



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Externo

<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

Dos de las técnicas con más potencial en el campo del análisis de alimentos son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este artículo se va a presentar una de las metodologías empleadas para cuantificar compuestos por cromatografía en columna. La técnica que se va a desarrollar es el método del patrón externo. La cuantificación a través de este procedimiento es aplicable tanto a cromatografía de gases como a HPLC.

## 2 Introducción

Cuando se lleva a cabo un análisis en un cromatógrafo líquido o de gases, el detector responde a la presencia de los distintos analitos que salen separados de la columna. La representación de la señal del detector frente al tiempo da una serie de picos que corresponden a cada uno de los analitos. Al gráfico resultante se le conoce como cromatograma y se emplea para llevar a cabo el análisis cualitativo y el cuantitativo. En la Figura 1 se puede observar a modo de ejemplo un cromatograma de una muestra, donde aparece representado en el eje de abcisas el tiempo de retención en minutos y en el eje de ordenadas la señal del detector de UV-Vis.

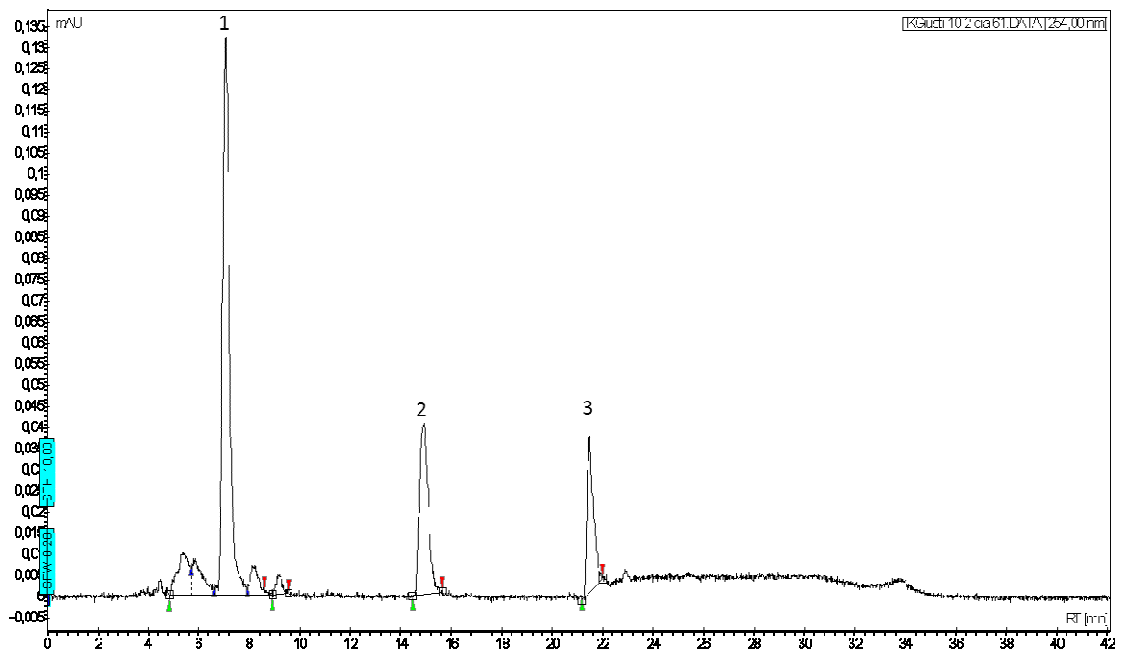


Figura 1. Cromatograma de una muestra, obtenido por HPLC.



Los equipos cromatográficos que se emplean en la actualidad disponen de integradores electrónicos, los cuales integran los picos de los cromatogramas, pudiéndose obtener la altura y el área de cada pico. Ambos parámetros se pueden utilizar para cuantificar los distintos compuestos, siendo el área del pico el más utilizado y el que se va a emplear en este artículo. En la Tabla 1 se muestran a modo de ejemplo los datos de cada uno de los picos del cromatograma de la Figura 1.

Nº de pico	Tiempo de retención ( $t_R$ ) (min)	Área (mAU min)
1	7,053	0,04217
2	14,892	0,01623
3	21,452	0,01053

Tabla 1. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma de la Figura 1.

### 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 externo.
- Cuantificar un compuesto presente en una muestra a partir de los cromatogramas de los patrones y de la muestra.

### 4 Desarrollo

El campo de aplicación de la cromatografía de gases y HPLC ha experimentado un aumento vertiginoso en las últimas décadas, debido fundamentalmente al gran desarrollo en el campo de la electrónica. Por ello, en el momento actual son dos de las técnicas más potentes en el análisis de todo tipo de compuestos en alimentos (nutrientes, compuestos bioactivos, aditivos, contaminantes orgánicos, residuos de medicamentos, etc.). Por todo ello, es necesario saber diseñar procedimientos adecuados para la cuantificación de compuestos analizados por estas 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 externo, 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. Inyectar el mismo volumen de cada una de las disoluciones patrón en el cromatógrafo, así como del extracto de la muestra. 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 120 a 180 mg/L, se podrían preparar e inyectar en el cromatógrafo 5 disoluciones patrón con las siguientes concentraciones:

- Patrón 1: 100 mg/L
- Patrón 2: 125 mg/L
- Patrón 3: 150 mg/L
- Patrón 4: 175 mg/L
- Patrón 5: 200 mg/L

## 4.2 Interpretación del cromatograma y cuantificación del analito

En el cromatograma de cada disolución patrón y en el cromatograma de la muestra saldrá el pico correspondiente al analito. El tiempo de retención del pico del analito será el mismo en todos los cromatogramas; sin embargo, el área será diferente dependiendo de la concentración de analito.

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

- Lo primero que habrá que hacer es una **tabla con la concentración de analito y el área** correspondiente a cada concentración.
- Con estos datos se construirá la **recta de calibrado**, mediante la representación del área del pico frente a la concentración del compuesto.
- Con la ecuación de la recta podemos calcular la concentración de analito sustituyendo "y" por el área del pico del analito en el cromatograma de la muestra y despejando "x" que corresponde a la concentración de analito.

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 2.



	Concentración (mg/L)	Àrea
Patrón 1	100	245,8
Patrón 2	125	325,6
Patrón 3	150	382,5
Patrón 4	175	450,3
Patrón 5	200	501,2
Muestra	¿?	398,7

Tabla 2. Áreas de los picos del analito obtenidas en los cromatogramas de los patrones y en el de la muestra.

Representando las áreas obtenidas frente a la concentración de los patrones y añadiendo el punto (0,0) se obtiene la recta de calibrado que se muestra en la Figura 2.

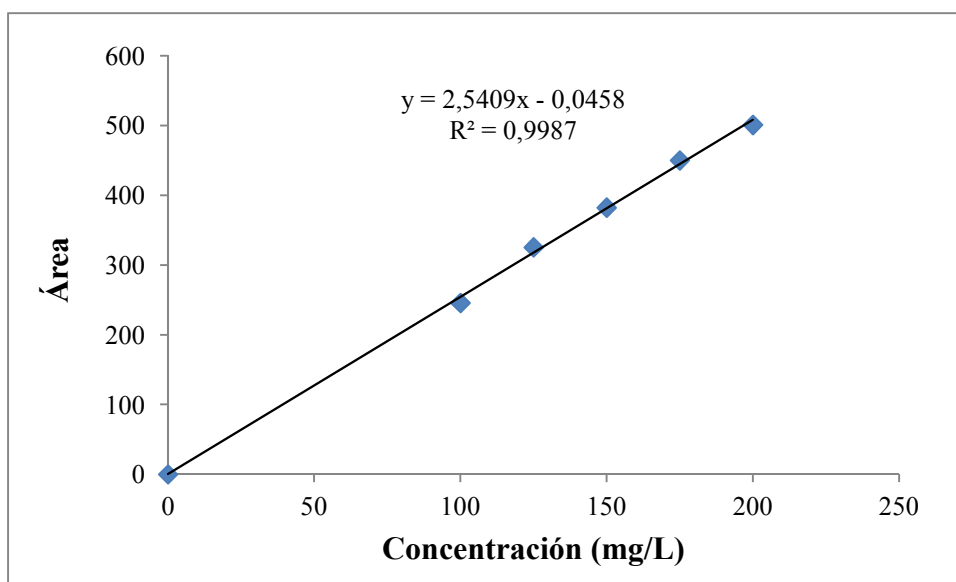


Figura 2. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 2.

Para calcular la concentración en el extracto de la muestra, en la ecuación de la recta de calibrado se sustituye "y" por el área obtenida en el cromatograma de la muestra (398,7) y se despeja "x" que es la concentración del analito en el extracto de la muestra:

$$x = (398,7 + 0,0458) / 2,5409 = 156,9 \text{ mg/L}$$

**Concentración de analito en el extracto de la muestra = 156,9 mg/L**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## 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 externo. 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.

## 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.