

Validación de un método de determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por cromatografía líquida de alta performance

Validation of a method for determination of fructose, glucose and saccharose by high performance liquid chromatography

Liliana Beatriz Figueroa,
Laura Hernaez y Marcelo Bello
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad
Agroalimentaria (Senasa)

Resumen

El presente trabajo describe la validación de un método de determinación del contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de miel multifloral, mediante cromatografía líquida de alta performance con detector de índice de refracción. Se estudiaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad interna, robustez e incertidumbre para los tres azúcares. Para el caso de la sacarosa también se evaluaron el mínimo nivel detectable y el mínimo nivel cuantificable.

Los resultados de la validación permiten afirmar que el método propuesto es adecuado para la cuantificación de los mencionados azúcares.

Palabras clave: validación, HPLC, miel, azúcares.

Abstract

This work describes the validation process of a method for determination of fructose, glucose and saccharose in multifloral honey by high performance liquid chromatography with refractive index detector.

The following parameters were studied: selectivity, linearity, repeatability, intralaboratory reproducibility, robustness and uncertainty. For saccharose, also the detection limit and the quantification limit were evaluated.

From the results of the validation process, it can be concluded that the proposed method is adequate for the quantification of the three sugars in honey.

Key words: validation, HPLC, honey, sugars.

Introducción

Los monosacáridos fructosa y glucosa son los componentes mayoritarios de la miel. La cuantificación de dichos azúcares es una herramienta importante para la evaluación de la calidad de este alimento. Por ello, su análisis influirá tanto en una eventual comercialización del producto como en el uso final que se le dará.

Asimismo, la sacarosa es un azúcar cuyo contenido en la miel se encuentra reglamentado por el artículo 783 del Código Alimentario Argentino. Su cuantificación permitirá entonces la aceptación o no de una miel por cumplimiento con la legislación vigente.

La validación de un método analítico permite establecer si este cumple con el propósito para el que fue diseñado. La determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de mieles

multiflorales mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción fue el método elegido en este caso para ser validado.

Con el objeto de ofrecer herramientas que contribuyan a diferenciar y a caracterizar las mieles, se validó un método de determinación de los azúcares más abundantes (fructosa y glucosa) y de la sacarosa, cuya concentración máxima en el producto está regulada por la legislación.

Materiales y métodos

- **Muestras:** Para la validación de la metodología se utilizaron muestras de miel de abejas multifloral con las siguientes características físico-químicas:

Parámetro	Rango
Azúcares reductores antes de la inversión (%)	72,0 - 76,5
Humedad (%)	16,6 - 17,5
Acidez libre (meq / 100 g miel)	10,9 - 26,6
Hidroximetilfurfural (mg/kg miel)	1,0 - 11,1
pH	3,6 - 4,2

- **Patrones:** Se utilizaron patrones de fructosa, glucosa y sacarosa de grado analítico.
- **Metodología de análisis:** El método de análisis se basó en la Norma IRAM 15946 (2008).

Muestras, blancos y fortificados se homogeneizaron y, posteriormente, se disolvieron en solución metanol: agua (3:1) previo a su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (conocida como HPLC). Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

- Cromatógrafo: equipo HPLC marca Shimadzu Prominence con detector de Índice de refracción LKB acoplado, circulando fase móvil por la celda de referencia.
- Flujo: 1.1 ml/min
- Fase móvil: acetonitrilo: agua (80:20)
- Columna: Thermo Scientific APS-2 Hypersil, 250 mm x 4.6 mm x 5 µ
- Temperatura del horno: 30°C
- Volumen de inyección: 20 µl
- **Validación:** Los parámetros de validación evaluados fueron selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad interna, robustez e incertidumbre para los tres azúcares. Para el caso de la sacarosa también fueron evaluados mínimo nivel detectable (MND) y mínimo nivel cuantificable (MNC).

Resultados

- **Selectividad**

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar el analito en presencia de interferentes que se encuentren en la matriz de interés (Sandoval, 2010).

Se evaluó por comparación de los cromatogramas de los patrones puros de fructosa, glucosa y sacarosa con los de una mezcla de patrones en proporción similar a aquella en la que estos azúcares se encuentran en la miel.

En las Figuras 1 y 2 pueden observarse los cromatogramas correspondientes a la mezcla de patrones de azúcares y a las muestras de miel, respectivamente, que permiten diferenciar e identificar los tres azúcares por su tiempo de retención.

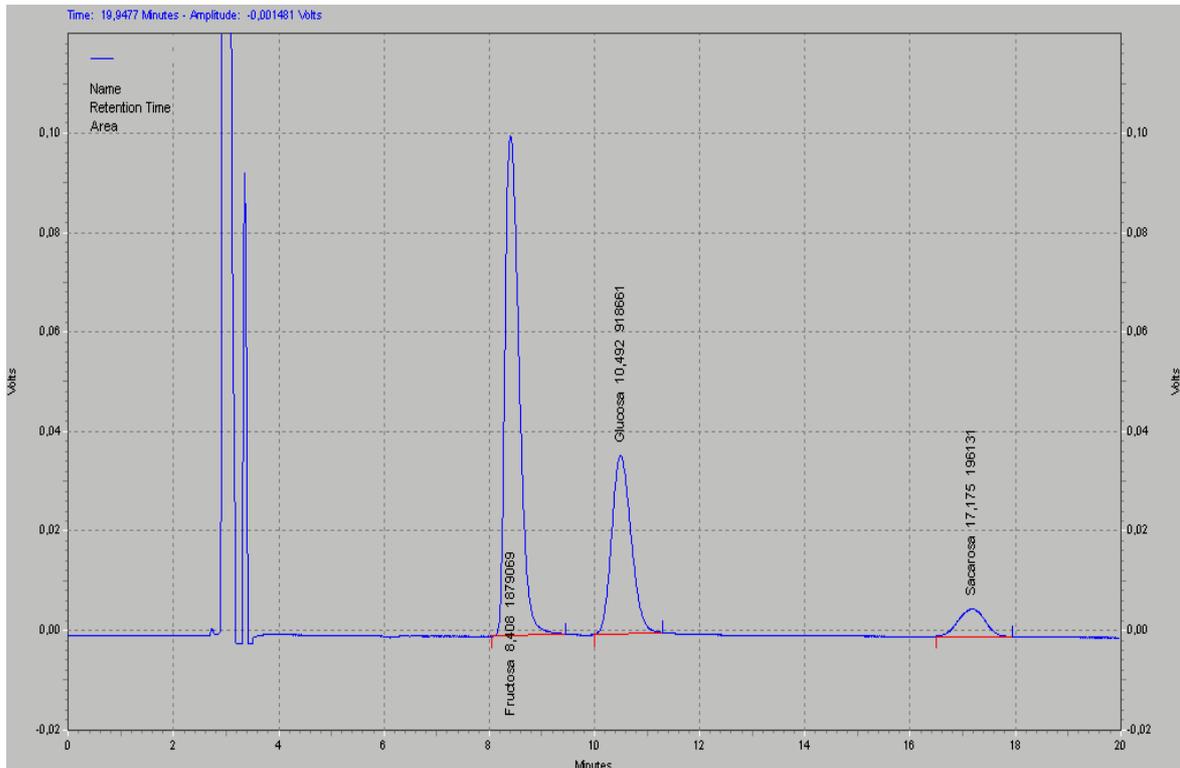


Figura 1: Cromatograma de la mezcla de patrones de azúcares.

Expresando la resolución R entre dos picos adyacentes mediante la siguiente fórmula:

$$R = 2 \times (t_{glu} - t_{fru}) / (W_{glu} + W_{fru})$$

donde: t, tiempos de retención (min) / W, ancho pico en la base (min),

Se obtuvo un valor de 1,6 para la resolución entre los picos asignados a los azúcares fructosa y glucosa.

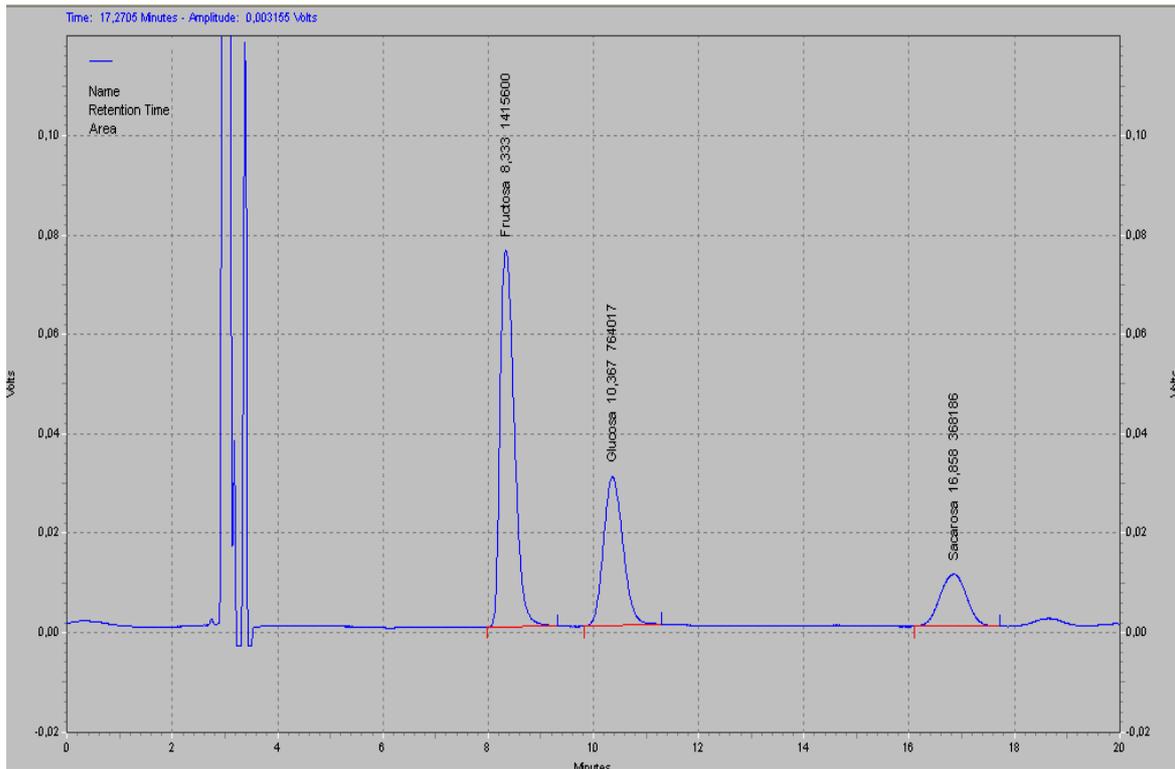


Figura 2: Cromatograma característico para muestra de miel

Considerando la estructura química de ambos isómeros, el resultado obtenido muestra una muy buena separación de picos al utilizar esta metodología. Kamal y Klein (2011) y la Norma Chilena NCh574 obtuvieron valores de resolución de 1,2 y 1,0, respectivamente.

- **Linealidad con patrones**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta proporcional a la cantidad de analito por determinar (Sandoval, 2010).

A tal fin, se estudió la linealidad de la respuesta analítica para cinco niveles de concentración de soluciones de fructosa, glucosa y sacarosa, por triplicado. Con los datos obtenidos se graficó el área en función de la concentración de la solución para cada azúcar (mg/ml). Los parámetros de ajuste obtenidos pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1: Estudio de la linealidad para los tres azúcares analizados

Azúcar	Rango analítico (mg/ml)	Rango de concentraciones en miel (g/100 g)	Coefficiente de correlación (r^2)	Rango de coeficientes de variación ¹ (%)
Fructosa	3,50 - 28,00	7,0 – 56,0	0,996	1,3 - 2,4
Glucosa	3,75 - 30,00	7,5 – 60,0	0,999	0,4 - 2,7
Sacarosa	1,00 - 5,00	2,0 – 10,0	0,997	2,1 - 3,8

¹ Coeficiente de variación porcentual = desvío estándar x 100 / valor medio (n=3)

- **Repetibilidad, reproducibilidad interna e incertidumbre para fructosa y glucosa**

Se define repetibilidad como la precisión bajo condiciones en las que los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método, en el mismo laboratorio, por el mismo operador utilizando un único equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo (Resolución SENASA 138/02).

Por otra parte, reproducibilidad interna es la precisión bajo condiciones tales que los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método, con diferentes operadores en un mismo laboratorio para intervalos de tiempo previamente establecidos (Resolución SENASA 138/02).

La incertidumbre de medición es el parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir razonablemente al análisis (Resolución SENASA 138/02).

Para evaluar estos parámetros se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- una muestra de miel de concentración de azúcares en valores normales sin fortificación,
- dos analistas,
- cuatro tandas de análisis en tres días diferentes.

A partir del análisis de varianza de un factor fueron calculadas, considerando todas las tandas de análisis, la varianza de repetibilidad como la variabilidad dentro de los grupos y, la varianza de reproducibilidad como la variabilidad total (varianza entre grupos más varianza dentro de los grupos). En la Tabla 2 pueden observarse los parámetros estadísticos obtenidos para ambos azúcares.

La incertidumbre expandida porcentual fue estimada a partir del coeficiente de variación de reproducibilidad interna con un nivel de confianza del 95 % y un factor de cobertura k igual a 2. Los valores obtenidos para fructosa y glucosa fueron 6,2 y 6,4 %, respectivamente.

Tabla 2: Estudio de repetibilidad y reproducibilidad interna para análisis de fructosa y glucosa en miel

Parámetro estadístico	Fructosa	Glucosa
Valor medio (g/100g), n=20	38,900	26,600
Varianza de repetibilidad	0,330	0,127
Desvío estándar de repetibilidad	0,574	0,356
Desvío estándar relativo de repetibilidad	0,015	0,013
Varianza de reproducibilidad interna	1,452	0,735
Desvío estándar de reproducibilidad interna	1,208	0,857
Desvío estándar relativo de reproducibilidad interna	0,031	0,032
Coficiente variación reproducibilidad interna (%)	3,100	3,200

ANOVA: nivel de confianza 95 %.

- **Repetibilidad y reproducibilidad interna para sacarosa**

Teniendo en cuenta que la sacarosa tiene un límite máximo permitido por el Código Alimentario Argentino, se utilizó la resolución SENASA 138/02 y sus disposiciones complementarias para la evaluación de estos parámetros.

Los parámetros fueron evaluados considerando las siguientes condiciones de trabajo:

- una muestra de miel blanco fortificada a cinco niveles de concentración, de manera de cubrir todo el rango analítico.
- dos analistas
- seis tandas de análisis en cuatro días diferentes

En la Tabla 3 se muestran los parámetros de ajuste obtenidos para la sacarosa en cada nivel de concentración evaluado.

Tabla 3: Estudio de repetibilidad y reproducibilidad interna para análisis de sacarosa en miel

Nivel de fortificación de sacarosa (g/100g)	Coeficiente de variación de repetibilidad (%)		Coeficiente de variación de reproducibilidad interna (%)
	Analista 1	Analista 2	
2	4,2	3,5	3,6
4	3,3	1,9	2,7
6	1,0	3,9	2,6
8	1,8	2,7	2,2
10	1,6	1,8	1,5

- **Mínimo nivel detectable (MND) y mínimo nivel cuantificable (MNC)**

Para la evaluación de estos parámetros se utilizó la Disposición 125/06 de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico del SENASA.

El mínimo nivel detectable (MND) es el contenido más bajo que se puede medir con seguridad estadística razonable, y el mínimo nivel cuantificable (MNC) puede definirse como la concentración mínima de analito que puede determinarse con precisión aceptable y exactitud, bajo las condiciones establecidas en el análisis (Resolución SENASA 138/02).

A partir del gráfico de la concentración hallada en función de la concentración nominal de sacarosa (figura 3) para las treinta muestras analizadas, se obtuvieron los resultados del ajuste por regresión lineal detallados en la Tabla 4. Este ajuste permite estimar el MND a partir de la concentración teórica que surge de interpolar el valor de la intersección de la ordenada con la hipérbola superior del intervalo de confianza del 95 %. El valor obtenido en este caso fue de 0,2 g de sacarosa / 100 g de miel. Por otra parte, el MNC obtenido, calculado como 3 x MND, fue 0,6 g de sacarosa / 100 g de miel.

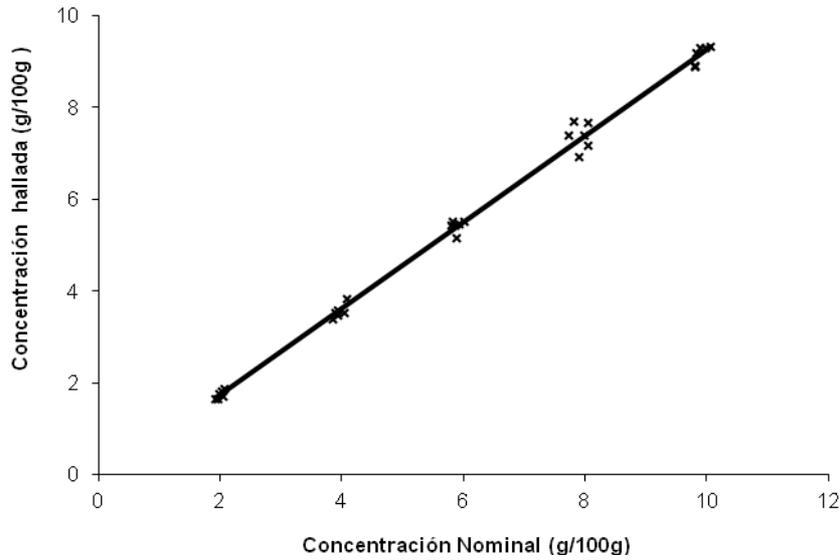


Figura 3: Gráfico de concentración hallada en función de la concentración nominal para los distintos niveles de fortificación de sacarosa

Tabla 4: Parámetros de regresión lineal para la determinación de MND y MNC de sacarosa en miel

Parámetro	Valor
Ordenada al origen	-0,158
Pendiente	0,944
Coeficiente de regresión (r^2)	0,996

• **Estimación de la incertidumbre de medición de sacarosa en miel**

Considerando la Resolución 138/02 y la Disposición 125/06 para la estimación de la incertidumbre de medición de sacarosa en miel y teniendo en cuenta que, a partir del estudio realizado en el punto 3.4. del presente trabajo, el rango de recuperación obtenido para los treinta ensayos realizados en condiciones de reproducibilidad interna estuvo comprendido entre 83,3 y 98,3 %, fue determinado un desvío estándar relativo de recuperación igual a 0,04.

A partir de este resultado y para un nivel de confianza del 95 % y un factor de cobertura k igual a 2, se obtuvo un valor de incertidumbre expandida porcentual del 8 %.

• **Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer inalterado por variaciones pequeñas de distintas variables del método (Resolución SENASA 138/02). Para evaluar este parámetro se utilizó el procedimiento de Youden y Steiner (1975) que permite analizar hasta siete variables con ocho determinaciones.

Las variables analizadas para los tres azúcares se detallan en la Tabla 5. Los cambios propuestos en este caso fueron: relación de solventes de la fase móvil, temperatura de la

columna, calentamiento para favorecer la dilución de los azúcares, flujo, material volumétrico utilizado para llevar a volumen las soluciones, material utilizado para la filtración de patrones y muestras.

La miel utilizada en este caso fue fortificada con sacarosa en una concentración cercana al límite permitido por la legislación.

Tabla 5: Diseño de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez del método

Variable	Factor 1	Condición 1	Factor 2	Condición 2
Relación Acetonitrilo: Agua	A	80:20	a	78:22
Temperatura columna (°C)	B	35	b	30
Calentamiento (°C)	C	50 ± 5	c	sin calentamiento
Flujo (ml/min)	D	1.3	d	1.1
Material volumétrico	E	matraz	e	Tubo
Filtro	F	nilon	f	acetato de celulosa

Los resultados obtenidos indicaron que el método no es sensible a los cambios propuestos para la cuantificación de fructosa y glucosa.

En relación al análisis de sacarosa se encontró una dependencia del método con la composición de la fase móvil.

Conclusiones

Los resultados de la validación mostraron parámetros estadísticos consistentes que permiten considerar la aptitud de la técnica analítica propuesta. Se puede destacar la buena resolución entre picos, principalmente en la relación glucosa/fructosa, sin presencia de otras interferencias de matriz que puedan afectar la cuantificación de los azúcares en estudio.

El método mostró valores de incertidumbre estimados entre 6 y 8 % para todos los azúcares estudiados.

En cuanto a la evaluación de la robustez, solo se observó dependencia de la metodología con la composición de la fase móvil para la cuantificación de la sacarosa.

Bibliografía

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, *Código Alimentario Argentino* [en línea]. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp>.

Dirección de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, (2006), *Disposición 125/06 Control de residuos en productos de origen animal*, SENASA, Buenos Aires.

- Instituto Argentino de Normalización y Certificación (2008), *Norma IRAM 15946. Miel: Determinación del contenido de los sacáridos fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*, Buenos Aires.
- Kamal, M. y P. Klein (2011), "Determination of sugars in Honey by liquid chromatography", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, pp. 17-21.
- Norma Chilena NCh574 (2006), *Miel de abejas – Determinación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa – Método HPLC con detector IR*.
- Sandoval, S. (2010) (coord./ed.), *Guía técnica n.º1 – Validación de métodos y de terminación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos*, Santiago, Instituto de Salud Pública de Chile.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2002), *Resolución 138/02. Control de productos de origen animal*, Buenos Aires.
- Youden, W. J. y E. H. Steiner (1975), *Statistical manual of AOAC*, Washington, Association of Official Analytical Chemistry, pp. 50-55.