETONITRILLO		ICSC: 0088
D A T O S I M P O R T A N T E	<p>ESTADO FISICO; ASPECTO Líquido incoloro, de olor característico.</p> <p>PELIGROS FISICOS El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible ignición en punto distante. El vapor se mezcla bien con el aire, formándose fácilmente mezclas explosivas.</p> <p>PELIGROS QUIMICOS Por combustión, formación de humos tóxicos de cianuro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno. La sustancia se descompone en contacto con ácidos, agua y vapor de agua produciendo humos tóxicos y vapor inflamable. Reacciona con oxidantes fuertes originando peligro de incendio y explosión. Ataca a algunas formas de plástico, caucho y recubrimientos.</p>	<p>LIMITES DE EXPOSICION TLV (como TWA): 40 ppm; 67 mg/m³ (ACG 1993-1994). TLV (como STEL): 60 ppm; 101 mg/m³ (ACGIH 1993-1994).</p> <p>VIAS DE EXPOSICION La sustancia se puede absorber por inhalación del vapor, a través de la piel y por ingestión.</p>
	PROPIEDADES FISICAS	Punto de ebullición: 81°C Punto de fusión: -45°C Densidad relativa (agua = 1): 0.8 Solubilidad en agua: Miscible Presión de vapor, kPa a 20°C: 9.60 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 1.4

B-2. Cloruro de Metileno.

Fichas Internacionales de Seguridad Química

DICLOROMETANO

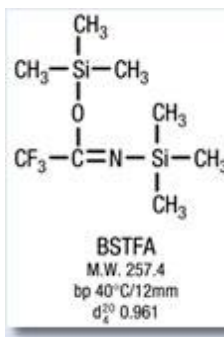
ICSC: 0058

D A T O S I M P O R T A N T E	ESTADO FISICO; ASPECTO Líquido incoloro, de olor característico.	LIMITES DE EXPOSICION TLV (como TWA): 50 ppm A2; 174 mg/m ³ A (ACGIH 1993-1994).
	PELIGROS FISICOS El vapor es más denso que el aire.	VIAS DE EXPOSICION La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión
PROPIEDADES FISICAS	PELIGROS QUIMICOS En contacto con superficies calientes o con llamas esta sustancia se descompone, formando humos tóxicos y corrosivos.	
	Reacciona violentamente con metales tales como aluminio, magnesio, sodio, potasio y litio, bases y oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión. Ataca a algunas formas de plástico, caucho recubrimientos.	Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.9 Temperatura de autoignición: 640°C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 14-25% Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 1.25

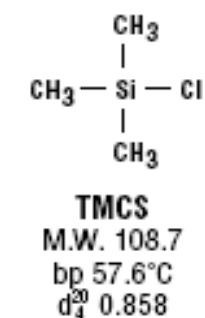
B-3 Antraceno.

Fichas Internacionales de Seguridad Química		
ANTRACENO		ICSC: 0825
D A T O S I M P O R T A N T E S	ESTADO FISICO; ASPECTO	VIAS DE EXPOSICION
	<p>Cristales blancos o copos.</p> <p>PELIGROS FISICOS</p> <p>Es posible la explosión de polvo si se encuentra mezclada con el aire en forma pulverulenta o granular.</p> <p>PELIGROS QUIMICOS</p> <p>La sustancia se descompone al calentarse intensamente, en contacto con luz solar, bajo la influencia de oxidantes fuertes, produciendo humos acres y tóxicos, causando peligro de incendio o explosión</p>	<p>La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión.</p>
PROPIEDADES FISICAS	<p>Punto de ebullición: 342°C</p> <p>Punto de fusión: 218°C</p> <p>Densidad relativa (agua = 1): 1.25</p> <p>Solubilidad en agua: ninguna</p> <p>Densidad relativa de vapor (aire = 1): 6.1</p> <p>Masa molecular: 178.25</p>	<p>Punto de inflamación: 121°C</p> <p>Temperatura de autoignición: 538°C</p> <p>Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 0.6-?</p> <p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 4.5 (calculado)</p>

B – 4 BSTFA + 1% TMCS (Regis Technologies Inc USA).



BSTFA	
Nombre químico:	N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoruro acetamida
Nombre IUPAC:	2,2,2-trifluoro-N-trimetilsilil-1-trimethylsilyloxy-ethanimine
Fórmula química:	C ₈ H ₁₈ F ₃ N O Si ₂
Peso Molecular:	247.42
Punto de ebullición:	142 °C
Densidad	0.961 a 25°C



TMCS	
Nombre químico:	Trimetilclorosilano
Nombre IUPAC:	cloro-trimetil-silano
Fórmula química:	C ₃ H ₉ Cl Si
Peso Molecular:	108.7
Punto de ebullición:	57.6 °C
Densidad	0.858

B-5 Suplemento Alimenticio AMINO 2000.

Contenido de aminoácidos correspondiente al marbete de la muestra comercial (AMINO 2000).



Aminoácido	mg Reportados por tableta
Ácido glutámico	279.167
l-lisina	208.33
L-Leucina	204.167
Ácido Aspártico	185.833
L-Treonina	95.000
L-Isoleucina	90.833
L-Valina	84.1667
L-Serina	84.1667
L-Prolina	71.6667
L-Fenilalanina	63.333
L-Tirosina	56.25
L-Arginina	50.000
L-Cistina	48.333
L-Metionina	41.25
L-Histidina	37.5
L-Glicina	36.666
L-Carnitina	10.000

B-6 Suplemento alimenticio AMINO 1800.

Contenido de aminoácidos correspondiente al marbete de la muestra comercial (AMINO ACIDS 1800).



Aminoácido	mg (c/ 100grs) Reportados
L-Leucina	10 089
L-Isoleucina	7 062
L-Valina	3 026