



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Interno

<b>Apellidos, nombre</b>	Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de Alimentos
<b>Centro</b>	ETSIAMN - Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

La cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son dos técnicas de separación de analitos que permiten identificar y cuantificar un gran número de compuestos. Para la cuantificación de compuestos, existen diversas técnicas como la normalización de áreas, el método de patrón externo o el método de patrón interno. En este objeto de aprendizaje se va a describir cómo llevar a cabo la cuantificación de compuestos por el método de patrón interno.

## 2 Introducción

En las técnicas de cromatografía de gases y HPLC, cuando se realiza un análisis, se obtiene un cromatograma. Un cromatograma es la representación gráfica de la señal que da el detector al paso de los distintos analitos en función del tiempo. En un cromatograma se observan una serie de picos que se corresponden con los analitos detectados. Cada pico sale a un tiempo de retención ( $t_R$ ) determinado y tiene una altura y área determinadas. El  $t_R$  es el parámetro que se emplea para llevar a cabo el análisis cualitativo. Para hacer un análisis cuantitativo se puede utilizar la altura del pico o el área, siendo éste último el más empleado por su mayor precisión.

## 3 Objetivos

Los objetivos de este artículo son que el alumno sea capaz de:

- Diseñar el procedimiento a seguir para cuantificar compuestos por cromatografía en columna mediante el método del patrón interno.
- Cuantificar un compuesto presente en una muestra a partir de los cromatogramas de los patrones y de la muestra.

## 4 Desarrollo

El análisis de alimentos y el control de calidad requieren metodologías que sean exactas, precisas, muy sensibles y con bajos límites de detección. Por ejemplo, en el campo de control oficial de alimentos, las concentraciones de algunos compuestos tóxicos que es necesario determinar son de magnitudes muy bajas, por lo que se requieren potentes técnicas de análisis que permitan la identificación y cuantificación de estos compuestos. En este sentido la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución son dos de las técnicas más adecuadas. Debido a la importancia de estos métodos de análisis, es necesario saber diseñar procedimientos adecuados para la cuantificación de compuestos analizados por ambas técnicas.



## 4.1 Preparación de patrones y obtención de los cromatogramas

Cuando se quiere cuantificar un compuesto presente en una muestra por el método del patrón interno, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Preparar una serie de disoluciones de concentraciones crecientes, del patrón correspondiente al compuesto a cuantificar. El intervalo de concentraciones ha de ser similar a la concentración del analito en la muestra problema.
2. Añadir a cada uno de los patrones y a la muestra una misma cantidad o concentración de patrón interno. El patrón interno ha de ser un compuesto de naturaleza similar al analito a determinar, pero que no esté presente en la muestra. Por ejemplo, en un análisis de azúcares en fresas un patrón interno podría ser lactosa, ya que se trata de un azúcar, pero no está presente en las fresas.
3. Inyectar el mismo volumen en el cromatógrafo de cada una de las disoluciones patrón que contienen el patrón interno, así como del extracto de la muestra que también contiene el patrón interno. De esta forma tendremos los distintos cromatogramas de los patrones (un cromatograma para cada disolución patrón) y el cromatograma de la muestra.

**Ejemplo 1:** Si se quiere determinar un analito cuya concentración en el extracto de la muestra, se espera que esté comprendida en un margen de 350 a 550 mg/L, se podrían preparar e inyectar en el cromatógrafo 4 disoluciones patrón que además contuvieran una misma concentración de patrón interno (p.i.), con las siguientes concentraciones:

- Patrón 1: 300 mg/L analito + 350 mg/L p.i.
- Patrón 2: 400 mg/L analito + 350 mg/L p.i.
- Patrón 3: 500 mg/L analito + 350 mg/L p.i.
- Patrón 4: 600 mg/L analito + 350 mg/L p.i.

A la muestra se le adicionaría patrón interno, de forma que la concentración de patrón interno en el extracto de la muestra fuera la misma que en las disoluciones patrón y se inyectaría en el cromatógrafo. Así, la muestra tendría una concentración desconocida de analito y 350 mg/L de patrón interno:

- Muestra:  $x$  mg/L analito + 350 mg/L p.i.

Los cromatogramas obtenidos al inyectar cada una de las disoluciones patrón y la muestra serían los que se muestran en las Figuras 1 a 5.

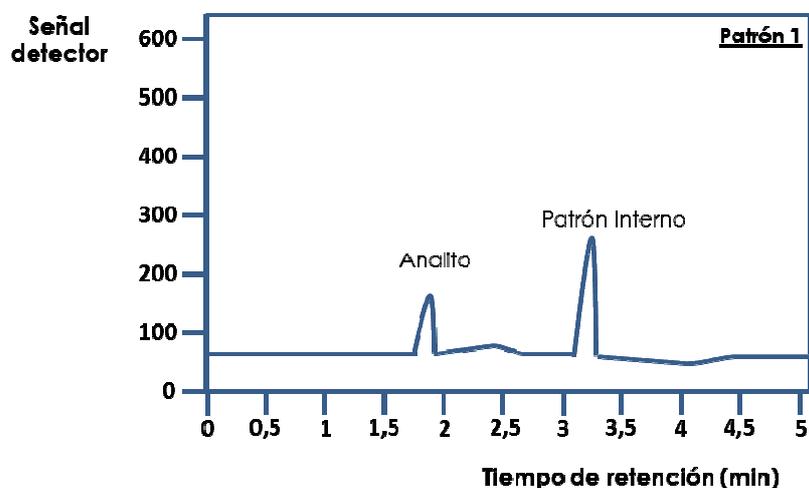


Figura 1. Cromatograma de la disolución patrón 1 (300 mg/L analito + 350 mg/L p.i.).

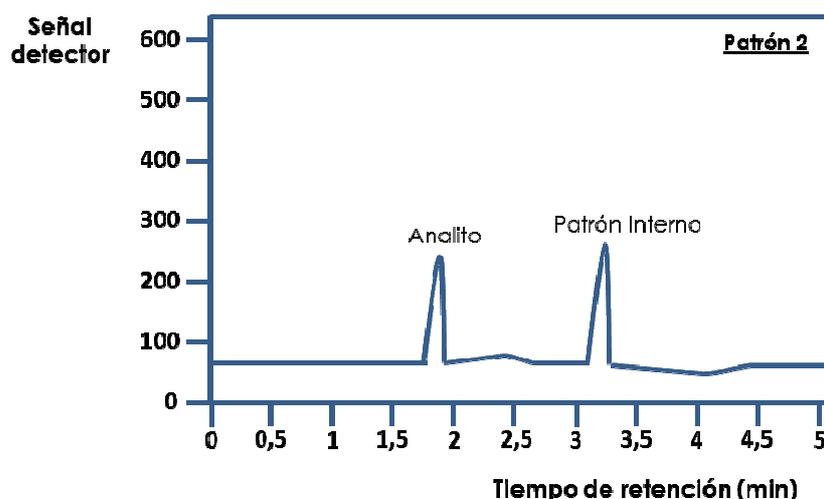


Figura 2. Cromatograma de la disolución patrón 2 (400 mg/L analito + 350 mg/L p.i.).

En el cromatograma de cada disolución patrón y en el cromatograma de la muestra saldrá el pico correspondiente al analito y el pico correspondiente al patrón interno. En la Figura 5, donde se muestra el cromatograma de la muestra, además del pico del analito y del pico del p.i., se observan una serie de picos que corresponderían a otros compuestos presentes en la muestra distintos del analito que estamos cuantificando.

Tal y como se muestra en las Figuras 1-5, el  $t_R$  del pico del analito será el mismo en todos los cromatogramas; el  $t_R$  del pico del patrón interno será distinto del  $t_R$  del analito y se mantendrá constante en todos los cromatogramas. El área de los picos será diferente dependiendo de la concentración de analito; por tanto, el área del pico de analito irá aumentando conforme aumenta la concentración en los



patrones (área del patrón 1 < área patrón 2 < área patrón 3 < área patrón 4). Dado que la concentración de patrón interno se mantiene constante en todas las disoluciones patrón y en la muestra, el área del p.i. debería ser similar en todos los cromatogramas.

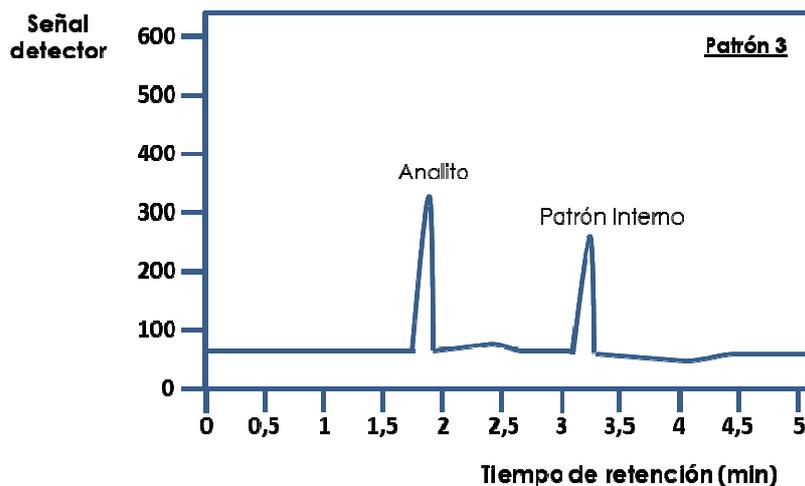


Figura 3. Cromatograma de la disolución patrón 3 (500 mg/L analito + 350 mg/L p.i.).

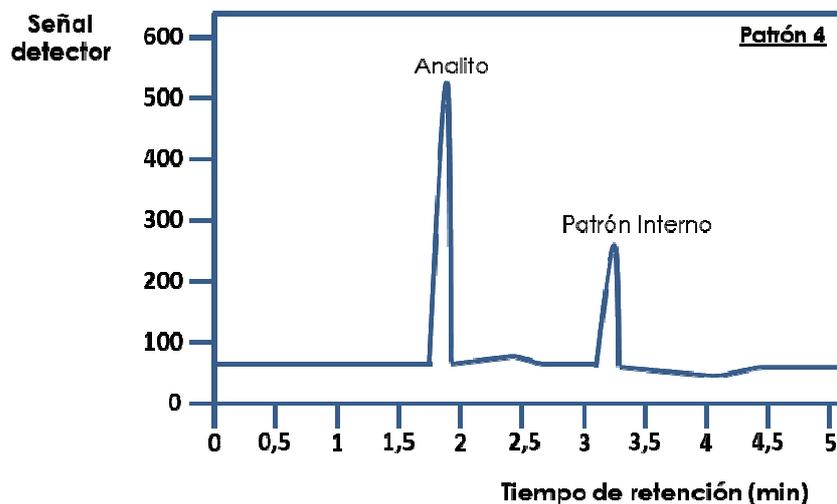


Figura 4. Cromatograma de la disolución patrón 4 (600 mg/L analito + 350 mg/L p.i.).

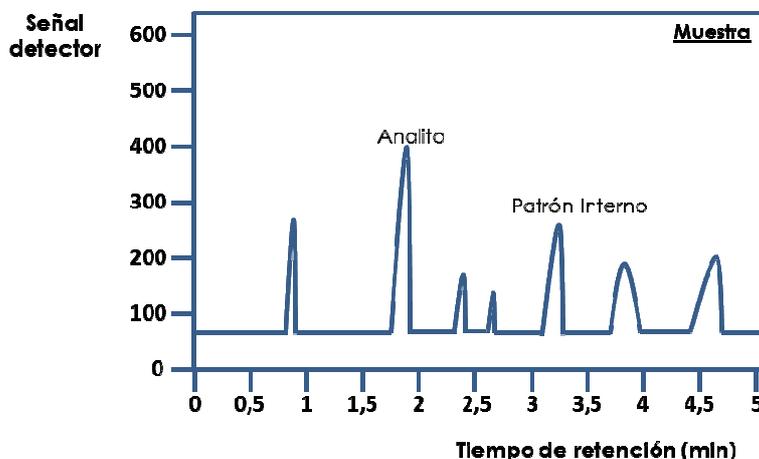


Figura 5. Cromatograma de la muestra ( $\lambda$ ? mg/L analito + 350 mg/L p.i.).

## 4.2 Cuantificación del analito

¿Cómo se puede cuantificar el analito en la muestra con los datos del cromatograma?

- En primer lugar hay que hacer una **tabla** que contenga los siguientes datos: concentración de analito, concentración de patrón interno, área del pico del analito y área del pico del patrón interno. Se calculará la **concentración de analito/concentración de p.i.** y el **área del analito/área del p.i.**, incluyéndose estos valores en la tabla.
- Con estos datos se construirá la **recta de calibrado**, mediante la representación del "área del analito/área del p.i." frente a "concentración del analito/concentración del p.i."
- Con la ecuación de la recta podemos calcular la concentración de analito/concentración del p.i. sustituyendo "y" por el área del analito/área del p.i. en el cromatograma de la muestra y despejando "x" que corresponde a la concentración de analito/concentración de p.i.
- La concentración de analito se calculará multiplicando el valor obtenido para "x" por la concentración del p.i.

Veámoslo con un ejemplo.

**Continuación Ejemplo 1:** Siguiendo con el ejemplo anterior, supongamos que las áreas obtenidas han sido las que se muestran en la Tabla 1.

Representando área del analito/área del p.i frente a concentración de analito/concentración de p.i. se obtiene la recta de calibrado que se muestra en la Figura 6.



	<b>C analito (mg/L)</b>	<b>Àrea analito</b>	<b>C p.i. (mg/L)</b>	<b>Àrea p.i.</b>	<b>C analito/C p.i.</b>	<b>Area analito/Àrea p.i.</b>
Patrón 1	300	450,7	350	905,7	0,86	0,50
Patrón 2	400	804,9	350	901,3	1,14	0,89
Patrón 3	500	1150,2	350	890,1	1,43	1,29
Patrón 4	600	1405,6	350	897,8	1,71	1,57
Muestra	¿?	1268,4	350	903,6	¿?/350	1,40

Tabla 1. Concentraciones y áreas de los picos del analito y del patrón interno (p.i.) obtenidas en los cromatogramas de los patrones y en el de la muestra.

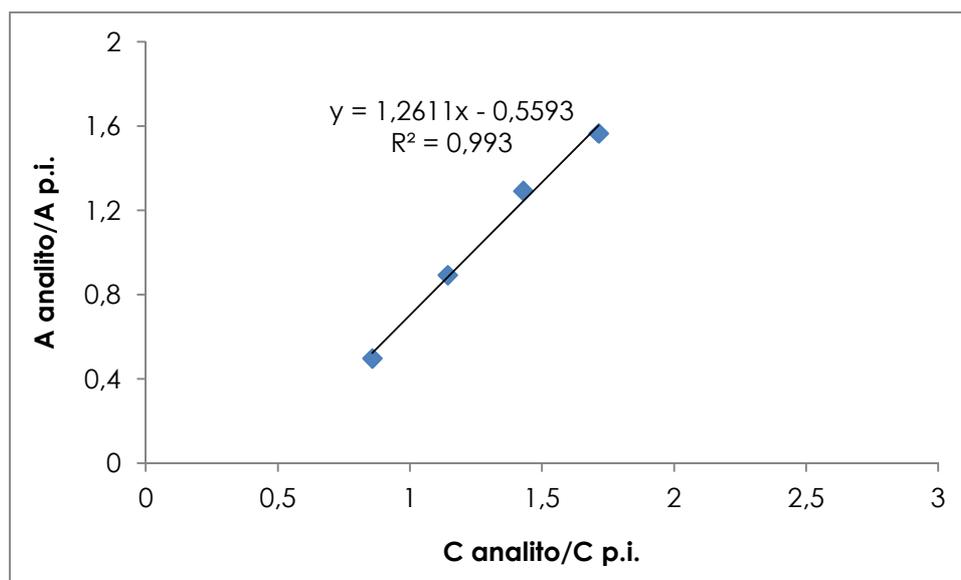


Figura 6. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 1.

Para calcular la concentración en el extracto de la muestra se siguen estos dos pasos:

- En la ecuación de la recta de calibrado se sustituye "y" por el área de analito/área de p.i. obtenida en el cromatograma de la muestra ( $1268,4/903,6 = 1,40$ ) y se despeja "x" que es la concentración de analito/concentración de p.i. en el extracto de la muestra:

$$C \text{ analito}/C \text{ p.i.} = x = (1,40 + 0,5593) / 1,2611 = 1,56$$

- La concentración de analito se obtiene multiplicando el valor calculado para "x" (1,56) por la concentración de p.i. (350 mg/L):



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**C de analito en el extracto de la muestra =  $1,56 * 350$  (mg/L) = 544,8 mg/L**

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo preparar una serie de patrones para cuantificar un compuesto por cromatografía de gases o por HPLC, utilizando el método del patrón interno. Asimismo, se ha detallado qué parámetro del cromatograma se utiliza para cuantificar y cuáles son los pasos a seguir en la determinación de la concentración de analito en una muestra por este método.

## 6 Bibliografía

[1] Nielsen, S.S: "Food Analysis", Ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2003, pág. 437–460.

[2] Skoog, D.A.; Leary, J.J: "Análisis Instrumental", Ed. McGraw Hill / Interamericana de España, Madrid, 1994, pág. 674–703.

[3] Valcárcel, M.; Gómez, A: "Técnicas Analíticas de Separación", Ed. Reverté, Barcelona, 1994, pág. 655–676.