

Trabajo completo

Identificación y cuantificación de azúcares por cromatografía electrocinética micelar en fase reversa en leche modificada

RECIBIDO: 04/04/2014

REVISIÓN: 02/08/2014

ACEPTADO: 20/08/2014

Gerstner, C. D.¹ • Bernal, C. A.¹ • Marsili, N.² • Maccari, M.³ • Williner, María Rosa^{1,*}

¹ Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Paraje El Pozo S/N. S3000ZAA, CC 242, Santa Fe, Argentina. Teléfono: 54-342-4575211, Fax: 54-342-4575221.

² Química analítica II, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

³ La Sibila SA, Planta Nogoyá, Entre Ríos, Argentina.

*E-mail: williner@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se desarrolló un método por electroforesis electrocinética micelar para la determinación simultánea de glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa en leches modificadas. La separación de los componentes estudiados se llevó a cabo utilizando capilares de sílice, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como surfactante catiónico en el electrolito de corrida, polaridad reversa y detección UV indirecta. Las curvas de calibración fueron lineales con $R^2 > 98,49$. La desviación estándar relativa (RSD %) en todos los casos fue menor a 1,88 % y la recuperación fue entre 95–114 % para la glucosa, 104–110 % para la fructosa, 93–113 % para la lactosa y 92–110 % para la sacarosa. El método analítico propuesto presenta una buena separación de los analitos, implica pretratamiento sencillo de las muestras y genera bajos volúmenes de desecho. La precisión, exactitud y rapidez, hacen que sea un método útil para la cuantificación simultánea de

azúcares en leches modificadas.

PALABRAS CLAVE: leches modificadas, electroforesis capilar, azúcares simples, lactosa.

SUMMARY: *Identification and quantification of sugars by micellarelectrokinetic chromatography in reverse phase in modified milk.*

A method by micellarelectrokinetic electrophoresis for the simultaneous determination of glucose, fructose, lactose and sucrose in modified milks was developed. Separation of the compounds studied was carried out using fused silica capillaries, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as cationic surfactant in run electrolyte, reverse polarity and indirect UV detection. Calibration curves were linear with $R^2 > 98.49$. The relative standard deviation (RSD %) in all cases was less than 1.88 % and the recovery was between 95–114 % for glucose, 104–110 % for fructose, 93–113 % for lactose and 92–110 % for sucrose.

The analytical method developed provides good separation of the analytes, involves simple pretreatment of samples and low volumes of waste generated. The precision, accuracy and speed of the method, make it a useful tool for

the simultaneous quantification of modified milk sugars.

KEYWORDS: modified milk, capillary electrophoresis, sugars, lactose.

1. Introducción

De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA), la cuantificación de lactosa en leche y derivados se realiza según la técnica de Luff-Schoorl. Esta técnica es un método reductométrico, que se basa en la capacidad de los azúcares reductores, como la glucosa, fructosa, lactosa, entre otros, de reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas (1). Esta técnica semiempírica posee baja especificidad y no permite diferenciar los azúcares reductores entre sí, haciendo imposible la cuantificación individual (2). A pesar de las dificultades descritas anteriormente, es válido cuantificar lactosa en leche por este método, ya que prácticamente es el único azúcar presente.

En la actualidad, existe en el mercado un gran número de productos lácteos modificados, que contienen no sólo lactosa, sino otros azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, por lo que es necesario cuantificar cada uno de ellos, y no sólo determinar el contenido total. En estos casos, se emplean métodos separativos para identificar y cuantificar estas moléculas neutras de bajo peso molecular. Uno de ellos es la cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), que cuando se utiliza con detección por índice de refracción (3–5) presenta el problema de la baja selectividad y sensibilidad (6). También puede utilizarse la

detección amperométrica (7), pero no es apropiada para análisis de rutina (8).

Otra técnica separativa utilizada es la electroforesis capilar (EC), en la cual los componentes de una solución se separan mediante la acción de un campo eléctrico aplicado en el interior de un tubo capilar de sílice fundida, de acuerdo con sus movilidades. Esta técnica puede ser utilizada en varios modos diferentes, entre ellos, la electroforesis capilar zonal (ECZ) y la electroforesis electrocinética micelar (MEKC). En la ECZ, el medio de separación es un electrolito de corrida. En la MECK, al electrolito de corrida se le agrega un tensoactivo a una concentración superior de la concentración micelar crítica (CMC). Así, las micelas del surfactante constituyen una pseudofase dentro de la cual las moléculas del analito sufren partición por interacciones hidrofóbicas con el interior lipofílico de la misma. De este modo, durante el proceso la mezcla reguladora está formada por una fase acuosa que se mueve a una velocidad, y por una fase micelar que en función de la carga se mueve a otra, favoreciendo la resolución de los analitos (9–11).

La separación de azúcares por EC se basa en la disociación de sus grupos semiacetales en medio fuertemente alcalino (12–13) o en la formación de complejos con ácido bórico (14). Además, para detec-

tar estos analitos que no absorben en el UV, ni fluorescen, es posible la detección UV indirecta (8, 13), la detección por UV directa o por fluorescencia laser, que requieren la derivatización de los azúcares para convertirlos de analitos no absorbentes o no fluorescentes, en derivados activos (8, 15–20). También puede emplearse la detección electroquímica (21–22), la detección por conductividad (23), la detección amperométrica (24–25), y la espectrometría de masas (26–27), siendo esta última muy costosa.

Un método por ECZ que identifica glucosa, fructosa y sacarosa sin derivatizar y por detección UV indirecta, es el propuesto por Lagane, quien plantea que los sacáridos, por sus valores de pK_a , son ácidos muy débiles y no están ionizados en un gran rango de pH, siendo necesario trabajar, por lo tanto, a pH 12,6. Por otra parte, considerando la falta de cromóforos en dichas estructuras se debe emplear un sistema de detección UV indirecta, por lo que debe seleccionarse un electrolito que absorba la radiación UV. Este electrolito debe ser coión (electrolito de igual signo de la carga que el ión a separar) con el analito que se pretende determinar, y debe tener además una movilidad electroforética similar. Cuando frente al detector circula el electrolito que absorbe en el UV se obtendrá una línea de base elevada, así, en el momento en que frente al detector circula el analito que no absorbe en el UV, aparecerá en el electroferograma un pico negativo, cuya área será proporcional a la concentración del mismo (9–11).

Como el método por ECZ de Lagane no permite separar la lactosa de los otros azúcares, se propuso desarrollar un método por MEKC para la cuantificación simultánea de glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa en productos lácteos modificados.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Las soluciones patrones se prepararon a partir de droga sólida (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa) marca Merck (Ginebra, Suiza). En la preparación de los electrolitos se emplearon fosfato dibásico de sodioanhidro (Na_2HPO_4), sorbato de sodio ($C_6H_7NaO_2$), acetonitrilo, metanol, marca Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). Se utilizó surfactante aniódico dodecilsulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) (SDS) de marca Merck (Ginebra, Suiza) y surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio [$(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$] (CTAB) marca Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Todos los reactivos fueron de calidad grado analítico. El agua fue purificada utilizando el sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Soluciones patrones, muestras comerciales y soluciones de electrolitos

Todas las soluciones estándares (2,50 mM) fueron preparadas por disolución de la droga sólida en Na_2HPO_4 10 mM pH 12,6.

Los productos lácteos modificados y las materias primas (jarabe de glucosa, miel, leche) fueron provistos por empresa láctea La Sibila SA (Nogoya. Entre Ríos, Argentina). Las muestras fueron desgasificadas por ultrasonido. Todas las soluciones patrones y las muestras, fueron filtradas a través de filtro de 0,2 μm de poro (Sartorius) antes del análisis por electroforesis capilar.

Los electrolitos de corrida fueron preparados en el día, filtrados y desgasificados antes de su uso.

2.3. Instrumento

Los electroferogramas se obtuvieron con un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Bec-

kman Coulter, California, USA) con detector UV. Los capilares de sílice de 75 μm de diámetro interno, 57 cm de longitud total y 50 cm de longitud de detección, fueron provistos por MicroSolvTechnologyCorporation (Eatontown, NJ, USA).

El capilar fue acondicionado diariamente antes de su uso con HCl 0,1M durante 2 minutos, con agua desionizada 1 minuto, NaOH 0,1 M 2 minutos, seguido de otro lavado con agua desionizada por 1 minuto y finalmente 1 minuto con el electrolito de corrida. Posteriormente, entre corridas, el capilar fue lavado 1 minuto con NaOH 0,1 M, 1 minuto con agua desionizada y 1 minuto con el electrolito. Las soluciones patrones y las muestras fueron inyectadas a la columna aplicando presión durante 4 segundos.

2.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphic plus 5.1.

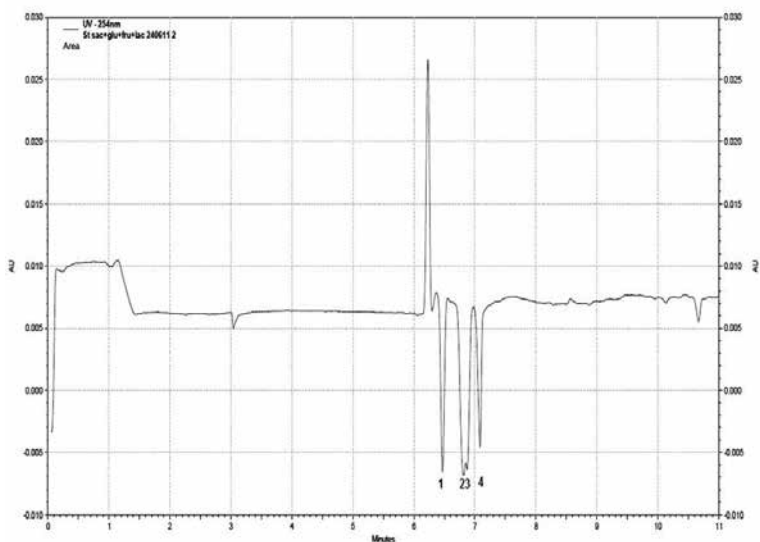
3. Resultados y discusión

3.1. Electroforesis capilar zonal (ECZ)

Se realizaron corridas electroforéticas de soluciones patrones individuales de glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa, para identificar cada pico, y de una mezcla de los cuatro azúcares, empleando como electrolito de corrida Na_2HPO_4 10 mM y $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_2$ 6 mM (pH 12,6) (13). Se observó que la glucosa y la lactosa no se resolvían eficientemente (Fig. 1).

Figura 1. Electroferograma de una solución patrón mezcla de los cuatro sacáridos, todos en concentraciones iguales a 2,50 mM.

Condiciones experimentales: electrolito de corrida (Na_2HPO_4 10,00 mM y $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_2$ 6,00 mM pH 12,6). Voltaje: +15kV, 254nm UV indirecta. Los picos en el gráfico están numerados y corresponden el (1) a sacarosa, el (2) a lactosa, el (3) a glucosa y el (4) a fructosa.



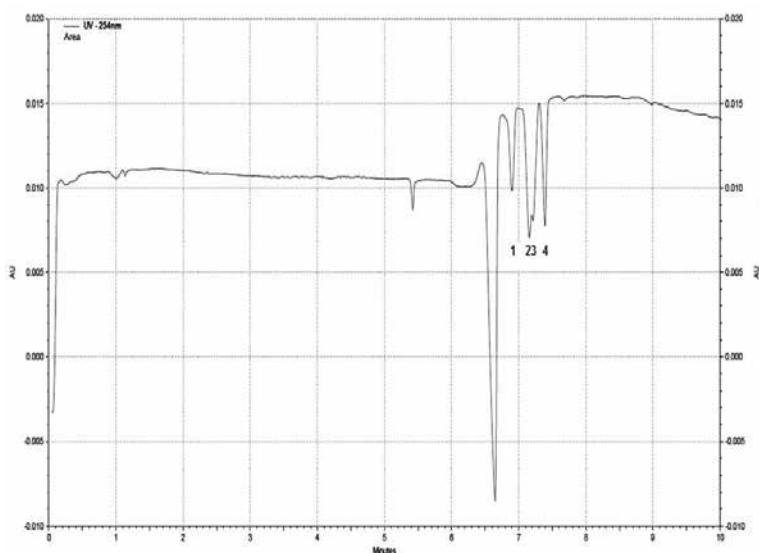
Se disminuyó el voltaje para aumentar los tiempos de migración e intentar que los picos se resuelvan, pero los resultados no fueron los esperados. Por tal motivo, se planteó el agregado de un surfactante al electrolito de corrida, modificando el método de ECZ a MECK.

3.2. Cromatografía electrocinética micelar (MECK)

Como la CMC del SDS, que forma micelas con cargas negativas, es de 7–10 mM, se trabajó a dos concentraciones, 30 y 60 mM. En ninguno de los casos se pudieron resolver satisfactoriamente los 4 azúcares (Fig. 2).

Figura 2. Electroferograma de una solución patrón mezcla de cuatro sacáridos todos en concentraciones iguales a 2,50 mM.

Condiciones experimentales: electrolito de corrida (Na_2HPO_4 10,00 mM, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_2$ 6,00 mM y SDS 60,00 mM pH 12,6). Voltaje: +15 kV, 254 nm UV indirecta. Los picos en el gráfico están numerados y corresponden el (1) a sacarosa, el (2) a lactosa, el (3) a glucosa y el (4) a fructosa.



Se decidió agregar además un solvente orgánico al electrolito de corrida. Se optó por usar acetonitrilo primero y metanol después, tanto al 5 como al 40 %. En todos los casos la resolución (R_s) disminuyó respecto del electrolito sin solvente orgánico, observándose electroferogramas con picos deformados y no resueltos.

Se propuso, por lo tanto, utilizar un sur-

factante con carga positiva como el CTAB cuya CMC es 1 mM, debiéndose cambiar la dirección de la corrida (polaridad reversa). Se trabajó a dos concentraciones: 2,5 y 5 mM. Si bien la R_s de los picos solapados mejoró (Fig. 3), no fue total. Se planteó entonces aumentar la concentración del Na_2HPO_4 a 20 mM y a 30 mM.

Figura 3. Electroferograma de una solución patrón de cuatro sacáridos todos en concentraciones iguales a 2,50 mM.

Condiciones experimentales: electrolito de corrida (Na_2HPO_4 20,00 mM, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_2$ 6,00 mM y CTAB 2,50 mM pH 12,6). Voltaje: -15 kV (polaridad reversa), 254 nm UV indirecta. Los picos en el gráfico están numerados y corresponden el (1) a Fructosa, el (2) a glucosa, el (3) a lactosa y el (4) a sacarosa.

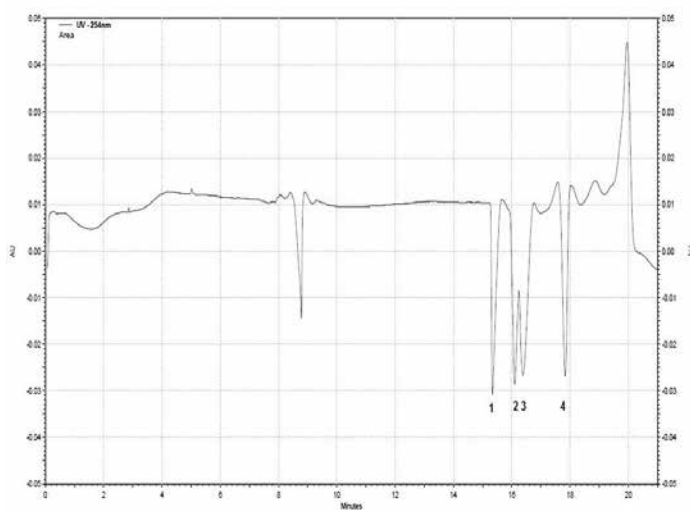
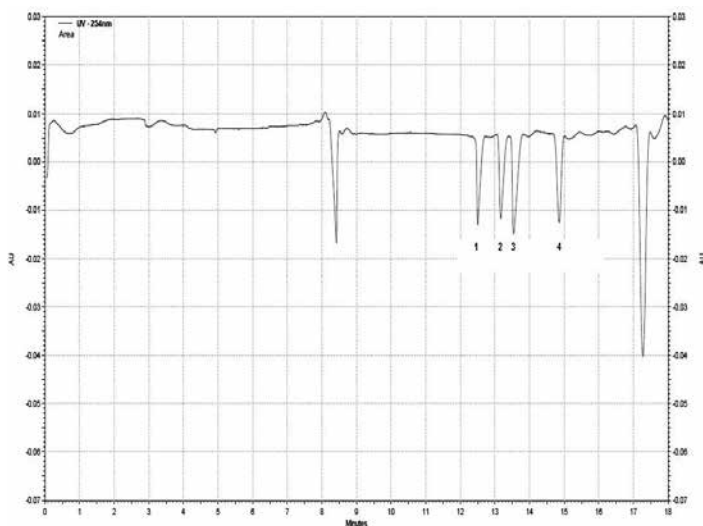


Figura 4. Electroferograma de una solución patrón de cuatro sacáridos todos en concentraciones iguales a 2,50 mM.

Condiciones experimentales: electrolito de corrida (Na_2HPO_4 30,00 mM, sorbato de sodio 6,00 mM y CTAB 2,50 mM, pH12,6). Voltaje: -15kV (polaridad reversa), 254 nm UV indirecta. Los picos en el gráfico están numerados y corresponden el (1) a Fructosa, el (2) a glucosa, el (3) a lactosa y el (4) a sacarosa.



La Fig. 4 muestra que, cuando la concentración de Na_2HPO_4 fue de 30 mM, se resolvieron los picos de glucosa y lactosa.

Se debe tener en cuenta que la R_s se define como: $R_s = 2 (t_2 - t_1) (w_1 + w_2)^{-1}$, donde t_2 y t_1 representan los tiempos de migración de los analitos próximos, y $w_1 + w_2$ son los anchos de zona de los respectivos picos medidos sobre la línea de base (9–11). Se considera además, que dos analitos están resueltos cuando R_s es mayor de 1,5. Así, cuando se trabajó con una concentración del electrolito Na_2HPO_4 de 30 mM, los valores de R_s fueron: $R_{s_{\text{fructosa/glucosa}}}$: 1,8, $R_{s_{\text{fructosa/lactosa}}}$: 1,6 y $R_{s_{\text{lactosa/sacarosa}}}$: 2,2.

De esta manera se logró resolver la separación de los picos de todos los azúcares presentes en las muestras, por lo que se decidió trabajar bajo estas condiciones: electrolito de corrida Na_2HPO_4 30 mM, sorbato de sodio 6 mM, CTAB 2,5 mM, pH 12,6, voltaje de migración -15 kV (reversa) y detección indirecta a 254 nm.

En todos los casos antes mencionados la optimización de las diferentes variables se efectuó por método OVET (*One Variable at a Time*), que evalúa una variable física o química a la vez.

3.3. Linealidad

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los azúcares (glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa). Se trabajó por triplicado en cinco niveles de concentración de la solución estándar, según las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Armonización (28). Las gráficas de calibración mostraron ser lineales con coeficientes de determinación $R^2 > 98,49$. Los parámetros estadísticos de la regresión se muestran en Tabla 1. Además, se realizaron pruebas estadísticas F para el estudio de la linealidad para cada una de las rectas de regresión, obteniéndose en todos los casos valores de $F_{\text{calculados}} < F_{\text{tabulados}}$ y probabilidades $p > 0,05$, lo que confirma los valores de R^2 .

Tabla 1. Parámetros estadísticos obtenidos al aplicar regresión lineal a las curvas de calibrado preparadas para cada uno de los cuatro azúcares.

Parámetros	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Sacarosa
Rango lineal*	0–2560	0 – 2800	0 – 5040	0 – 5120
Pendiente	128,43 ± 9,84	156,04 ± 7,22	192,64 ± 3,33	90,17 ± 3,39
Ordenada**	-1,78 ± 0,12	-2,01 ± 0,88	-10,81 ± 0,69	-1,14 ± 0,61
R2 ***	98,91	98,49	99,77	99,46

* (mgL-1); ** .10-4; *** (%)

3.4. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon en base a los parámetros estadísticos obtenidos al aplicar regresión lineal a las curvas de calibración (28). Según las normas internacionales IUPAC el límite de detección: LOD (*Limit Of Detection*) = $3,3 \times S_0$ y el límite de cuantificación LOQ (*Limit Of Quantification*) = $10 \times S_0$. Siendo S_0 la desviación estándar del blanco. Los límites de detección y cuantificación fueron $7,90$ y $26,30 \text{ mg L}^{-1}$ para fructosa, $15,40$ y $51,20 \text{ mg L}^{-1}$ para la glucosa, $2,20$ y $7,40 \text{ mg L}^{-1}$ para la lactosa, y $25,80$ y $86,00 \text{ mg L}^{-1}$ para la sacarosa, respectivamente.

3.5. Pretratamiento de muestras lácteas

Para analizar las muestras lácteas, cuya matriz es muy compleja, fue necesario realizar un pretratamiento para flocular las proteínas, que pueden interferir y dejar residuos en el capilar. Se ensayó con tricloroacético (TCA) al 25 %, alcohol etílico, alcohol isopropílico y ácido acético glacial. En todos los casos se dejó en reposo 20 minutos y luego se filtró con papel de filtro común y al filtrado se lo diluyó con electrolito Na_2HPO_4 10 mM (pH 12,6). Cada muestra tratada con estos 4 reactivos diferentes fue microfiltrada y corrida electroforéticamente bajo las condiciones establecidas.

Las áreas de los azúcares de la muestra láctea se resolvieron cuando se desproteinizó con los alcoholes o con el ácido acético, pero no con el TCA. Se decidió trabajar con ácido acético glacial porque se logró una muy buena desproteización con una baja dilución de la muestra.

Para las muestras de miel y jarabe de glucosa no fue necesario realizar una desproteización previa, simplemente se disolvieron con agua destilada.

3.6. Estudio del efecto matriz

En muestras complejas como la leche, el efecto matriz consiste en una disminución o un aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. Este efecto se estudia aplicando el método de adición estándar para cada uno de los azúcares. Cuando la composición de la muestra compleja afecta la señal analítica del azúcar estudiado, la pendiente de la curva de adición estándar será diferente a la pendiente de la curva de calibrado de los patrones puros. El estudio de comparación de pendientes se hizo mediante la prueba estadística F, analizando el valor de p se decide si existe o no diferencias estadísticamente significativas entre ambas pendientes.

Se construyó una curva de adición estándar para cada azúcar. Para tal fin, se tomó un volumen constante de muestra al que se le adicionaron concentraciones crecientes del estándar del azúcar estudiado. En la Tabla 2 se presentan los resultados de la comparación de las curvas de regresión (curva de calibrado vs. adición estándar) para cada azúcar. Se puede observar que para fructosa, glucosa y sacarosa el valor $p < 0,01$ indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes. Por otro lado, para lactosa, el valor $p \geq 0,1$, indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes. En todos los casos se trabajó con un nivel de confianza del 99 %.

Estos resultados indican que existe efecto matriz para fructosa, glucosa y sacarosa, y no para lactosa, que es el azúcar naturalmente presente en la leche.

Tabla 2. Resultados de la prueba estadística F para comparar las pendientes de las curvas de calibración y de adición estándar.

	Pendiente		ANOVA
	Curva de calibrado*	Adición estándar*	Valor de p
Fructosa	128,43± 9,84	216,84± 9,99	0,0000
Glucosa	156,04± 7,22	217,59± 8,49	0,0000
Lactosa	192,64± 3,33	218,93± 6,35	0,1302
Sacarosa	90,17± 3,39	131,44± 5,50	0,0000

* (mgL-1);

4. Validación del método desarrollado

4.1. Validación

Se prepararon 16 mezclas artificiales de los cuatro azúcares en tres niveles de concentración. Se utilizaron soluciones estándar de concentración perfectamente conocidas y se procesaron según el método desarrollado. Se calcularon los porcentajes de recuperación entre los valores de concentración predichos y los valores nominales y se obtuvieron excelentes resultados: 104 a 110 % de recuperación para fructosa; 95 a 114 % para glucosa; 93 a 113 % para lactosa y 92 a 110 % para sacarosa.

4.2. Repetibilidad

Se estudió la repetibilidad del método procesando la misma muestra de leche en polvo modificada, por triplicado, en tres diferentes días. Los resultados de las predicciones se analizaron aplicando una prueba estadística de comparación de medias. Los resultados de esta prueba fueron para fructosa $F= 1$ y $p= 0,42$, para glucosa $F= 0,97$ y $p= 0, 31$, para lactosa $F= 0,78$ y $p= 0,18$ y para sacarosa $F= 0,96$ y $p= 0,37$. Ya que en todos los casos el valor de p es mayor que 0,05, se considera que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de concentración predichos en tres diferentes días.

4.3. Precisión

Con los valores obtenidos en el estudio de repetibilidad se calcularon los coeficientes de variación para cada azúcar, de lo que resultó: 1,24 % para fructosa; 0,44 % para glucosa; 1,14 % para lactosa y 1,88 % para sacarosa.

Los resultados obtenidos en el estudio de la repetibilidad, como los obtenidos para el coeficiente de variación, mostraron valores muy aceptables.

4.4. Análisis de las muestras reales

Siguiendo las condiciones experimentales antes mencionadas, se analizaron por triplicado las materias primas: leche en polvo entera, miel y jarabe de glucosa, y el producto final: leche en polvo modificada. En la Fig. 5 se muestran los electroferogramas: 5.A) leche en polvo entera, 5.B) miel, 5.C) jarabe de glucosa, 5.D) leche en polvo modificada. En todos los casos, los picos correspondientes a los distintos azúcares fueron confirmados por adición de cada estándar en sucesivas corridas electroforéticas. Las concentraciones de los compuestos estudiados en las muestras se presentan en la Tabla 3.

Figura 5. Electroferograma de: A) leche, B) miel, C) jarabe de glucosa, D) leche modificada. Condiciones experimentales: electrolito de corrida (Na_2HPO_4 30,00 mM, sorbato de sodio 6,00 mM y CTAB 2,50 mM, pH12,6). Voltaje: -15kV (polaridad reversa), 254 nm UV indirecta. Los picos en cada gráfico están numerados y corresponden el (1) a Fructosa, el (2) a glucosa, el (3) a lactosa y el (4) a sacarosa.

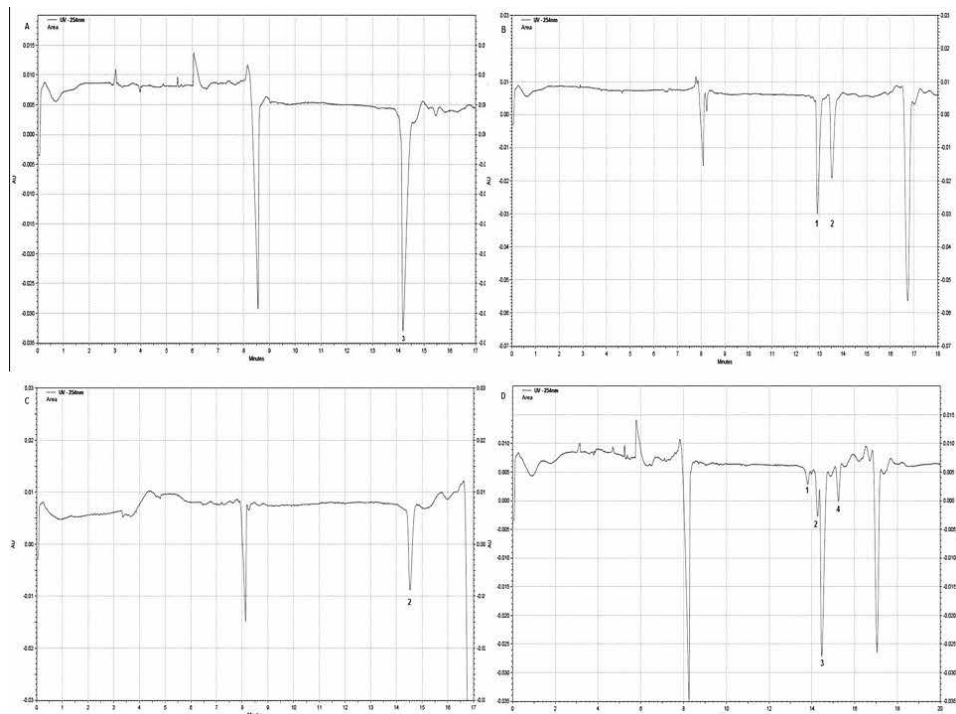


Tabla 3. Análisis de muestras comerciales y sus materias primas.

Muestra	Fructosa (g %)**	Glucosa (g %)**	Lactosa (g %)**	Sacarosa (g %)**
Leche entera en polvo	ND	ND	54,80 ± 1,40	ND
Miel	46,50 ± 0,40	36,30 ± 0,03	ND	ND
Jarabe de glucosa	ND	32,00 ± 0,04	ND	ND
Leche modificada en polvo	1,30 ± 0,03	4,20 ± 0,03	32,40 ± 0,23	6,10 ± 0,08

*ND: No Detectado; ** los valores de concentración (g/100 g muestra) corresponden al promedio de los valores obtenidos procesando la misma muestra por triplicado con su correspondiente desviación estándar.

Como era de esperar, en la leche entera en polvo sólo se identifica y cuantifica lactosa; en la miel, fructosa y glucosa; en el jarabe de glucosa, sólo glucosa; y en la leche modificada en polvo se identificaron y cuantificaron los 4 azúcares.

La suma de los valores de concentración predichos para los cuatro azúcares en la leche modificada (42,61 g %) concuerda con los hidratos de carbono declarado en el envase (40 g % como mínimo de hidratos de carbono).

5. Conclusiones

El empleo de la técnica MEKC reversa utilizando un surfactante catiónico con detección UV indirecta ofrece un método analítico alternativo para determinar simultáneamente glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa en productos lácteos modificados y sus materias primas. El método desarrollado requiere un pretratamiento sencillo de las muestras lácteas, no siendo necesario para las muestras de miel jarabe de glucosa. Este pretratamiento es rápido y genera bajos volúmenes de desecho. La precisión, repetibilidad, capacidad de predicción y rapidez del método desarrollado, hacen que éste sea un método alternativo para la cuantificación simultánea de azúcares en leches modificadas.

Los resultados obtenidos aplicando este nuevo método son comparables con los valores de hidratos de carbono totales declarados por el fabricante.

Nota

Parte de estos resultados fue presentada en el "XVI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL. VII Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe" durante los días 18 y 19 de septiembre de 2012 en la ciudad de

Santa Fe, bajo el título "Identificación y cuantificación de azúcares por cromatografía electrocinética micelar (MEKC) con detección UV indirecta en fase reversa", y recibió una Mención Especial en el concurso de trabajos presentados en el Área Temática de Ingenierías, Subárea de Alimentos. Otros resultados se presentaron en el "XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición", La Habana, Cuba, desde el 11 al 16 de noviembre de 2012 bajo el título "Cuantificación de lactosa en alimentos funcionales por electroforesis capilar".

Referencias bibliográficas

1. Código Alimentario Argentino (CAA). Actualización 2010.
2. Matissek, R.; Schnepel, M.; Steiner, G. 1998. "Análisis de los alimentos". Editorial Acirbia SA (Zaragoza).
3. Bouzas, J.; Kantt, C. A.; Bodyfelt, F.; Torres, J. A. 1991. Simultaneous determination of sugars and organic acids in cheddar cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* **56**: 276–278.
4. Yuan, J. P.; Chen, F. 1999. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC—dual detection. *Food Chem.* **64**: 423–427.
5. Garde, S.; Ávila, M.; Gaya, P.; Arias, R.; Nuñez, M. 2012. Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *Int. Dairy J.* **25**: 87–91.
6. Skoog, D. A.; Leary, J.J. 1996. "Análisis Instrumental". McGraw-Hill (Barcelona), 785–789.
7. Cataldi, T. R. I.; Margiotta, G.; Zambonin, C. G. 1998. Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. *Food Chem.* **62**: 109–115.
8. Soga, T.; Serwe, M. 2000. Determination of carbohydrates in food samples by capillary elec-

- trophoresis with indirect UV detection. *Food Chem.* **69**: 339–344.
- 9.** Grossman, P. D.; Colburn, J. C. 1992. "Capillary electrophoresis. Theory and Practice". Academic Press, Inc. (San Diego).
- 10.** Guzmán, N. 1993. "Capillary Electrophoresis Technology". Marcel Dekker, Inc. (New York), 857–995.
- 11.** Baker, D. R. 1995. "Capillary Electrophoresis". John Wiley & Sons, Inc. (New York), 54–105.
- 12.** Xu, X.; Kok, W. T.; Poppe, H. 1995. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *J. Chromatogr. A.* **716**: 231–240.
- 13.** Lagane, B.; Treilhou, M.; Couderc, F. 2000. Capillary electrophoresis: theory, teaching approach and separation of oligosaccharides using indirect UV detection. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **28**: 251–255.
- 14.** Noe, C. R.; Freissmuth, J. 1995. Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: separation after derivatization with S-(–)-1-phenylethylamine. *J. Chromatogr. A.* **704**: 503–512.
- 15.** Vorndran, A. E.; Grill, E.; Huber, C.; Oefner, P. J.; Bonn, G. K. 1992. Capillary zone electrophoresis of aldoses, ketoses and uronic acids derivatized with ethyl *p*-aminobenzoate. *Chromatographia.* **34**: 109–114.
- 16.** Guttman, A. 1997. Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **763**: 271–277.
- 17.** Izco, J. M.; Tormo, M.; Jiménez-Flores, R. 2002. Rapid Simultaneous Determination of Organic Acids, Free Amino Acids, and Lactose in Cheese by Capillary Electrophoresis. *J. Dairy Sci.* **85**: 2122–2129.
- 18.** Cortacero Ramírez, S.; Segura Carretero, A.; Cruces Blanco, C.; Hernández Bermúdez de Castro, M.; Fernández Gutiérrez, A. 2004. Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumnderivatization and UV detection. *Food Chem.* **87**: 471–476.
- 19.** Tseng, H. M.; Gattollin, S.; Pritchard, J.; Newbury, H. J.; Barrett, D. A. 2009. Analysis of mono-, di- and oligosaccharides by a two stage derivatization method, capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection. *Electrophoresis.* **30**: 1399–1405.
- 20.** Wang T.; Yang X.; Wang, D.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhao, Y. 2012. Analysis of compositional carbohydrates in polysaccharides and foods by capillary zone electrophoresis. *Carbohydr. Polym.* **88**: 754–762.
- 21.** Zhang, X.; Cao, Y.; Ye, J. 2001. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* **72**: 385–388.
- 22.** Xin, Z.; Yuhua, C.; Jiannong, Y. 2001. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* **72**: 385–388.
- 23.** Tuma, P.; Malkova, K.; Samcova, E.; Stulik, K. 2011. Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Anal. Chim. Acta.* **698**: 1–5.
- 24.** Paulus, A.; Klockow, A. 1996. Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **720**: 353–376.
- 25.** Hui, L.; Show, C. 2004. Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for several carbohydrates. *Talanta.* **64**: 210–216.
- 26.** Klampfl, C. W.; Buchberger, W. 2001. Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis.* **22**: 2737–2742.
- 27.** Campa, C.; Coslovi, A.; Flamigni, A.; Rossi, M. 2006. Overview on advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: a tabulated review. *Electrophoresis.* **27**: 2027–2050.
- 28.** International Conference on Harmonisation. 2005. ICH Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1).

Trabajo completo

Desarrollo de un método para la determinación del contenido límite de plomo en materias primas farmacéuticas por complejación con ditizona en medio micelar acuoso

RECIBIDO:
REVISIÓN:
ACEPTADO:

faltan fechas

Torregiani, L.¹ • De Zan, M. M. • Cámara M. S. • Robles, J. C.

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo S/N, S3000ZAA, CC 242, Santa Fe, Argentina.

¹ Teléfono: 54-342-4224745.

E-mail: lucitorregiani@gmail.com

RESUMEN: Los métodos oficiales para la determinación del contenido límite de plomo en materias primas farmacéuticas (USP 37) se basan en la formación del complejo coloreado plomo-ditizona [Pb(HDz)₂], seguida de extracciones con cloroformo, compuesto tóxico y potencial carcinógeno. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método alternativo sin utilizar solventes organoclorados, basado en la generación de un sistema micelar acuoso con el surfactante lauril sulfato de sodio (SDS) para solubilizar el complejo [Pb(HDz)₂]. Se optimizó la sensibilidad del método utilizando un diseño central compuesto y se encontró que a un pH de 7,60 y una concentración de SDS de 0,15 mol L⁻¹ la respuesta fue máxima. El cambio de color se determinó en forma visual e instrumental. El método fue aplicado satisfactoriamente en materias primas y resultó ser superior al oficial, ya que es selectivo, sencillo, económico, de mayor sensibilidad, y utiliza un volumen menor

de reactivos de baja toxicidad.

PALABRAS CLAVE: plomo, ditizona, lauril sulfato sódico, materias primas farmacéuticas.

SUMMARY: Desarrollo de un método para la determinación del contenido límite de plomo en materias...

The official methods for determining the limit for lead in pharmaceutical raw materials (USP 37, FA 7^o Ed) are based on the formation of a colored lead-dithizone complex [Pb(HDz)₂], followed by extraction with chloroform, a toxic and potential carcinogenic compound. The aim of this work was to develop an alternative method, without the use of chlorinated solvents, based on the generation of an aqueous micellar system with the surfactant sodium lauryl sulfate (SDS) to solubilize the complex.

The sensitivity of the method was optimized using a central composite design, finding an optimum at a pH=7.60 and an SDS concentration

falta título en inglés