



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA EN EL  
LABORATORIO “ALEX STEWART” PARA EL  
ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN ACEITES  
VEGETALES MEDIANTE GC-FID

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA  
OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN QUÍMICA

JAIR ALEXIS BARRUETA MOLINA

LIMA - PERÚ

2024

**ASESOR**

Dr. Wilner Valenzuela Barrientos

Sección Química

Departamento de Ciencias Exactas

## **REVISORES**

Mag. Norma Cuizano Vargas

Mag. Julio Uechi Lopez

## **DEDICATORIA**

Para mi familia, que, a lo largo de todo este recorrido me brindaron su apoyo frente a todos los obstáculos que se presentaron y que me mostraron el significado de la perseverancia, resiliencia y tenacidad.

A mis docentes y personas que me guiaron durante mi recorrido de estudios de pregrado y que me instruyeron en valores éticos y morales.

Finalmente, pero no menos importante, a Dios, por la vida que tengo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi asesor y profesor en la etapa de pregrado, el Dr. Wilner Valenzuela, por su constante orientación y muy buena voluntad durante la elaboración de este proyecto.

Agradezco a mi jefe de laboratorio, el Blgo. Edgardo Chafloque por brindarme la confianza, la guía y oportunidad de realizar dicho proyecto en el laboratorio y siempre darme su punto de vista desde la experiencia en el tema.

Agradezco a todos los docentes involucrados en el curso de Suficiencia Profesional por permitir la realización de dicha asignatura y brindarme la oportunidad de obtener la licenciatura.

## VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA EN EL LABORATORIO "ALEX STEWART" PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN ACEITES VEGETALES MEDIANTE GC-FID

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>9</b> %	<b>9</b> %	<b>3</b> %	<b>3</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>core.ac.uk</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>bdigital.unal.edu.co</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>4</b>	<b>es.scribd.com</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>5</b>	<b>escholarship.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>baadalsg.inflibnet.ac.in</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>Xian-jiao Meng, Ya-ru Zhang, Jing-jing Li, Jin-zhao Wang, Jun-xian Jia. "A Cu<sup>2+</sup> fluorescent</b>	<b>&lt;1</b> %

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
3.1	Antecedentes .....	4
3.2	Problema.....	5
3.3	Justificación.....	5
3.4	Competencias profesionales .....	6
3.5	Fundamentos Teóricos .....	8
3.6	Objetivos .....	14
3.6.1	Objetivo General .....	14
3.6.2	Objetivos Específicos.....	14
<b>4</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>15</b>
4.1	Método.....	15
4.2	Procedimiento para la validación .....	15
4.3	Preparación del Patrón interno .....	18
4.4	Parámetros instrumentales.....	19
4.5	Preparación de solución Estándar Nu-Chek 67 .....	20
4.6	Preparación de solución Estándar Nu-Chek 607 .....	21
4.7	Validación .....	21
4.8	Determinación del límite de detección y cuantificación .....	21
4.9	Exactitud.....	22
4.10	Precisión .....	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
5.1	Cuadro de porcentajes de área y recuperación de los ácidos grasos de la secuencia lanzada con el estándar Nu-Chek 67.....	24
5.2	Cromatogramas de los 4 métodos lanzados en una misma secuencia con el estándar Nu-Chek 67 .....	25
5.3	Cromatograma del estándar Nu-Chek 607 con la metodología seleccionada.....	26

5.4	Tabla con las áreas de los ácidos grasos trans en distintas concentraciones del estándar Nu-Chek 607 .....	28
5.5	Límites de detección y cuantificación .....	29
5.6	Tabla con las sumatorias de los ácidos grasos trans C18:1T y C18:2T del patrón interno (Muestra interlaboratorio aceite de soya) para determinar la exactitud .....	35
5.7	Tabla con las repeticiones intradiarias para determinar la precisión.....	37
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

## 1 RESUMEN

El siguiente trabajo tiene como objetivo validar una metodología para la cuantificación de los ácidos grasos trans en aceites vegetales mediante la cromatografía de gases, esto con la finalidad de brindar un nuevo servicio para una clientela interesada en obtener la concentración de estos tipos de ácidos grasos en muestras de aceites vegetales. El procedimiento de validación garantiza la confiabilidad de los resultados otorgados por el laboratorio Alex Stewart, para lo cual, se propuso evaluar cuatro métodos analíticos en términos de porcentaje de recuperación, de los cuales se seleccionó el más adecuado en función a sus tiempos de elución, resolución de los picos y la relación señal/ruido. Para validar se utilizó dos estándares de ácidos grasos, Nu-Chek 67 y Nu-Chek 607 junto a un patrón interno (muestra interlaboratorio). Para los ácidos grasos, los límites de detección (LD) fueron, Miristelaidato de metilo - 6.03 ppm, Palmitelaidato de metilo - 6.28 ppm, Petroelaidato de metilo - 5.76 ppm, Elaidato de metilo - 7.09 ppm, Transvacenato de metilo - 9.17 ppm, Linoelaidato de metilo - 5.68 ppm, mientras que sus límites de cuantificación (LQ) fueron, Miristelaidato de metilo - 18.27 ppm, Palmitelaidato de metilo - 19.03 ppm, Petroelaidato de metilo - 17.46 ppm, Elaidato de metilo - 21.50 ppm, Transvacenato de metilo - 27.79 ppm y Linoelaidato de metilo - 17.22 ppm. Para evaluar la exactitud y precisión se usó la sumatoria de las áreas de integración de los ácidos grasos C18:1 (ácidos grasos de 18 C con 1 insaturación) y C18:2 (ácidos grasos de 18 C con 2 insaturaciones) cuyos valores son de 21.08% y 2.79% respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de las tolerancias propuestas por el certificado. Por otro lado, la precisión medida para



C18:1 y C18:2 se calculó como porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), situándose entre 1.78% y 5.52%.

**Palabras Clave:** Ácidos grasos trans, Cromatografía de gases, Validación, Cuantificación.

## 2 ABSTRACT

The following work aims to validate a methodology for the quantification of trans fatty acids in vegetable oils by gas chromatography, with the goal of providing a new service for a clientele interested in obtaining the concentration of these types of fatty acids in vegetable oil samples. The validation procedure guarantees the reliability of the results provided by the Alex Stewart laboratory, for which it was proposed to evaluate four analytical methods in terms of recovery percentage and from which the most adequate was selected according to their elution times, peak resolution and signal/noise ratio. Two fatty acid standards, Nu-Chek 67 and Nu-Chek 607 together with an internal standard (interlaboratory sample) were used for validation. For fatty acids, the limits of detection (LOD) obtained were, Methyl myristelaidate - 6.03 ppm, Methyl palmitelaidate - 6.28 ppm, Methyl petroelaidate - 5.76 ppm, Methyl elaidate - 7.09 ppm, Methyl transvacenate - 9.17 ppm, Methyl linolenidate - 5.68 ppm, while their limits of quantification (LQ) were, Methyl myristelaidate - 18.27 ppm, Methyl palmitelaidate - 19.03 ppm, Methyl petroelaidate - 17.46 ppm, Methyl elaidate - 21.50 ppm, Methyl transvacenate - 27.79 ppm and Methyl linoelaidate - 17.22 ppm. To evaluate the accuracy and precision, the sum of the integration areas of the fatty acids C18:1 (18 C fatty acids with 1 unsaturation) and C18:2 (18 C fatty acids with 2 saturations) whose values are 21.08% and 2.79%, respectively, were used. These values are within the tolerances proposed by the certificate. On the other hand, the precision measured for C18:1 and C18:2 was calculated as percent relative standard deviation (%RSD), ranging from 1.78% to 5.52%.

**Keywords:** Trans fatty acids, Gas chromatography, Validation, Quantification.

### **3 INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Antecedentes**

En la actualidad, existen diversas técnicas para analizar y cuantificar los ácidos grasos, como la cromatografía de gases, la espectroscopia infrarroja, la cromatografía líquida de alta eficacia, etc. Estas, a su vez, se complementan con otros equipos o metodologías, como la espectrometría de masas, la transformada de Fourier, la quimiometría, entre otros.

La mayoría de autores o investigaciones, presentan una tendencia a elegir la cromatografía de gases entre sus metodologías para el estudio del caso, esto debido a que presenta límites de detecciones más bajos que otras técnicas instrumentales, asimismo, brinda una sensibilidad adaptable a estos límites. Esta técnica analítica ha demostrado resultados óptimos e idóneos, siendo a su vez, la recomendación como metodología oficial a usar por parte de la AOCS (1). Las otras técnicas instrumentales en su mayoría, requieren como complemento el uso de la cromatografía de gases o la implementación de alguna otra metodología como soporte, y es que se ha podido observar en los resultados que, pese a que logran el objetivo, estas presentan en el camino, la presencia de interferentes en algunos casos, el uso de pre tratamientos extensos, carencia de cuantificación y sensibilidad escasa (2-4).

### **3.2 Problema**

La propuesta problema que dio inicio al trabajo de suficiencia profesional (TSP) fue la existencia de una necesidad por parte del laboratorio Alex Stewart de tener la capacidad de analizar las grasas *trans* en aceites vegetales, debido a que existen clientes interesados en estos análisis, y la metodología con la que se cuenta actualmente carece de límites de detección al igual que de cuantificación, por ello, se tiene como objetivo implementar un método analítico para el análisis cuantitativo de grasas *trans* en muestras de aceites vegetales el cual esté validado y optimizado a los recursos que posee el laboratorio.

### **3.3 Justificación**

Cuando hablamos de ácidos grasos *trans*, nos referimos a la cadena carboxílica que posee en su conformación 1 o más dobles enlaces no conjugados en la isomería geométrica *trans*. Estos no se producen de una forma enzimática dentro del cuerpo humano, sino que, los obtenemos mediante la ingesta de alimentos industrialmente tratados, El proceso industrial denominado “hidrogenación parcial”, da como resultado la conformación *trans*, la cual, desde la perspectiva producción/manufactura brinda una mejor textura, un sabor más agradable y finalmente, un mayor tiempo de vida útil (5). Entre los más conocidos tenemos al ácido eliadico, ácido linoeliadico, ácido *trans* vaccénico y ácido ruménico. Por otro lado, las grasas *trans* durante mucho tiempo han sido negativamente asociadas con enfermedades cardiovasculares, y es que se ha comprobado que el disminuir el consumo de estas, genera un menor riesgo de sufrir estos trastornos (6,7). Asimismo, existe una toxicidad de los ácidos grasos *trans* hacia la célula, teniendo como consecuencia inflamación y muerte celular (8).

Mediante la validación de un método analítico se podrá tener un procedimiento confiable que permita determinar el contenido de ácidos grasos *trans* con precisión y exactitud, ya que estos compuestos tienen un impacto en el sector alimentario. Su análisis es de carácter obligatorio en alimentos industrializados destinados al consumo humano, limitándose a un contenido que no debe superar un valor de 2%, y expresándose en el etiquetado en “g por 100 g”. Este etiquetado clasifica al contenido de grasas en: Grasa total, saturada, *trans*, monoinsaturadas, poliinsaturadas y colesterol.

Por otro lado, la determinación del contenido de grasas *trans* en los alimentos industrializados está relacionada con la ley de promoción de la alimentación saludable (9), donde se establece que, en la publicidad de alimentos y bebidas no alcohólicas con altos niveles de grasas *trans*, azúcar, sodio y grasas saturadas, se deben incluir advertencias claras y destacadas como "Alto en (Sodio-azúcar-grasas saturadas): Evitar su consumo excesivo" o "Contiene grasas trans: Evitar su consumo". Esta regulación aplica a productos que superen los parámetros técnicos definidos en el reglamento.

### **3.4 Competencias profesionales**

El desarrollo del presente Trabajo de Suficiencia Profesional se logró gracias a las competencias que fueron obtenidas en los diferentes cursos brindados por la malla curricular de la carrera de Química de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), entre los que destacan para la finalidad, el curso de “Análisis Instrumental I”, curso en el cual se desarrolló los principios teóricos de las principales

metodologías del análisis instrumental, como por ejemplo, la espectroscopía molecular y atómica, la cual permite conocer el tipo de interacción entre la radiación electromagnética y la materia, proporcionando información cualitativa o cuantitativa. También se puede destacar a la cromatografía, técnica que permite separar los componentes de una mezcla para su posterior identificación y cuantificación.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio, que permiten reconocer las principales variables que afectan la ejecución y los resultados de los ensayos en el laboratorio. También el poder de hacer uso de información y metodología para establecer el sistema de calidad del Laboratorio.

El curso de Tratamiento Matemático de Datos Experimentales que me permitió conocer las herramientas estadísticas para desarrollar la validación del método.

La parte teórica-práctica brindada por el curso de química orgánica fue fundamental para identificar y reconocer las propiedades químicas y físicas de las moléculas involucradas en todo el proceso, al igual que, el análisis de las reacciones comprendidas en el pre-tratamiento de la muestra, como lo es, la reacción de transterificación para la formación de los ésteres metílicos.

Durante el período laboral de alrededor de dos años, adquirí experiencia en la comprensión y aplicación de las Normas Técnicas Peruanas (NTP). Estas normas, creadas por entidades especializadas en normalización, que tienen como propósito estandarizar procesos, productos y servicios en el Perú, garantizando su calidad, seguridad y eficiencia en diferentes sectores. En el país, el Instituto Nacional de

Calidad (INACAL) es la entidad responsable de coordinar y fomentar la normalización a nivel nacional.

### **3.5 Fundamentos Teóricos**

En el contexto de la norma ISO 17025, la validación de metodologías es un proceso necesario para asegurar la calidad y la credibilidad de los resultados obtenidos por laboratorios de ensayo y calibración. Esta norma establece estándares rigurosos para garantizar la competencia técnica entre estos, siendo la validación un componente fundamental dentro de este marco regulatorio.

Este procedimiento implica una serie de pasos meticulosos y bien definidos. Comenzando con una planificación que delinea el alcance, los recursos necesarios y los criterios de aceptación. La elección de la metodología apropiada es crucial, considerando métodos estandarizados, técnicas internas validadas o métodos particulares de la industria.

Una vez seleccionada la metodología, se identifican y evalúan los parámetros críticos, como precisión, exactitud, linealidad, límites de detección y cuantificación. Se llevan a cabo ensayos experimentales para verificar estos parámetros, utilizando estudios de repetibilidad, reproducibilidad y otras pruebas específicas según la naturaleza del ensayo.

Los datos recopilados durante la validación se someten a un análisis minucioso. Se evalúan cuidadosamente para determinar si cumplen con los criterios de aceptación previamente establecidos en la planificación. Desde los procedimientos, hasta los resultados, debe haber una documentación detallada.

Una vez completado y revisado el protocolo de validación por un responsable designado, la metodología validada se implementa en el laboratorio. Sin embargo, es necesario de un monitoreo continuo para asegurar que la metodología siga manteniendo su validez y cumpla con los estándares de calidad demandados.

Cuando hablamos de cromatografía, nos referimos al grupo de técnicas asignadas a separar los constituyentes de una mezcla en base a su interacción diferencial entre dos fases, la estacionaria y la fase móvil.

Cuando la fase móvil es un gas, la fase estacionaria es un líquido de una gran viscosidad y baja volatilidad y la separación se distribuye en el reparto, entonces el proceso se define como “cromatografía gas-líquido” (GLC). Por otro lado, cuando la fase estacionaria es sólida y trabaja principalmente en adsorción, el proceso se conoce como “cromatografía gas-sólido” (GSC). El GLC se utiliza más comúnmente, mientras que el segundo, se rige principalmente para disgregar compuestos altamente volátiles, incluidos gases (10).

Entre los principales componentes del GLC tenemos el gas portador, el cual puede ser helio, argón, nitrógeno y dióxido de carbono, la selección de estos depende básicamente del detector implementado en la técnica, sin embargo, este debe cumplir ciertos requisitos, como lo es la inercia química para evitar interacciones no deseadas con la muestra o la columna. En segundo lugar, debe coexistir con el detector, brindando capacidad de respuesta y facilitando el proceso de detección. En tercer lugar, para garantizar resultados precisos y confiables, el gas debe presentar una alta pureza. Además, para asegurar la seguridad del laboratorio, es



recomendable que el gas no sea inflamable. Por último, debe estar libre de partículas metálicas que puedan interferir con el análisis (10).

En cuanto a las columnas cromatográficas, su principal rol es el de separar en componentes individuales una mezcla. Estas consisten en una fase estacionaria y una fase móvil. Estas técnicas de fabricación implican la unión más fuerte de la fase estacionaria a la columna a nivel químico, proporcionando una mayor estabilidad y durabilidad con el tiempo. El uso continuo de las columnas puede llevar al fenómeno denominado "sangrado", donde pequeñas cantidades de la fase estacionaria se liberan gradualmente durante el proceso de elución, afectando potencialmente la calidad de los resultados analíticos al introducir componentes no deseados en la muestra (11).

Con el paso del tiempo, es común que las columnas cromatográficas se contaminen con sustancias indeseadas. Para eliminar estas impurezas, se requiere enjuagar la columna con un disolvente, sin embargo, este proceso de enjuague puede agravar el sangrado. Para contrarrestar este efecto y garantizar una mejor durabilidad de la columna, se recurre a la formación de enlaces químicos y al entrecruzamiento de la fase estacionaria (11). Estos enlaces químicos y entrecruzamientos fortalecen la resistencia de la fase estacionaria ante el lavado con disolvente durante el enjuague, contribuyendo así a preservar la integridad de la columna a lo largo de un período más prolongado.

Los dos tipos principales de columnas cromatográficas para GC son las columnas capilares y las columnas por empaquetamiento.

Las columnas por empaquetamiento, ya sean de vidrio o metal, están cubiertas por una fase estacionaria líquida que permanece fija. Por lo general, estas tienen longitudes que oscilan entre 1.5 y 10 metros, con un diámetro interno que varía de 2 a 4 milímetros. Por otro lado, las columnas capilares son delgadas y largas, con un diámetro interior muy pequeño. Estas tienen una fase estacionaria líquida inmovilizada en su interior, recubierta con vidrio o sílice. Se dividen en dos tipos principales: las columnas tubulares abiertas con paredes revestidas, que tienen un material inerte como soporte para la fase estacionaria, y las columnas tubulares abiertas recubiertas de soporte, que tienen una capa de material de soporte recubierta por una fina película de fase estacionaria líquida. Estas últimas suelen tener una mayor capacidad para muestras en comparación con las primeras (10,12).

Los distintos detectores muestran variados grados de selectividad. Los detectores no selectivos tienen la capacidad de responder a todos los componentes de la muestra, excepto al gas portador. Por otro lado, los detectores selectivos pueden identificar una amplia gama de compuestos con características físicas similares. La cromatografía de gases emplea una amplia gama de detectores, cada uno con distintas funcionalidades y aplicaciones. El detector de ionización de llama (FID) destaca por su alta sensibilidad. Por otro lado, el detector de conductividad térmica (TCD) utiliza un filamento calentado, evaluando los cambios en la corriente del filamento a medida que el gas portador pasa a través de la celda produciendo una señal. El detector de captura de electrones (ECD) se especializa en compuestos halogenados, utilizando una fuente radiactiva para ionizar la muestra. De manera similar, el detector de nitrógeno y fósforo opera con un principio análogo al FID y está diseñado para identificar compuestos que contengan nitrógeno y fósforo. Para

detectar azufre y fósforo, el detector fotométrico de llama (FPD) hace pasar el eluyente a través de una llama, lo que produce especies excitadas y emisión de luz. Por último, el detector de fotoionización (PID) se centra en compuestos aromáticos, utilizando radiación ultravioleta para ionizar fotográficamente moléculas con baja energía de ionización (10,13).

La cromatografía gas-líquido (GLC) es un método analítico altamente versátil con múltiples ventajas notables. En primer lugar, se distingue por su capacidad para lograr una alta resolución y buenos tiempos de retención (11), especialmente evidente al separar mezclas complejas como los ésteres metílicos de ácidos grasos. En segundo lugar, debido al uso prevalente de columnas capilares en GLC, se requieren volúmenes mínimos de muestra, a menudo tan pequeños como unos pocos microlitros, para realizar un análisis completo. El proceso analítico es rápido gracias al equilibrio veloz entre las fases móvil y estacionaria, acelerando la velocidad de análisis. Además, GLC destaca por su alta sensibilidad en la detección, empleando varios tipos de detectores para mejorar la capacidad de identificación. Asimismo, su capacidad para realizar análisis cualitativos y cuantitativos simultáneos del analito lo convierte en una herramienta integral para estudios analíticos. No obstante, la principal desventaja de la GLC es la lenta liberación del líquido inmovilizado desde la superficie sólida (11,13).

EL GLC ofrece un método analítico versátil con varias ventajas distintas. En primer lugar, destaca por proporcionar capacidades de alta resolución, especialmente evidentes en la separación de mezclas complejas como ésteres metílicos de ácidos grasos. En segundo lugar, debido al uso predominante de columnas capilares en GLC, volúmenes mínimos de muestra, a menudo sólo unos pocos microlitros, son

adecuados para un análisis completo. En tercer lugar, el proceso de análisis es notablemente rápido, facilitado por el rápido equilibrio que se puede lograr entre las fases móvil y estacionaria, lo que acelera la semilla del análisis. Además, este método cuenta con una mayor sensibilidad en la detección, aprovechando varios tipos de detectores para mejorar las capacidades de detección. Finalmente, una de sus características destacables radica en que permite el análisis cualitativo y cuantitativo simultáneo del analito, lo que lo convierte en una herramienta sólida para estudios analíticos integrales.

La principal desventaja de la GLC es que el líquido inmovilizado sale lentamente de la superficie sólida.

### **3.6 Objetivos**

#### **3.6.1 Objetivo General**

- 1) Validar un método analítico para el análisis cuantitativo de grasas trans en muestras de aceites vegetales, en el laboratorio Alex Stewart.

#### **3.6.2 Objetivos Específicos**

- 1) Comparar 4 métodos cromatográficos en términos de porcentaje de recuperación.
- 2) Seleccionar la metodología más adecuada para la determinación de las grasas trans en términos de tiempo de elución, resolución y ruido.
- 3) Determinar el límite de detección y cuantificación de la metodología seleccionada.
- 4) Determinar la exactitud de la metodología seleccionada.
- 5) Determinar la precisión de la metodología seleccionada.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Método

“Determinación de ácidos grasos *cis* y *trans* en aceites y grasas hidrogenadas y refinadas mediante GLC capilar” (“Determination of *cis*- and *trans*- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC”) - AOCS Official Method Ce 1f-96 (1).

### 4.2 Procedimiento para la validación

Para la determinación y cuantificación de los ácidos grasos trans C14:1T Miristelaidato de metilo, C16:1T Palmitelaidato de metilo, C18:1T Petroelaidato de metilo, C18:1T Elaidato de metilo, C18:1T Transvacenato de metilo, C18:2T Linoelaidato de metilo (Ver Anexos, Cuadro 4), se partirá desde la elección de la metodología en base a criterios como: el tiempo de elución, resolución y la presencia de ruido. El procedimiento inicia lanzando una secuencia con 9 filas, de las cuales las 3 primeras filas son blancos (isooctano), luego las filas 4, 5, 6 y 7 pertenecen al estándar Nu-Chek 67 (Ver anexos, Cuadro 2). Cada una de estas contará con un método distinto, finalmente las filas restantes estarán ocupadas por blancos. Así se podrá discernir en una sola secuencia, cual es el método más óptimo para el trabajo.

Una vez finalizada la secuencia, se identificarán los picos con ayuda de los resultados de las fuentes bibliográficas de: **Método 1**- De la Fuente M (14), **Método 2**- Pojjanapornpun S (2), **Método 3** - Nimal Ratnayake (15), **Método 4** - Yi Chen (16), y del certificado del estándar Nu-Chek 67 (Ver

anexos, Imagen 3). Mediante una correlación entre los porcentajes de área de los ácidos grasos de este.

Una vez identificados los picos en los 4 métodos, seleccionaremos el método que cumpla con las características mencionadas anteriormente. Con método seleccionado, se procederá a pasar una nueva secuencia con la misma cantidad de blancos, y en lugar del estándar Nu-Chek 67, se trabajará con el estándar Nu-Chek 607 (Ver anexo, Cuadro 1), en el cual se encuentran todos los ácidos grasos trans que pasaremos a cuantificar. Repetiremos el mismo procedimiento y metodología que con el estándar Nu-Chek 67 solo que esta vez ya tendremos algunos picos identificados que facilitaran el reconocimiento de los del Nu- Chek 607.

El siguiente paso será determinar los límites de detección y cuantificación mediante una curva de calibración de ocho puntos con disoluciones del estándar Nu-Chek 607.

Finalmente, se pasará a lanzar una secuencia de 6 filas, la cual estará conformada por 4 blancos, 1 estándar (Nu-Chek 607) de 100 ppm y el patrón interno procedente de un Inter laboratorio (Aceite de Soya), el cual se conoce su proporción de ácidos grasos trans C18:1, C18:2 y C:18:3 en forma de sumatoria (Ver anexos, Imagen 4). Se contrastarán los resultados obtenidos con los del patrón interno, para corroborar la óptima identificación de los ácidos grasos *trans*, y a su vez, la exactitud mediante el porcentaje de error y los límites brindados por el certificado, garantizando la efectividad de la metodología.

Para confirmar una óptima precisión, se correrá una prueba intradiaria, mediante una secuencia con blancos, el estándar Nu-Chek 607 y el patrón interno de manera sextuplicada. Con los resultados se calculará la media, desviación estándar y el porcentaje de la desviación estándar relativa (% RSD) entre las repeticiones para así determinar el último parámetro de calidad, dando por finalizado el proceso de validación.

### **Equipos y materiales**

- Pipetas pasteur
- Matraces aforados de 100 mL
- Pipeta de 1-5mL
- Micropipeta de 10 - 100  $\mu$ L
- Micropipeta de 0.5 - 5 mL
- Tubo de 20 mL con tapón de rosca.
- Baño de agua
- Viales de 1.5 mL con tapas
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Gas configurado con inyector programable split / splitless y detector de ionización de llama.
- Software TotalChrom 6.1.



## Reactivos

- Estándar Nu-Chek GLC 607
- Estándar Nu-Chek GLC 67
- Patrón Interno (Interlaboratorio)
- Agua destilada
- Metanol HPLC
- Tolueno HPLC
- Isooctano HPLC
- Sulfato de sodio anhidro
- 30 % metilato de sodio Merck
- 3 % metilato de sodio en metanol

### 4.3 Preparación del Patrón interno

Se sigue un protocolo específico para la preparación de la muestra: se colocan de 2 a 4 gotas de la muestra en un tubo de tapa rosca de 20 mL, seguidas de la adición de 1.5 mL de tolueno y 1.5 mL de metilato de sodio al 3 % disuelto en metanol. Tras homogenizar, se lleva la mezcla a un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos. Luego de retirarla y enfriarla, se agrega 2 mL de agua destilada y, posteriormente, 5 mL de isooctano, dejando reposar la mezcla hasta que se separen las fases. Se toma una alícuota aproximada de 1 mL de la fase superior (isooctano) y se transfiere a un tubo que contiene 1 g de sulfato de sodio anhidro. Tras agitar y reposar, se extraen 35 µL del solvente y se transfieren a un vial de 1.5 mL, ajustando el volumen con isooctano. Finalmente, este vial se coloca en el carrusel de muestras del equipo de cromatografía de gases (GC) para su análisis.

#### 4.4 Parámetros instrumentales

Se realizan dos preparaciones simultáneas para cada muestra, así como dos preparaciones de patrones de calibración que deben ser inyectados. Es crucial mantener el sistema cromatográfico inocuo mediante la inyección de isooctano puro. El método empleado en la cromatografía de gases se fundamenta en un factor de respuesta empírico, lo que posibilita la aplicación de estos parámetros en cualquier GC siempre y cuando la separación sea aceptable.

Para la elección de los parámetros cromatográficos de la validación, se utilizaron cuatro metodologías distintas, las cuales tienen 4 factores en común, la columna cromatográfica (CP-Sil 88 para FAME GC, de 100 metros, con un diámetro de 0.25 mm y una fase estacionaria de 0.20  $\mu\text{m}$ .), el gas portador (helio), el flujo de gases para el detector (45 mL/min de hidrógeno y 450 mL/min de aire) y el volumen de inyección (1.0  $\mu\text{L}$ ).

Se procedió a realizar una secuencia mediante el programa TotalChrom 6.1 con las cuatro metodologías. En la primera, la rampa de temperatura comienza con 45 °C manteniéndose así durante 4 minutos. Luego, se establece un aumento de temperatura programado a 13 °C por minuto hasta alcanzar los 175 °C, donde permanece constante durante 27 minutos. Posteriormente, se programa un incremento de temperatura de 4 °C por minuto hasta llegar a los 215 °C, donde se mantiene por 35 minutos. La temperatura del FID es de 250 °C y la presión del gas portador es de 28.12 psi (14). La segunda metodología inicia la rampa de temperatura con 80 °C durante un lapso de 4 minutos, después experimenta un aumento hasta

alcanzar los 220 °C en un periodo de 5 minutos con una tasa de incremento de 4 °C/min. Finalmente, llega a 240 °C manteniéndose a esta durante 10 minutos. El detector operará a una temperatura de 250 °C y la presión del gas portador será de 27.7 psi (2). Para la tercera metodología, inicialmente programamos la rampa del horno a 45 °C conservando esta durante 4 minutos; posteriormente se configura un aumento de 13 °C por minuto hasta llegar a 175 °C, donde se mantiene durante 27 minutos. A continuación, se establece un incremento final de 4 °C por minuto hasta los 215 °C a lo largo de 35 minutos. Para este procedimiento, el detector FID trabajará a una temperatura de 275 °C y la presión del gas portador será de 27.7 psi (15). Por último, en la cuarta metodología, la temperatura de inyección será de 250 °C. El programa de horno se ejecuta iniciando a 60 °C durante 5 minutos, seguido de una primera rampa de 11.5 °C/min hasta alcanzar 170 °C en 25 minutos y una segunda rampa de 5 °C/min hasta 200 °C en 5 minutos, finalmente la temperatura se incrementa gradualmente desde los 215 °C a una velocidad de 2 °C por minuto, y se mantiene constante durante 20 minutos. El detector utilizado es un FID con una temperatura de operación de 250 °C. El gas portador empleado es helio a 40 psi, mientras que el flujo de gases se mantiene constante con en el detector (16).

#### **4.5 Preparación de solución Estándar Nu-Chek 67**

El estándar consta de 10 ácidos grasos en su composición, (Ver anexos, Cuadro 2) Este se prepara diluyendo una ampolla de 100 mg en un matraz aforado de 100 mL con isooctano. Siendo esta nuestra solución Stock, de la

cual prepararemos una solución de 100 ppm para verificar los factores de corrección de los ácidos grasos.

Una vez verificados e identificados, pasaremos a realizar el mismo procedimiento con un estándar que posee una mayor proporción de ácidos grasos en su composición.

#### **4.6 Preparación de solución Estándar Nu-Chek 607**

El estándar consta de 39 ácidos grasos en su composición, (Ver anexos, Cuadro 1). Este se prepara diluyendo una ampolla de 100 mg en un matraz aforado de 100 mL con isooctano. Siendo esta nuestra solución Stock de 1000 ppm, de la cual posteriormente, se tomarán alícuotas para preparar soluciones de 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 y 800 ppm respectivamente y con ellas, se crea una curva de calibración.

#### **4.7 Validación**

La determinación de los parámetros de calidad se basa en ICH (17).

#### **4.8 Determinación del límite de detección y cuantificación**

El límite de detección, es la mínima concentración de analito presente en una muestra y que puede ser detectada mediante un proceso de medida, el cual posee un nivel de confianza concreto, mientras que el límite de cuantificación se refiere al nivel más reducido de la sustancia analizada que es posible detectar a través de un método experimental específico.

Para calcular ambos parámetros, se realizó una curva de calibración utilizando las señales de las áreas brindadas por los cromatogramas de las soluciones preparadas del estándar Nu-Chek 607, las cuales contienen los

ácidos grasos trans. Ayudándonos con softwares como Excel u Origin, obtenemos de la curva la estimación de la desviación estándar y la pendiente

Límite de detección (LD).

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

Donde:

s: desviación estándar

m: pendiente de la ecuación de la curva

Límite de cuantificación (LQ).

$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

Donde:

s: desviación estándar

m: pendiente de la ecuación de la curva

#### **4.9 Exactitud**

El promedio de la sumatoria de las proporciones de los ácidos grasos trans C18:1 y C18: 2, tienen que estar entre los límites de aceptación propuestos por el ensayo de interlaboratorio.

Para C18:1

Límite mínimo de tolerancia: 17.20

Límite máximo de tolerancia: 27.46

Valor de consenso: 22.3

$$\%error = \frac{\text{Límite máxmio de tolerancia-Valor de consenso}}{\text{Valor de consenso}} * 100$$

Para C18:2

Límite mínimo de tolerancia: 2.64

Límite máximo de tolerancia: 4.68

Valor de consenso: 3.66

$$\%error = \frac{\text{Límite máxmio de tolerancia-Valor de consenso}}{\text{Valor de consenso}} * 100$$

#### 4.10 Precisión

Los valores son extraídos de la metodología De Kooning,et al (18).

% RSD < 11%

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar}}{\bar{x}} * 100$$

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cuadro de porcentajes de área y recuperación de los ácidos grasos de la secuencia lanzada con el estándar Nu-Chek 67

El cuadro refleja los resultados de los porcentajes de área y recuperación de los ácidos grasos con los distintos métodos lanzados en la secuencia con el Nu-Chek 67 (Tabla N° 1). Este porcentaje de recuperación se calculó en base al porcentaje de área de cada ácido graso brindado por el certificado.

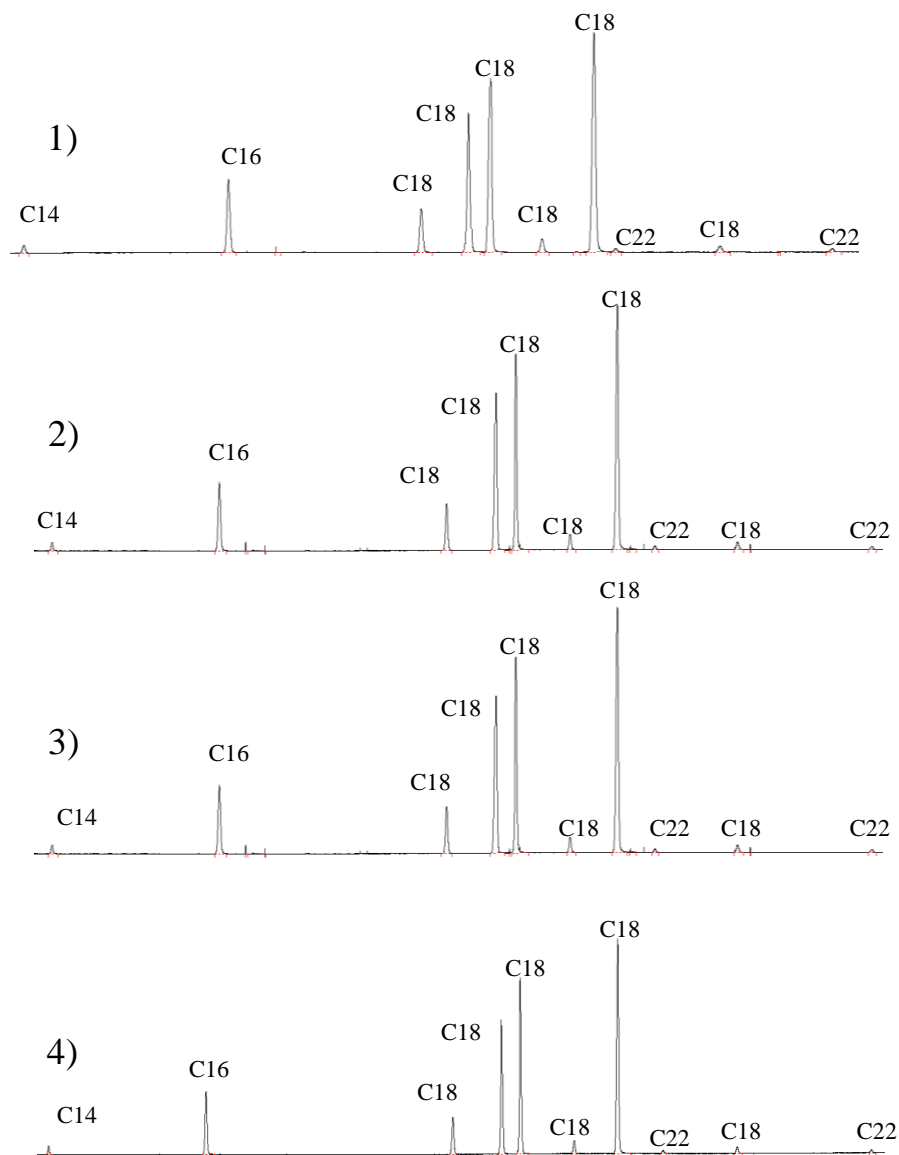
**Tabla N° 1. Porcentajes de área y recuperación de los ácidos grasos de la secuencia lanzada con el estándar Nu-Chek 67**

ESTANDAR DE ÁCIDOS GRASOS Nu-Chek 67									
<u>Component Name</u>	<u>% Área Met. 1</u>	<u>% Área Met. 2</u>	<u>% Área Met. 3</u>	<u>% Área Met. 4</u>	<u>% Área Certificado</u>	<u>% Recup. 1</u>	<u>% Recup. 2</u>	<u>% Recup. 3</u>	<u>% Recup. 4</u>
C14:0 <u>Myristic acid</u>	0.99	0.99	0.96	0.97	1	99.00	99.00	96.00	97.00
C16:0 Palmitate	9.75	9.88	9.75	9.84	10	97.50	98.80	97.50	98.40
C18:0 <u>Stearic acid</u>	6.1	6	6.02	6.03	6	101.67	100.00	100.33	100.50
C18:1T <u>Elaidate</u>	19.88	19.88	19.83	19.8	20	99.40	99.40	99.15	99.00
C18:1 Oleic acid	24.96	24.92	25.11	24.94	25	99.84	99.68	100.44	99.76
C18:2T <u>Linoelaidate</u>	1.99	2.02	1.97	1.97	2	99.50	101.00	98.50	98.50
C18:2 Linoleic acid	34.02	34.13	34	34.29	34	100.06	100.38	100.00	100.85
C20:0 Arachic acid	0.55	0.58	0.51	0.51	0.5	110.00	116.00	102.00	102.00
C18:3 Linolenic acid	1.09	1.06	1.15	1.17	1	109.00	106.00	115.00	117.00
C22:0 <u>Behemic acid</u>	0.53	0.57	0.51	0.48	0.5	106.00	114.00	102.00	96.00

## 5.2 Cromatogramas de los 4 métodos lanzados en una misma secuencia con el estándar Nu-Chek 67

En el presente cromatograma (Imagen 6), se aprecian los 4 métodos lanzados en una misma secuencia con el estándar Nu-Chek 67 al igual que los picos correspondientes. Estos difieren un poco en su posición debido al tiempo de elución, el cual varía dependiendo de la metodología. La primera dio un tiempo de corrida de 90.73 minutos, la segunda fue de 74 minutos, la tercera dio 84.13 minutos y finalmente la cuarta tardó 78.07 minutos.

**Imagen 6. Cromatogramas de los 4 métodos con el estándar Nu-Chek 67**

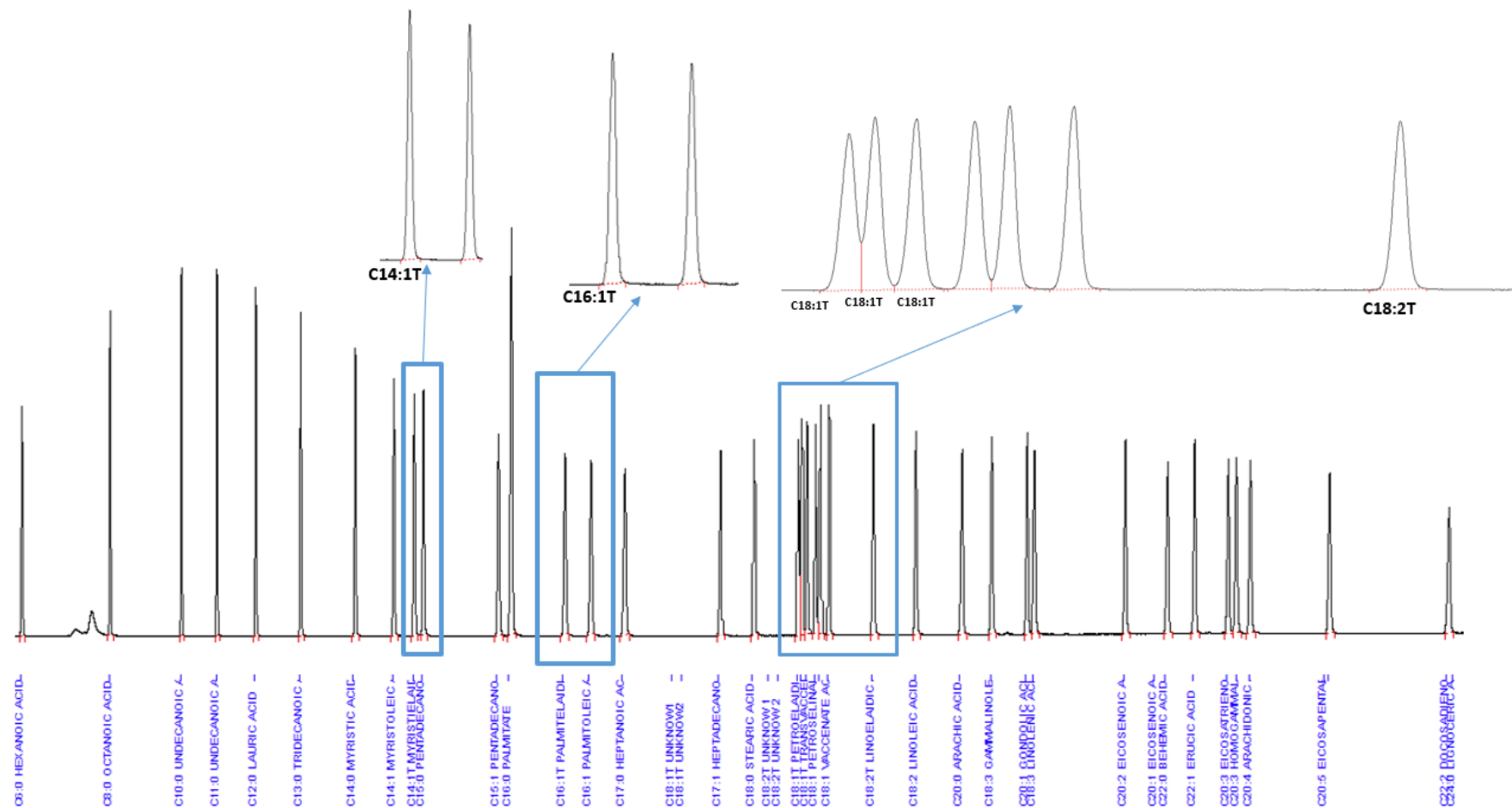




### **5.3 Cromatograma del estándar Nu-Chek 607 con la metodología seleccionada**

El siguiente cromatograma (Imagen 7) pertenece a la secuencia lanzada con los parámetros instrumentales del método 4 (16) para el estándar Nu-Chek 607. En este se aprecian los picos de los 39 ácidos grasos identificados, entre los cuales, se encuentran los 6 ácidos trans (C14:1T Miristelaidato de metilo, C16:1T Palmitelaidato de metilo, C18:1T Petroelaidato de metilo, C18:1T Elaidato de metilo, C18:1T Transvacenato de metilo, C18:2T Linoelaidato de metilo) a cuantificar.

Imagen 7. Cromatograma del Estandar Nu-Chek 607 con el método Yi Chen (16).



**5.4 Tabla con las áreas de los ácidos grasos trans en distintas concentraciones del estándar Nu-Chek 607**

En la Tabla N° 2 se aprecian las áreas de todos los ácidos grasos *trans* que se identificaron luego de lanzar una secuencia con el estándar Nu-Chek 607 a distintas concentraciones, desde 10 ppm hasta 800 ppm, esto con la finalidad de construir la curva de calibración para poder determinar más adelante los límites de detección y cuantificación correspondientes a cada ácido graso *trans* presente.

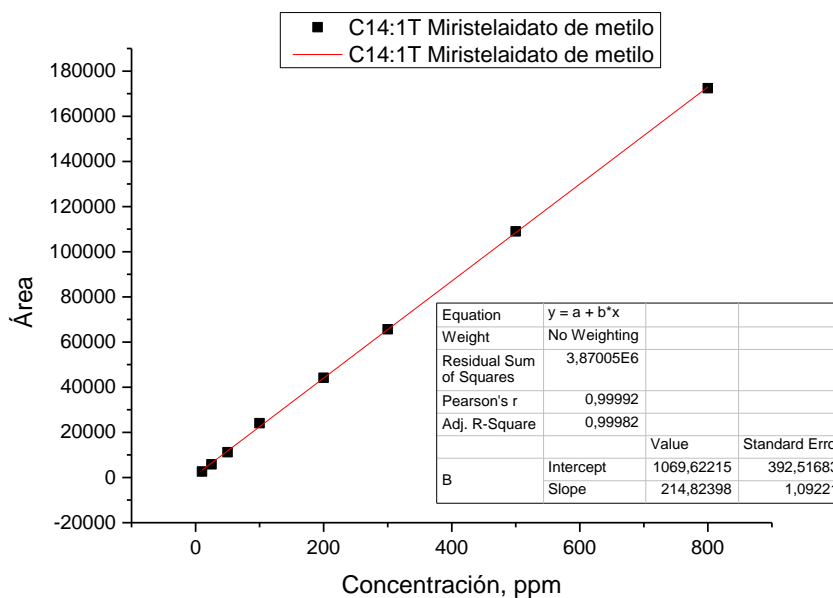
**Tabla N° 2. Áreas de los ácidos grasos trans presentes en el estándar Nu-Chek 607 en distintas concentraciones.**

Nu-Chek 607								
ÁCIDOS GRASOS TRANS	Área [uV*sec]							
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	500 ppm	800 ppm
<b>C14:1T Miristelaidato de metilo</b>	2646.33	5858.76	11225.27	24067.72	44151.93	65626.01	108998.98	172407.57
<b>C16:1T Palmitelaidato de metilo</b>	2456.08	5898.8	11192.16	24438.72	44635.12	67016.88	110240.68	175302.38
<b>C18:1T Petroelaidato de metilo</b>	2591.96	5962.38	11436.32	24344.8	44942.21	66687.98	110249.44	174930.36
<b>C18:1T Elaidato de metilo</b>	2591.96	6089.01	11735.27	25081.80	45768.76	67916.44	112689.49	177610.78
<b>C18:1T Transvacenato de metilo</b>	2517.32	5618.26	11498.69	25128.23	44664.83	67227.18	111362.44	174705.46
<b>C18:2T Linoelaidato de metilo</b>	2811.46	5505.25	11838.72	24599.58	45387.59	67102.80	111955.19	177810.20

## 5.5 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) para los ácidos grasos *trans* se calcularon en base a la Tabla N° 2 con ayuda del programa Origin.

**Imagen 8. Curva de calibración para el C14:1T Miristelaidato de metilo**



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{392,51683}{214,82398} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{392,51683}{214,82398} \right)$$

$$LD = 6,03 \text{ ppm}$$

- LQ

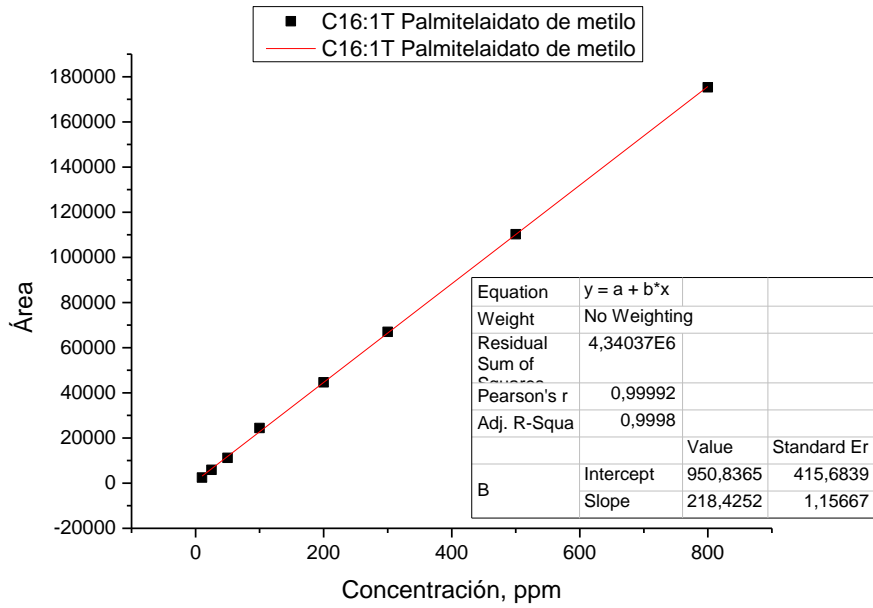
$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{392,51683}{214,82398} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{392,51683}{214,82398} \right)$$

$$LQ = 18,27 \text{ ppm}$$

**Imagen 9. Curva de calibración para el C16:1T Palmitelaidato de metilo.**



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{415,6839}{218,4252} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{415,6839}{218,4252} \right)$$

$$LD = 6,28 \text{ ppm}$$

- LQ

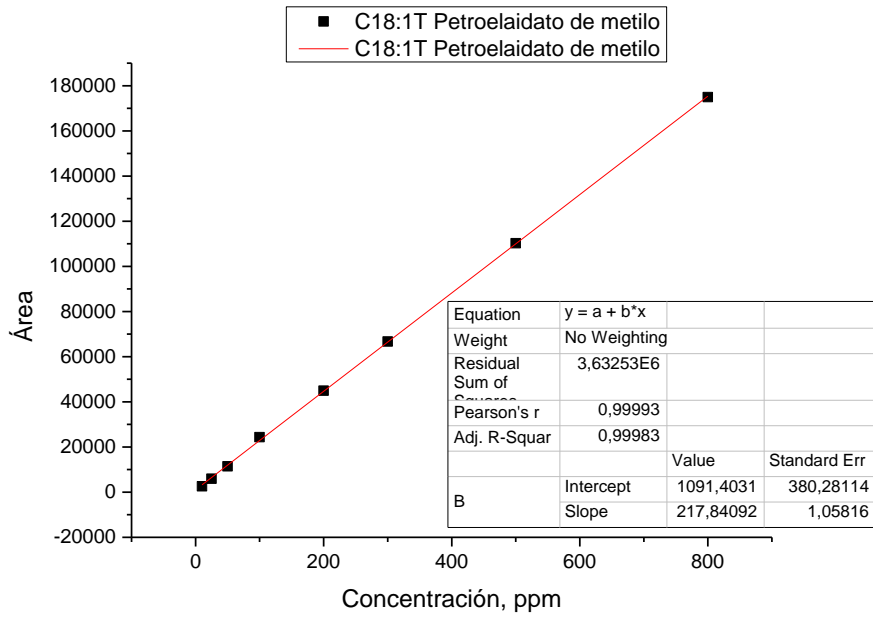
$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{415,6839}{218,4252} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{415,6839}{218,4252} \right)$$

$$LQ = 19,03 \text{ ppm}$$

**Imagen 10. Curva de calibración para el C18:1T Petroelaidato de metilo.**



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{380,28114}{217,84092} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{380,28114}{217,84092} \right)$$

$$LD = 5,76 \text{ ppm}$$

- LQ

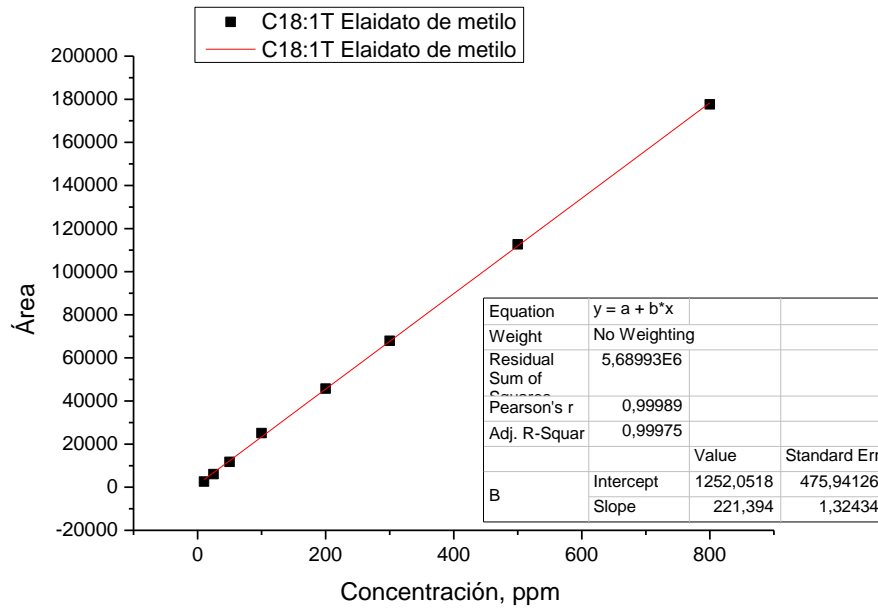
$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{380,28114}{217,84092} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{380,28114}{217,84092} \right)$$

$$LQ = 17,46 \text{ ppm}$$

**Imagen 11. Curva de calibración para el C18:1T Elaidato de metilo.**



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{475,94126}{221,394} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{475,94126}{221,394} \right)$$

$$LD = 7,09 \text{ ppm}$$

- LQ

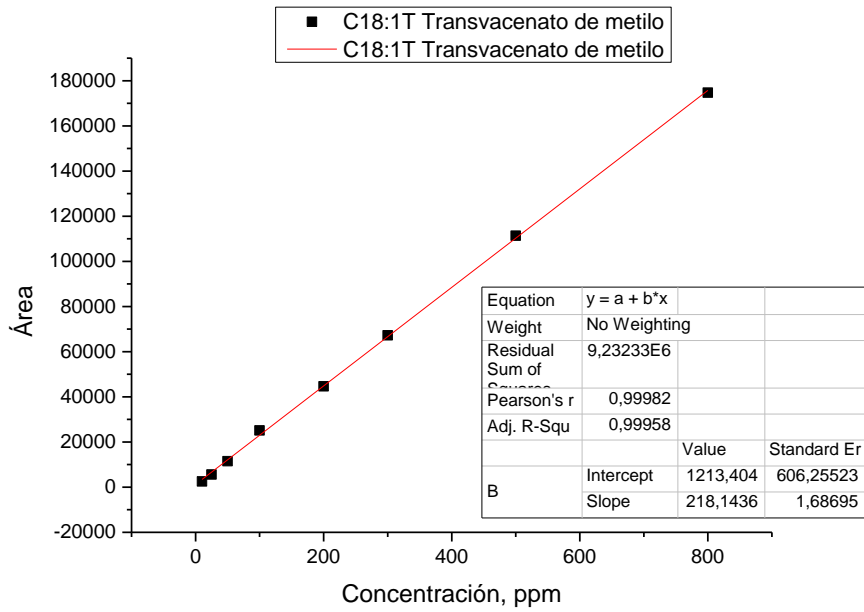
$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{475,94126}{221,394} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{475,94126}{221,394} \right)$$

$$LQ = 21,50 \text{ ppm}$$

Imagen 12. Curva de calibración para el C18:1T Transvacenato de metilo.



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{606,25523}{218,1436} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{606,25523}{218,1436} \right)$$

$$LD = 9,17 \text{ ppm}$$

- LQ

$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

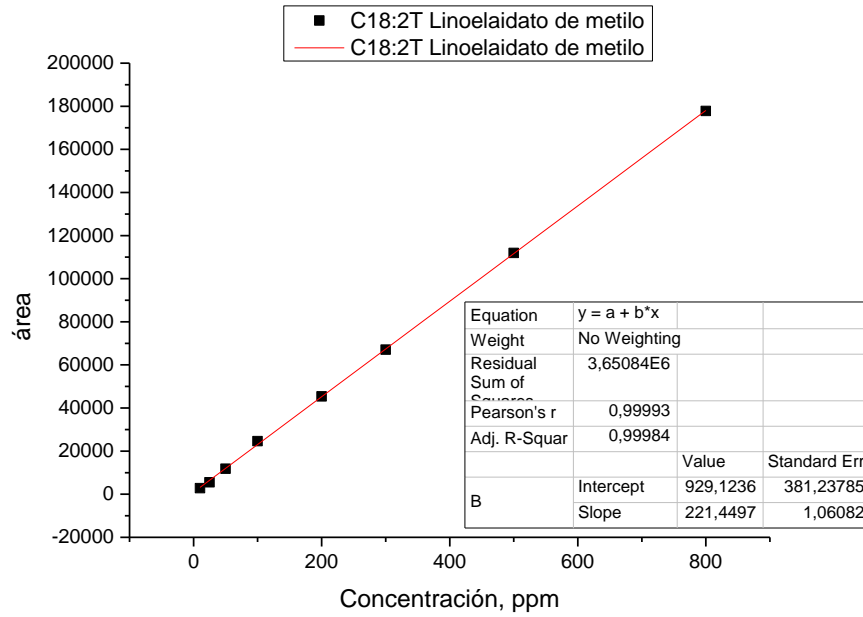
$$LQ = 10 \left( \frac{606,25523}{218,1436} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{606,25523}{218,1436} \right)$$

$$LQ = 27,79 \text{ ppm}$$



Imagen 13. Curva de calibración para el C18:2T Linoelaidato de metilo.



Calculando los valores de LD y LQ:

- LD

$$LD = 3,3 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{381,23785}{221,4497} \right)$$

$$LD = 3,3 \left( \frac{381,23785}{221,4497} \right)$$

$$LD = 5,68 \text{ ppm}$$

- LQ

$$LQ = 10 \left( \frac{s}{m} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{381,23785}{221,4497} \right)$$

$$LQ = 10 \left( \frac{381,23785}{221,4497} \right)$$

$$LQ = 17,22 \text{ ppm}$$

**5.6 Tabla con las sumatorias de los ácidos grasos trans C18:1T y C18:2T del patrón interno (Muestra interlaboratorio aceite de soya) para determinar la exactitud**

La tabla N° 3 proporciona la información de la sumatoria de las áreas de los ácidos grasos trans C18:1T y C18:2T del patrón interno. Ésta será comparada con los datos brindados por el certificado del patrón (Ver anexos, Imagen 4).

**Tabla N° 3 Porcentaje de las sumatorias de las áreas de los ácidos grasos trans C18:1T y C18:2T del patrón interno (Muestra interlaboratorio aceite de soya.**

	<b>C18:1T Petroelaidato de metilo</b>	<b>C18:1T Elaidato de metilo</b>	<b>C18:1T Desconocido 1</b>	<b>C18:1T Transvacenato de metilo</b>	<b>C18:1T Desconocido 2</b>	<b>ΣC18:1T</b>	<b>C18:2T Desconocido 1</b>	<b>C18:2T Desconocido 1</b>	<b>C18:2T Linoelaidato de metilo</b>	<b>ΣC18:2T</b>
<b>Rep 1</b>	3.22	3.05	6.43	5.53	3.02	21.25	0.8	0.51	1.47	2.78
<b>Rep 2</b>	3.15	3.29	5.93	5.5	3.07	20.94	0.82	0.53	1.45	2.8
<b>Rep 3</b>	3.06	3.18	6.31	5.34	3.07	20.96	0.87	0.5	1.43	2.8
<b>Rep 4</b>	3.17	3.14	6.44	5.52	3.12	21.39	0.81	0.52	1.41	2.74
<b>Rep 5</b>	3.26	3.05	6.36	5.32	3.05	21.04	0.85	0.57	1.45	2.87
<b>Rep 6</b>	3.01	3.3	6.04	5.52	3	20.87	0.83	0.52	1.42	2.77
<b>Media</b>	3.15	3.17	6.25	5.46	3.06	<b>21.08</b>	0.83	0.53	1.44	<b>2.79</b>

### **5.7 Tabla con las repeticiones intradiarias para determinar la precisión**

En la Tabla N° 4, se observan las 6 repeticiones que se efectuaron de manera intradiaria con el patrón interno (Muestra interlaboratorio de aceite de soya) para garantizar la precisión del método.

**Tabla N° 4 Repeticiones intradiarias del patrón interno para garantizar la precisión de la metodología.**

	<b>C18:1T Petroelaidato de metilo</b>	<b>C18:1T Elaidato de metilo</b>	<b>C18:1T Desconocido 1</b>	<b>C18:1T Transvacenato de metilo</b>	<b>C18:1T Desconocido 2</b>	<b>C18:2T Desconocido 1</b>	<b>C18:2T Desconocido 1</b>	<b>C18:2T Linoelaidato de metilo</b>
<b>Rep 1</b>	17842.27	16900.33	35689.03	30665.72	16773.39	4358.92	2823.51	7855.52
<b>Rep 2</b>	18169.2	18936.69	34194.05	31678.94	17675.87	4425.86	2177.29	7882.31
<b>Rep 3</b>	17715.57	18449.12	36539.16	30914.91	17764.12	4158.06	2531.63	8030.94
<b>Rep 4</b>	17654.02	17495.59	35881.44	30766.94	17374.01	4384.72	2848.49	7129.56
<b>Rep 5</b>	18435.67	17247.18	35953.76	30080.24	17241.47	4718.15	2426.29	7489.67
<b>Rep 6</b>	17665.67	19377.23	35474.14	32409.51	17653.61	4720.34	3025.82	7724.56
<b>Media</b>	17913.73	18067.69	35621.93	31086.04	17413.75	4461.01	2638.84	7685.43
<b>Desviación estándar</b>	319.70	997.88	785.36	827.35	371.57	220.29	315.44	327.39
<b>%RSD</b>	<b>1.78</b>	<b>5.52</b>	2.20	<b>2.66</b>	2.13	4.94	11.95	<b>4.26</b>

\* Debido a que el material de referencia no cuenta con los ácidos grasos C14:1T Miristelaidato de metilo y C16:1T Palmitelaidato de metilo, se realizó la determinación con los ácidos grasos trans restantes.

## 6 DISCUSIÓN

Se puede observar en la Tabla N°1 los distintos porcentajes de recuperación para cada ácido graso presente en la secuencia con el estándar Nu-Chek 67, estos están en un rango entre 96% y 117%. Acorde con los resultados señalados en la investigación efectuada por Yi Chen.et.al (16), el porcentaje de recuperación aceptable oscila entre 89.46% y 115.72%, sin embargo, ellos se basan en otros límites para que sea aceptable su rango, y es que en la literatura reportada por Cajka T.et.al (19), su porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rangos de 70% y 120%, teniendo como premisa esto, el rango obtenido de porcentaje de recuperación, para las cuatro metodologías estaría dentro de lo aceptable.

La razón por la que algunos porcentajes de recuperación exceden el 100 %, es porque la señal de elución de los picos está saliendo por encima de la señal base 0, ocasionando que el Software (TotalChrom 6.1) al momento trazar la línea base por debajo de las áreas de los picos para integrarlo, tome partes que no sean netamente de la señal proveniente del ácido graso, integrando parte de “ruido”, originando porcentajes más allá del 100%.

La elección de la metodología se basa en el cromatograma de la Imagen 6, en donde se aprecian todos los picos eluidos, integrados e identificados. El **Método 1**- De la Fuente M (14) posee el mayor tiempo de elución (90.73 minutos) de toda la secuencia con las 4 metodologías distintas, siendo este el menos eficiente en términos de tiempo de análisis. El **Método 2**- Pojjanapornpun S (2) y el **Método 3** - Nimal Ratnayake (15), no manifiestan tiempos de elución extensos, sin embargo, estos presentan señales de ruido o

interferencias que generan falsos picos que terminarán siendo integrados por el programa y finalmente apareciendo en el reporte de resultados, si bien estos pueden ser eliminados mediante una corrección de la línea base con el programa, al hacer esto, se estaría sustrayendo parte del área de los demás picos del cromatograma, afectando los valores reales de los ácidos grasos a cuantificar. Por último, el **Método 4** - Yi Chen (16), a pesar de que su tiempo de elución no es el más corto entre las cuatro metodologías (78.07 minutos), es el más adecuado en términos de resolución y presencia de interferentes, ya que no es necesario aplicar una corrección de la línea base para poder eliminar estos, y a su vez, su cromatograma presenta picos resueltos con una adecuada separación. Por lo mencionado anteriormente, se escogió como la metodología más óptima el **Método 4** - Yi Chen (16) para continuar el procedimiento de validación.

La identificación de los picos del estándar Nu-Chek 607 en la Imagen 7 se vio facilitada gracias a que se reconocieron todos los picos del estándar Nu-Chek 67 al momento de elegir la metodología para la validación y gracias a los resultados reportados en la investigación de Yi Chen (16), ya que sin ambos recursos hubiese sido un trabajo de mayor envergadura debido a que el estándar Nu-Chek 607, como se aprecia en el Cuadro 1 (Ver anexos) , presenta solo un ácido graso (C16:0 Palmitato de metilo) con un porcentaje de peso distinto a los demás. Por otro lado, hubo complicaciones para la separación de los ácidos grasos C18:1T Petroelaidato de metilo, C18:1T Elaidato de metilo, C18:1T Transvacenato de metilo, como se puede observar en la Imagen 7, el programa

de manera automática efectúa un rearrreglo para poder separar los picos, ya que estos eluyen en tiempos muy cercanos.

La concentración del estándar Nu-Chek 607 fue de 1000 ppm, por lo que fue necesario realizar diluciones y concentraciones de 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 500 ppm y finalmente 800 ppm para generar curva de calibración, con la cual, posteriormente se calculó los valores de LD y LQ de cada ácido graso *trans* seleccionado. No fue posible trabajar a concentraciones menores a 10 ppm ya que la intensidad de pico disminuye drásticamente, afectando la cuantificación de ácidos grasos *trans*. Esta presencia de ruido se interpreta como una señal de advertencia de que se está llegando al límite de cuantificación.

Las variaciones en cuanto a la proporción de LD y LQ, pueden atribuirse a las distintas respuestas del GC a los analitos. Los LD oscilaron entre 5.68 y 9.17 ppm, mientras que los LQ estuvieron en el rango de 17.22 y 27.79 ppm.

La media de las sumatorias de la proporción de ácidos grasos *trans* C18:1 y C18:2 contemplados en la Tabla 3 fue de 21.08 y 2.79 respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los límites de tolerancia propuestos (Ver Anexos, Imagen 4) en donde indican que el porcentaje de error tiene que ser menor a 23% para C18:1 y 27.86% para C18:2, garantizando la exactitud de la metodología.

El %RSD de la Tabla N°4 para los ácidos grasos *trans* se encuentra en el rango de 1.78 % - 5.52 %, dado que este se encuentra por debajo del 10% indica consistencia y fiabilidad de los datos, ya que estos presentan una baja



dispersión, asimismo el reporte de resultados brindado por De Koning S.et.al (18) para una muestra de aceite de pescado, arroja un rango de %RSD entre 1.5% - 11.95 %, con ello se comprueba la precisión de la metodología aplicada para la validación de los ácidos grasos trans.

## 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones:

**OG.** Se realizó la validación método analítico “**Método 4 - Yi Chen**” para el análisis cuantitativo de grasas *trans* en muestras de aceites vegetales con los parámetros de calidad propuestos, debido que este método presenta un tiempo de análisis aceptable y buena separación de los picos que forman parte del cromatograma.

**OE 1.** Los cuatro métodos, **Método 1-** De la Fuente M, **Método 2-** Pojjanapornpun S, **Método 3 -** Nimal Ratnayake, **Método 4 -** Yi Chen, fueron comparados en función a los porcentajes de recuperación de los ácidos grasos presentes en el estándar Nu-Chek 67, obteniéndose valores de porcentaje de recuperación que se encuentran dentro del rango de 96% y 117%. Tomando como criterio de aceptación el propuesto por Cajka T.et.al (19), el cual considera que el porcentaje de recuperación puede estar dentro del rango de 70 a 120 %. De acuerdo a la información expuesta previamente, todos los métodos son factibles para la cuantificación de ácidos grasos trans.

**OE 2.** De las cuatro metodologías propuestas (**Método 1-** De la Fuente M, **Método 2-** Pojjanapornpun S, **Método 3 -** Nimal Ratnayake, **Método 4 -** Yi Chen), se escogió el **Método 4 –** Yi Chen como el más adecuado para la determinación de las grasas trans, ya que presenta menor relación señal/ruido y mejor resolución, asimismo, demuestra un menor tiempo de análisis (78.07 minutos).

**OE 3.** Se determinaron los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) para el **Método 4** – Yi Chen, los cuales fueron: Para C14:1T Miristelaidato de metilo, LD 6.03 ppm, LQ 18.27 ppm; C16:1T Palmitelaidato de metilo LD 6.28 ppm, LQ 19.03 ppm; C18:1T Petroelaidato de metilo LD 5.76 ppm, LQ 17.46 ppm; C18:1T Elaidato de metilo LD 7.09 ppm, LQ 21.50 ppm; C18:1T Transvacenato de metilo LD 9.17 ppm, LQ 27.79 ppm y finalmente para C18:2T Linoelaidato de metilo LD 5.68 ppm, LQ 17.22 ppm.

**OE 4.** El método presenta exactitud, ya que los valores de la sumatoria de las medias de los ácidos grasos C18:1 y C18:2 son 21.08 y 2.79 respectivamente, y según el certificado del interlaboratorio, los límites de tolerancia propuestos para los ácidos grasos C18:1 van desde 17.20 hasta 27.46 y para C18:2 oscila entre 2.64 y 4.68. Los valores de la sumatoria de las medidas de los ácidos grasos, tanto los del C18:1 y C18:2, se encuentran dentro de las tolerancias del certificado del interlaboratorio.

**OE 5.** La metodología seleccionada presenta buena precisión, ya que el valor del %RSD se encuentra entre 1.78% y 5.52%, y el autor del **Método 4** - Yi Chen indica que el %RSD tiene que estar entre un rango de 1.5% y 11%.

### **Recomendaciones:**

- Se recomienda trazar la línea base de forma manual para los picos con concentraciones pequeñas, que no presenten buena separación o que manifiesten un ruido significativo, esto con el fin de contrarrestar el efecto señal de fondo y así obtener un porcentaje de área más real, el cual luego será cuantificado.
- A largo plazo, se recomienda construir un diagrama de control (se sugiere realizar un tipo de prueba estadística como Test de Shapiro-Wilk para determinar si presenta una distribución normal, de presentarla, se realiza una prueba de t-student, por otro lado, de no presentar normalidad se efectúa una prueba de U Mann - Whitney) teniendo como variable dependiente el contenido de ácidos grasos y como variable independiente, el tipo de aceite. Con ello se garantizaría una confiabilidad de los resultados.
- Finalmente, se recomienda realizar un estudio de la etapa de pretratamiento de la muestra en la cual se sustituya el tolueno por la acetona, debido a que en la investigación de Miyuranga KAV.et.al (20) indica que la acetona demuestra un mayor rendimiento con menores tiempos de reacción, impulsando la transterificación. Por otro lado, el tolueno es un compuesto no amigable con el medio ambiente y con efectos adversos para la salud humana. Se aconseja la manipulación de este reactivo en una campana extractora.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Mossoba M, Kramer J. Official methods for the determination of trans fat. 2nd edn. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 7th Edition. Champaign, IL: AOCS;
2. Pojjanapornpun S, Nakornsadet A, Sombutsuwan P, Chumsantea S, Krisnangkura K, Aryusuk K. Simulation of fatty acid peak profile on a 100-m CP-Sil 88 column and application for analysis of commercial trans fat alternatives in Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2020 Aug 1; 91:103525.
3. Zhang Q, Liu C, Sun Z, Hu X, Shen Q, Wu J. Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chem*. 2012 Jun 1;132(3):1607–13.
4. Lída M, Netušilová K, Franěk L, Dvořáková H, Vrkoslav V, Holčapek M. Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection. *J Chromatogr A*. 2011 Oct 21;1218(42):7499–510.
5. Ginter E. New data on harmful effects of trans-fatty acids. *Science Citation Index Expanded and in Journal Citation Reports/Science Edition Bratisl Med J [Internet]*. 2016 [cited 2023 Nov 18];117(5). Available from: [www.elis.sk](http://www.elis.sk).
6. Restrepo BJ, Rieger M. Denmark's Policy on Artificial Trans Fat and Cardiovascular Disease. [cited 2023 Nov 18]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2015.06.018>

7. Downs SM, Thow AM, Leeder SR. Systematic reviews The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. Bull World Health Organ [Internet]. 2013 [cited 2023 Nov 18]; Available from: <http://www.who>.
8. Hirata Y. trans-Fatty Acids as an Enhancer of Inflammation and Cell Death: Molecular Basis for Their Pathological Actions. Biol Pharm Bull [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Nov 18];44(10):1349–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34602541>.
9. Ministerio de salud. DECRETO SUPREMO QUE MODIFICA EL MANUAL DE ADVERTENCIAS PUBLICITARIAS, APROBADO POR DECRETO SUPREMO N° 012-2018-SA, EN EL MARCO DE LO ESTABLECIDO EN LA LEY N° 30021, LEY DE PROMOCION DE LA ALIMENTACION SALUDABLE PARA NINOS, NINAS Y ADOLESCENTES, Y SU REGLAMENTO APROBADO POR DECRETO SUPREMO N° 017-2017-SA [Internet]. 2023. Available from: [www.qob.pe/mef](http://www.qob.pe/mef).
10. Akash MSH, Rehman K. Gas Chromatography. Essentials of Pharmaceutical Analysis [Internet]. 2020 [cited 2023 Dec 11];185–93. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7\\_15](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7_15).
11. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR, Mora Lugo E de la. Fundamentos de química analítica / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R., Crouch; traducción Dr. Eugenio de la Mora Lugo, M. en C. Jesús Miguel Torres Flores. 900–901 p.

12. Cordero C, Liberto E, Sgorbini B, Rubiolo P, Bicchi C. Gas Chromatography. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. 2012 Jan 1;311–73.
13. Al-Bukhaiti WQ, Noman A, Qasim AS, Al-Farga A. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *Int J Agric Innov Res*. 2017;6(1):2319–1473.
14. de la Fuente MA, Rodríguez-Pino V, Juárez M. Use of an extremely polar 100-m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles. *Int Dairy J*. 2015 Aug 1; 47:52–63.
15. Ratnayake WMN, Cruz-Hernandez C. Analysis of trans fatty acids of partially hydrogenated vegetable oils and dairy products. *Trans Fatty Acids in Human Nutrition: Second Edition*. 2012 Jan 1;105–46.
16. Chen Y, Yang Y, Nie S, Yang X, Wang Y, Yang M, et al. The analysis of trans fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method. *Food Control*. 2014 Oct 1; 44:191–7.
17. Fda, Cder. Q2(R2) VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES [Internet]. [cited 2024 Jan 11]. Available from: <https://www.regulations.gov/document/FDA-2022-D-1503-0002>.
18. De Koning S, Van Der Meer B, Alkema G, Janssen HG, Brinkman UAT. Automated determination of fatty acid methyl ester and cis/trans methyl ester composition of fats and oils. *J Chromatogr A*. 2001 Jul 13;922(1–2):391–7.

19. Cajka T, Hajslova J, Lacina O, Mastovska K, Lehotay SJ. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection–low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008 Apr 4;1186(1–2):281–94.
20. Miyuranga KAV, Balasuriya BMCM, Arachchige USPR, Jayasinghe RA, Weerasekara NA. A Comparative Analysis of Impact of Hexane, Diethyl Ether, Toluene and Acetone on Biodiesel Transesterification Process. *Asian Journal of Chemistry* [Internet]. 2022 Sep 19 [cited 2024 Jan 16];34(10):2545–50. Available from: [https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/view/34\\_10\\_](https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/view/34_10_)



## ANEXOS

**Cuadro 1. Contenido de ácidos grasos de la solución estándar Nu-Chek 607.**

<b>Cadena</b>	<b>Ácido graso</b>	<b>%w/w</b>
C4:0	Butirato de metilo	2.5
C6:0	Exanoato de metilo	2.5
C8:0	Octanato de metilo	2.5
C10:0	Decanato de metilo	2.5
C11:0	Undecanoato de metilo	2.5
C12:0	Laurato de metilo	2.5
C13:0	Tridecanoato de metilo	2.5
C14:0	Miristato de metilo	2.5
C14:1	Miristoleato de metilo	2.5
C14:1t	Miristelaidato de metilo	2.5
C15:0	Pentadecanato de metilo	2.5
C15:1	10-undecanoato de metilo	2.5
C16:0	Palmitato de metilo	5.0
C16:1T	Palmitelaidato de metilo	2.5
C16:1	Palmitoleato de metilo	2.5
C17:0	Heptadecanoato de metilo	2.5
C17:1	10-heptadecenoato de metilo	2.5
C18:0	Estearato de metilo	2.5
G18:1T	Petroelaidato de metilo	2.5
C18:1T	Elaidato de metilo	2.5
C18:1T	Transvacenato de metilo	2.5
C18:1	Petroselinato de metilo	2.5
C18:1	Metil vaccenato	2.5
C18:1	Oleato de metilo	2.5
C18:2TT	Linoelaidato de metilo	2.5
C18:2	Linoleato de metilo	2.5

C18:3	Metil alfa linolenato	2.5
C18:3	Metil gamma linolenato	2.5
C20:0	Araquidato de metilo	2.5
C20:1	11-eicosanoato de metilo	2.5
C20:2	11-14 eicosadienoato de metilo	2.5
C22:0	Bemenato de metilo	2.5
C22:1	Erucato de metilo	2.5
C20:3	Metil 11-14-17 eicosatrienato	2.5
C20:3	Linolenato de metilo homogamma	2.5
C20:4	Araquidonato de metilo	2.5
C24:1	Nervonato de metilo	2.5
C22:2	Docosadienoato de metilo	2.5
C22:6	Docosahexaenoato de metilo	2.5

**Cuadro 2. Contenido de ácidos grasos de la solución Nu-Chek 67.**

C14:0	Miristato De Metilo	1.0
C16:0	Palmitato De Metilo	10.0
C18:0	Estearato De Metilo	6.0
C18:1	Oleato De Metilo	25.0
C18:1t	Elaidato De Metilo	20.0
C18:2	Linoleato De Metilo	34.0
C18:2tt	Linoelaidato De Metilo	2.0
C18:3	Alfa Linolenato De Metilo	1.0
C20:0	Araquidonato De Metilo	0.5
C22:0	Behenato De Metilo	0.5

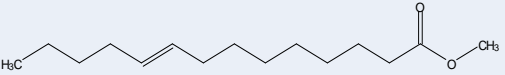
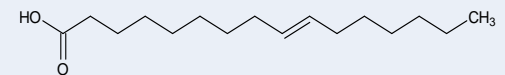
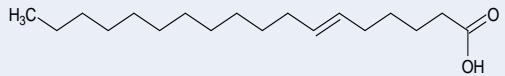
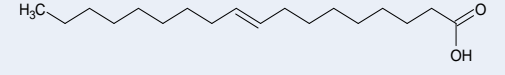
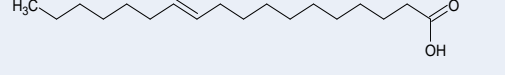
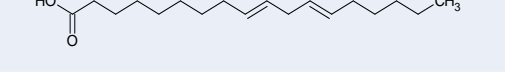
**Cuadro 3. Matriz de consistencia.**

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>VARIABLES/INDICADORES</b>	<b>TIPO DE ESTUDIO</b>
<b>Pregunta:</b>	<b>Objetivo General:</b>	<b>Hipótesis General</b>	<b>Variable(s) Dependiente(s)</b>	<b>Tipo de estudio</b>
En el laboratorio, ¿Validar un método analítico permitirá contar con un método más confiable, exacto y preciso en la determinación de ácidos grasos trans?	<b>OG:</b> Validar un método analítico para el análisis cuantitativo de grasas trans en muestras de aceites, en el laboratorio Alex Stewart.	<b>HG:</b> La validación del método analítico para la determinación cuantitativa de ácidos grasos trans en aceites nos permitirá obtener un método confiable.	Contenido de ácidos grasos	Hipotético deductivo prospectivo transversal
<b>P:</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>		<b>Diseño</b>
<b>I/E:</b>	<b>OE 1:</b> Comparar 4 métodos cromatográficos en términos de	<b>HE 1:</b> La optimización de los parámetros instrumentales permite un análisis cuantitativo confiable.	<b>Variable(s) Independientes(s)</b> Tipo de aceite.	Pseudo experimental

	porcentaje de recuperación.			
<b>O:</b>	<b>OE 2:</b> Seleccionar la metodología más adecuada para la determinación de las grasas trans en términos de tiempo de elución, resolución y ruido.	<b>HE 2:</b> La determinación de los parámetros de calidad garantiza un análisis cuantitativo confiable.		<b>Población:</b> Clientes
	<b>OE 3:</b> Determinar el límite de detección y cuantificación de la metodología seleccionada.	<b>HE 3:</b>		
	<b>OE 4:</b> Determinar la exactitud de la metodología seleccionada.			<b>Muestra:</b> Ácidos grasos trans

	<b>OE 5:</b> Determinar la precisión de la metodología seleccionada.			
--	--	--	--	--

**Cuadro 4. Ácidos grasos trans presentes en el estándar Nu-Chek 607.**

ÁCIDOS GRASOS TRANS	ESTRUCTURAS
C14:1T Miristelaidato de metilo	
C16:1T Palmitelaidato de metilo	
C18:1T Petroelaidato de metilo	
C18:1T Elaidato de metilo	
C18:1T Transvacenato de metilo	
C18:2T Linoelaidato de metilo	

**Imagen 1. Columna cromatográfica CP-Sil 88 for FAME GC Column, 100 m,  
0.25 mm, 0.20  $\mu$ m.**





**Imagen 2. Certificado del estándar Nu-Chek 607.**

**NU-CHEK-PREP, INC.**

P.O. Box 295  
 109 West Main St.,  
 Elysian, MN 56028 U.S.A.  
 Phone: (507) 267-4689 or (507) 267-4582  
 Fax: (507) 267-4790  
 E-Mail: info@nuchekprep.com  
 On the Web: nu-chekprep.com



*The Home of Fine Lipid Organics*

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

GLC REFERENCE STANDARD: GLC 607

EXPIRATION DATE: ONCE VIAL IS OPENED, 6 MONTHS UNDER GOOD STORAGE  
 CONDITIONS. UNLIMITED IF VIAL IS NOT OPENED AND STORED AT 0° C.

CHAIN	ITEM	WEIGHT %	ITEM PURITY%
C4:0	METHYL BUTYRATE	2.5	99.9
C6:0	METHYL HEXANOATE	2.5	99.8
C8:0	METHYL OCTANOATE	2.5	99.9
C10:0	METHYL DECANOATE	2.5	99.9
C11:0	METHYL UNDECANOATE	2.5	99.8
C12:0	METHYL LAURATE	2.5	99.7
C13:0	METHYL TRIDECANOATE	2.5	99.8
C14:0	METHYL MYRISTATE	2.5	99.9
C14:1	METHYL MYRISTOLEATE	2.5	99.6
C14:1T	METHYL MYRISTELAIDATE	2.5	99.5
C15:0	METHYL PENTADECANOATE	2.5	99.7
C15:1	METHYL 10-PENTADECENOATE	2.5	99.6
C16:0	METHYL PALMITATE	5.0	99.9
C16:1T	METHYL PALMITELAIDATE	2.5	99.7
C16:1	METHYL PALMITOLEATE	2.5	99.7
C17:0	METHYL HEPTADECANOATE	2.5	99.7
C17:1	METHYL 10-HEPTADECENOATE	2.5	99.6
C18:0	METHYL STEARATE	2.5	99.9
C18:1T	METHYL PETROELAIDATE	2.5	99.8
C18:1	METHYL ELAIDATE	2.5	99.8
C18:1T	METHYL TRANSVACCENATE	2.5	99.7
C18:1	METHYL PETROSELINATE	2.5	99.7
C18:1	METHYL VACCENATE	2.5	99.7
C18:1	METHYL OLEATE	2.5	99.8
C18:2T	METHYL LINOELAIDATE	2.5	99.6
C18:2	METHYL LINOLEATE	2.5	99.9
C18:3	METHYL LINOLENATE	2.5	99.7
C18:3	METHYL GAMMA LINOLENATE	2.5	99.6
C20:0	METHYL ARACHIDATE	2.5	99.8
C20:1	METHYL 11-EICOSENOATE	2.5	99.7
C20:2	METHYL 11-14 EICOSADIENOATE	2.5	99.6
C22:0	METHYL BEHENATE	2.5	99.7
C22:1	METHYL ERUCATE	2.5	99.6
C20:3	METHYL 11-14-17 EICOSATRIENOATE	2.5	99.6
C20:3	METHYL HOMOGAMMA LINOLENATE	2.5	99.5
C20:4	METHYL ARACHIDONATE	2.5	99.5
C24:1	METHYL NERVONATE	2.5	99.7
C22:2	METHYL DOCOSADIENOATE	2.5	99.6
C22:6	METHYL DOCOSAHEXAENOATE	2.5	99.6

WE CERTIFY THAT THIS LOT CONFORMS TO THE PRODUCT SPECIFICATIONS AND HAS BEEN RELEASED FOR SALE.  
 THE ABOVE STANDARD IS WEIGHED TO AT LEAST THE THIRD DECIMAL PLACE THEREBY INSURING A HIGH DEGREE OF  
 ACCURACY.

COUNTRY OF ORIGIN: U.S.A.

**NU-CHEK PREP, INC.**

B.W.  
 7-12-14



P.O. BOX 295  
 109 W. MAIN STREET  
 ELYSIAN, MN 56028  
 USA

### Imagen 3. Certificado del estándar Nu-Chek 67.

## NU-CHEK-PREP, INC.

P.O. Box 295  
109 West Main St.,  
Elysian, MN 56028 U.S.A.  
Phone: (507) 267-4689 or (507) 267-4582  
Fax: (507) 267-4790  
E-Mail: [info@nuchekprep.com](mailto:info@nuchekprep.com)  
On the Web: [nu-chekprep.com](http://nu-chekprep.com)



*The Home of Fine Lipid Organics*

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

GLC REFERENCE STANDARD: 67 LOT: F12-Z

PREPARED BY: BRIAN NUTTER

EXPIRATION DATE:

ONCE VIAL IS OPENED, 6 MONTHS UNDER GOOD STORAGE CONDITIONS. UNLIMITED IF VIAL IS NOT OPENED AND STORED AT 0° C.

<u>CHAIN</u>	<u>ITEM</u>	<u>WEIGHT %</u>	<u>ITEM PURITY%</u>
C14:0	METHYL MYRISTATE	1.0	99.8
C16:0	METHYL PALMITATE	10.0	99.8
C18:0	METHYL STEARATE	6.0	99.8
C18:1	METHYL OLEATE	25.0	99.6
C18:1T	METHYL ELAIDATE	20.0	99.6
C18:2	METHYL LINOLEATE	34.0	99.7
C18:2T	METHYL LINOELAIDATE	2.0	99.6
C18:3	METHYL LINOLENATE	1.0	99.5
C20:0	METHYL ARACHIDATE	0.5	99.6
C22:0	METHYL BEHENATE	0.5	99.6

WE CERTIFY THIS LOT CONFORMS TO THE PRODUCT SPECIFICATIONS AND HAS BEEN RELEASED FOR SALE.

THE ABOVE STANDARD IS WEIGHED TO AT LEAST THE THIRD DECIMAL PLACE THEREBY INSURING A HIGH DEGREE OF ACCURACY.

COUNTRY OF ORIGIN: U.S.A.

**Imagen 4. Resultados del Inter laboratorio de la muestra de Aceite de Soya.**

27 trans Fatty Acids 2017-2018					
Analyst	C18:1 trans %	C18:2 trans %	C18:3 trans %	trans by GC Total	IR Total Cd 14-95
7229	-0.422	0.841	-0.327	-0.293	
7300	0.967	-0.786	-0.591	0.796	
8184	1.782	-1.492	-1.913		
8210	-0.094	-0.060	0.069	-0.128	
8636	0.783	-0.766	-0.459	0.619	
8979	-2.333	16.663	0.333	1.000	
-	-	-	-	-	-
Statistical method	ISO 13528	ISO 13528	ISO 13528	ISO 13528	ISO 13528
Assessment	Z <=2.000	Z <=2.000	Z <=2.000	Z <=2.000	Z <=2.000
Consensus value	22.33	3.66	.14	26.19	
Target s.d.	2.56	.51	.08	2.49	.00
Rel. SDPA	11.48 %	13.93 %	52.29 %	9.51 %	
Limit of reproducibility, R (2.80 X sR)	7.18	1.43	.21	6.97	
Rel. limit of reproducibility	32.15 %	39.01 %	146.40 %	26.61 %	
Lower limit of tolerance	17.20	2.64	-.01	21.21	
Upper limit of tolerance	27.46	4.68	.30	31.17	
Standard error	.43	.09	.01	.43	.92
No. of analysts that submitted results	36	36	35	34	2
No. of participants	38	38	38	38	38

Imagen 5. Certificado de la Columna cromatográfica CP-Sil 88.

