

Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares en alimentos

Quantification of organic acids, antioxidants and sugars in food by high performance liquid chromatography (HPLC)

Correa N., Y. M^I.; Mosquera M., Ó. M^{II}. y Jiménez G., D. A^{II}.

Resumen. Los aditivos alimentarios son sustancias que se incorporan a los alimentos preparados, con el propósito de mejorar la calidad y las características sensoriales de estos, pero muchas de estas sustancias presentan efectos adversos en la salud del hombre, por lo tanto, deben ser controladas. Por tal razón, se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) muestras comerciales de jugos, mermelada, galletas, pan y mayonesa mediante el método del estándar externo, en las cuales se determinaron concentraciones de los ácidos ascórbico y cítrico entre 0,0100-0,395g/L y 0,1000-3,098g/L, respectivamente. También se evaluaron muestras de leche, aceite, margarina, galletas y tostadas, en las cuales se encontraron los antioxidantes butilhidroxitolueno (BHT) y vitamina E en una concentración entre 0,0180-0,0778g/L y 0,00820-0,0125g/L, respectivamente. Asimismo, se examinaron muestras de miel de abeja, leche, jugos y mermelada, por sus contenidos de fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa, cuyos valores oscilaron entre 0,2636-19,89g/L, 0,3818-24,38g/L, 9,299-39,60g/L y 0,2738-82,27g/L, respectivamente. Para cada uno de los análisis anteriores se obtuvieron curvas de calibración con un coeficiente de correlación de $r^2 > 0,99$. En cada una de las diferentes determinaciones se lograron coeficientes de variación (CV) entre 0,4100-2,680% y porcentajes de recuperación superiores al 90%. Los métodos establecidos permitieron cuantificar los analitos evaluados en las diferentes matrices analizadas, por lo cual, estos protocolos se pueden proponer para realizar estas determinaciones en alimentos preparados.

-
- I Departamento de Química, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, correo electrónico: yaned.correa@ucaldas.edu.co.
- II Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.

Palabras clave: aditivos alimentarios, análisis de alimentos, carbohidratos, estándar externo, métodos analíticos.

Abstract. Food additives are compounds that are added to foods, to improve the quality and sensory characteristic; however, many of these molecules could produce health problems, that is why they must be controlled; for that reason, in this work commercial samples of juices, marmalade, cookies, bread and mayonnaise were analyzed by HPLC by the external standard method, in these samples the concentrations of ascorbic and citric acids were in the range of 0,0100-0,395g/L and 0,1000-3,098g/L, respectively; in addition, samples of milk, oils, margarine, cookies and toasts were evaluated by their antioxidants butylhydroxytoluen (BHT) and vitamin E, contents of these analytes which were in the range of 0,0180-0,0778g/L and 0,00820-0,0125g/L, respectively. Furthermore, samples of honey bee, milk, juice and marmalade were also analyzed by their content of the sugars: fructose, glucose, lactose and sucrose by HPLC and the range of values were between 0,2636-19,89g/L, 0,3818-24,38 g/L, 9,299-39,60g/L, respectively. For each one of the above analysis calibration curves were obtained correlation of $r^2 > 0,99$. In each one of the different determinations the variation coefficients (VC) were obtained in the range between 0,4100-2,680% and the recuperation percentage were higher than 90%. The methods developed in this work allowed the quantification of the analytes evaluated in the different matrixes tested, and that is why they can be applied for the determinations of these analytes in food prepared work allowed the quantification of the analytes evaluated in the different matrixes tested, and that is why they can be applied for the determinations of these analytes in food prepared.

Key words: additive, analytic method, food analyses, external standard.

1. INTRODUCCIÓN

Se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que, sin constituir por sí misma un alimento, puede ser adicionado a los productos preparados en una cantidad determinada, con el fin de modificar sus características químicas, mejorar sus propiedades organolépticas o alargar la vida en estante (Blenford, 1995). Entre este grupo de sustancias se pueden mencionar los ácidos carboxílicos, los antioxidantes y, en algunos casos, los carbohidratos (Fernández-Monge, 2000).

Los ácidos orgánicos son usados en el procesamiento de alimentos con varios propósitos, por ejemplo: controlar el pH, ajustar la acidez de las materias primas o los productos terminados; también pueden funcionar como condimentos para realzar o disimular sabores o actuar como conservantes. Así, el ácido cítrico proporciona frescura, mientras que el ácido succínico agrega sabor amargo y salado a los alimentos

preparados (Gratzfeld-Hüsgen y Schuster, 2001). De igual manera, los antioxidantes como las vitaminas C y E, los carotenos y el 2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenol (butilhidroxitolueno [BHT]) retardan la degradación oxidativa de los lípidos en los alimentos preparados, previniendo la rancidez y la producción de olores y sabores desagradables (Bristian, 2002). Además, los azúcares fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa, entre otros, son fuente primordial de energía y se emplean en la elaboración de productos alimenticios debido a que acentúan el sabor dulce y le confieren cuerpo y textura a estos (Stanton, 2001; Willians, 2001).

En el control de los procesos de elaboración y estabilidad del producto terminado en la industria de alimentos y bebidas, los aditivos alimentarios son sustancias que se deben monitorear para verificar el cumplimiento de la normativa vigente en relación con la concentración de estos componentes en el producto terminado (Castellari et al., 2001). Por tal motivo, este trabajo se realizó para normalizar y validar métodos de cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares en muestras comerciales de alimentos, teniendo en cuenta que esta es una técnica analítica ampliamente utilizada para separar, detectar y cuantificar aditivos o contaminantes en este tipo de matrices, además, es una herramienta no destructiva altamente sensible y selectiva (Gratzfeld-Hüsgen y Schuster, 2001).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los procesos de extracción los reactivos empleados fueron grado analítico; el dihidrógeno fosfato de amonio, el hidróxido de potasio y los ácidos: fosfórico, ascórbico y cítrico fueron Merck (Darmstadt, Alemania); los antioxidantes: 2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenol (BHT) y la vitamina E (α -tocoferol) fueron Supelco (St. Louis, MO, Estados Unidos); los azúcares: fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa fueron Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos); los solventes *n*-hexanos y etanol absoluto fueron Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos). Para la cuantificación de los analitos propuestos, el metanol, el isopropanol y el acetonitrilo, fueron grado HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos), el agua desionizada se obtuvo en un equipo E-pure Barnstead (Thermo, Barnstead Lab, CA, Estados Unidos).

Para la cuantificación se empleó un cromatógrafo líquido Hewlett Packard HP-1100, equipado con un sistema de procesamiento de datos Chemstation LC, revisión A. 06. 01, con un inyector manual con loop de 20 μ L, un detector de arreglo de diodos (DAD-UV) y un detector de índice de refracción (IR) HP-1047A, bomba cuaternaria y columnas según el analito que se va a determinar (ver tabla 1).

Tabla 1. Condiciones cromatográficas empleadas para la cuantificación de ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares en alimentos por CLAE

Parámetros	Analito		
	Ácidos	Antioxidantes	Azúcares
Columna	Hypersil ODS: 125 mm x 4,6 mm d.i, 5 μ m	Hypersil ODS: 125 mm x 4,6 mm d.i, 5 μ m	Fast Carbohydrate Analysis: 100 mm x 7,8 mm d.i, 9 μ m
Fase móvil	(NH ₄)H ₂ PO ₄ al 0,5 % p/v ajustada a pH: 2,8 con H ₃ PO ₄ 1 M	MeOH-H ₂ O, (98:2), v/v	H ₂ O desionizada (grado HPLC)
Detector	DAD-UV a 210 nm	DAD-UV: BHT: 280 nm; vitamina E: 290 nm	Índice de refracción: IR HP 1047A
Flujo (mL/min)	1,0	1,0	0,7
Temperatura de la columna (°C)	30	35	70

Fuente: Zhangou y Jiuru (2002); Supelco Chromatography Catalog (2005-2006); BIO-RAD (2001).

Las muestras comerciales de alimentos fueron: aceite, galletas, jugos, leche, margarina, mayonesa, mermelada, miel de abeja, pan y tostadas, las cuales se adquirieron en supermercados de cadena locales y fueron procesadas dependiendo del analito que se va a cuantificar como se describe a continuación.

Preparación de las muestras para la cuantificación de ácidos orgánicos

Muestras líquidas

Cinco (5) mL del jugo comercial para evaluar se diluyeron en 30 mL de agua desionizada, a continuación se centrifugaron tres veces durante 5 min a 4500 rpm; posteriormente, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se filtraron a través de una membrana de nailon de 0,20 μ m (Karadeniz, 2004).

Muestras sólidas y semisólidas

Un (1) g de la muestra se extrajo por ultrasonido con 20 mL de *n*-hexano dos veces durante 20 min; a continuación, el residuo sólido se reextrajo tres veces con porciones de 20 mL de metanol, los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron en un rotaevaporador hasta sequedad, luego se redisolviaron en 2 mL de agua des-ionizada y se filtraron por medio de una membrana de nailon de 0,20 μ m, de acuerdo con el método 986.13 de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (Cunniff, 1997).

Preparación de las muestras para la cuantificación de antioxidantes

Cuantificación de BHT

Un (1) g de la muestra se extrajo tres veces por ultrasonido, con 10 mL de *n*-hexano-acetonitrilo (100:2, v/v) durante 10 min; posteriormente, se separaron las capas (*n*-hexano y acetonitrilo). La fase de acetonitrilo se rotaevaporó hasta la sequedad, se reconstituyó en 2 mL de isopropanol-acetonitrilo (1:1 v/v) y se filtró a través de una membrana de nailon de 0,20 µm, según el método 983.15 de la AOAC (Cunniff, 1997).

Cuantificación de vitamina E

Muestras con bajo contenido de proteína

A 1g o 1 mL de la muestra comercial se le adicionaron 2 mL de etanol absoluto y 1 mL de hidróxido de potasio al 10% en H₂O. Esta mezcla se calentó durante 10 min a 80 °C en baño de maría con agitación constante y con protección de la luz; luego, la mezcla se extrajo tres veces con porciones de 6 mL de *n*-hexano, el cual contenía BHT al 0,025% p/v para evitar la degradación de esta vitamina durante las etapas de procesamiento (Zhao et al., 2004). Los extractos se combinaron y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador y el residuo se suspendió en 2 mL de isopropanol-*n*-hexano (9:1, v/v) y se filtró por medio de una membrana de nailon de 0,20 µm (Gueguen et al., 2002; Gawlik et al., 2003).

Muestras con alto contenido de proteína

A 2g o 1 mL de la muestra se le suministraron 5 mL de etanol absoluto (el cual contenía el 5% de ácido ascórbico y 0,025% de BHT). La mezcla se calentó durante 5 min a 70 °C en baño de maría con agitación constante y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se saponificó y finalmente se realizó el mismo procedimiento para la muestra con bajo contenido de proteínas (Farah et al., 1992; Gawlik et al., 2003; Gueguen et al., 2002).

Preparación de las muestras para la cuantificación de azúcares

Un (1) mL de la muestra se diluyó con 19 mL de agua desionizada, se agitó en un vortex a 2000 rpm durante 2 min y luego se centrifugó tres veces durante 5 min a 4500 rpm. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se diluyó con 19 mL de agua desionizada. Finalmente, 1 mL de esta solución se filtró a través de una membrana de nailon de 0,20 µm (Yuan y Chen, 1999; Quicazán et al., 2003).

Preparación de soluciones estándar

Las soluciones patrón para los ácidos ascórbico y cítrico, y los antioxidantes butilhidrotolueno (BHT) y vitamina E (α -tocoferol), fueron preparadas a partir de soluciones patrón de 2000 mg/L. Las de los ácidos se aforaron con la fase móvil respectiva hasta obtener las concentraciones requeridas, mientras que las de los antioxidantes se diluyeron con etanol absoluto hasta obtener las respectivas concentraciones de trabajo. Las de los azúcares: fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa fueron preparadas a partir de soluciones patrón de 5000 mg/L en agua desionizada. Cada una las soluciones se filtraron a través de membrana de nailon de 0,20 μ m antes de ser inyectadas en el HPLC para su análisis.

Curva de calibración

Cada curva de calibración de los compuestos para cuantificar se elaboró con 7 concentraciones diferentes del respectivo analito. Para el ácido ascórbico se realizó entre 6,250-100,0 mg/L, mientras que la del ácido cítrico entre 62,50-1000 mg/L. El BHT se evaluó entre 1,563-100,0 mg/L y la vitamina E entre 3,750-240,0 mg/L, y los azúcares se trabajaron así: sacarosa entre 156,25-5000 mg/L, lactosa entre 156,25-5000 mg/L, glucosa entre 156,25-5000 mg/L, galactosa entre 156,25-5000 mg/L y fructosa entre 250,0-4000 mg/L. Todos los patrones fueron inyectados por triplicado. Mediante el *software* del instrumento se obtuvo la regresión lineal, el coeficiente de correlación (r^2), el porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) o coeficiente de variación (CV).

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de los ácidos orgánicos, los antioxidantes y los azúcares en muestras comerciales de alimentos se describen en la tabla 1. La identificación se hizo por comparación de los tiempos de retención (t_R) de las soluciones de las muestras con las de los patrones y también se mezclaron muestras comerciales con cantidades conocidas de los estándares puros, para verificar si el pico evaluado correspondía al del analito de interés. Todas las muestras se inyectaron por triplicado.

Validación del método analítico

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción, identificación y cuantificación de cada uno de los tipos de analitos estudiados: ácidos, antioxidantes y azúcares, se procedió a evaluar el método analítico desarrollado de acuerdo con los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, cantidad mínima detectable (CMD), cantidad mínima cuantificable (CMC) y exactitud (Pérez, 2001; Quattrochi et al., 1992).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las evaluaciones realizadas, las condiciones cromatográficas empleadas proporcionaron bajo nivel de ruido, lo cual permitió obtener una línea base estable y reproducible durante el transcurso de cada uno de los diferentes análisis realizados.

El procedimiento de extracción empleado para la cuantificación de los ácidos orgánicos fue adecuado porque no permitió la degradación de estos. En estas condiciones cromatográficas empleadas (ver tabla 1), los ácidos ascórbico (AA) y cítrico (AC) presentaron un tiempo de retención (t_r) de $1,648 \pm 0,0840$ min y de $2,315 \pm 0,1158$ min, respectivamente. Las concentraciones encontradas en cada una de las muestras evaluadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de los ácidos ascórbico (AA) y cítrico (AC) en los alimentos evaluados

Muestra	Concentración de ácido en (g/L)	
	Ascórbico (AA)	Cítrico (AC)
Jugo de lulo	0,04460	2,608
Jugo de mandarina	0,003400	3,098
Jugo de mango	0,1770	2,673
Jugo de mora	0,09830	2,122
Pan	0,3950	n. d.
Galletas	n. d.	0,3790
Mayonesa	n. d.	0,1000
Mermelada	0,01000	0,3160

Nota: n. d.: no detectado

Fuente: Los autores

Con excepción del jugo de durazno que contenía ácido fumárico (datos no mostrados), todas las demás muestras analizadas tuvieron exclusivamente ácido ascórbico y ácido cítrico. Por los tiempos de retención obtenidos, no se detectaron los ácidos málico, láctico, oxálico, propiónico o tartárico en ninguna de las muestras analizadas en estas condiciones cromatográficas empleadas en este trabajo. Esto demuestra que los jugos analizados fueron de buena calidad y no presentaban deterioro microbiológico. La existencia de ácido fumárico es un parámetro que se emplea para monitorear el proceso de descomposición de las frutas (Trifiro et al., 1997). Como se puede observar en la tabla 2, el ácido mayoritario en los jugos analizados fue el ácido cítrico, esto concuerda con el hecho de que este ácido es el que más se usa en las bebidas de frutas para resaltar el sabor de estas (Shui y Leong, 2002). Asimismo, se evidenció la

presencia de ácido ascórbico (vitamina C) en las diferentes muestras analizadas, dado que este compuesto actúa como antioxidante y ayuda a la generación y el mantenimiento del colágeno en la piel, el cartílago y los tejidos conectivos (Furusawa, 2001). Cabe resaltar que los valores obtenidos se enmarcan en la normativa del Codex Stan 192-1995, la cual indica que en jugos de frutas la concentración para el ácido cítrico debe ser menor o igual a 3,00g/L y la del ácido ascórbico debe ser menor a 0,200g/L. La normativa colombiana para jugos no fija criterios ni límites específicos de aceptación o rechazo para el ácido ascórbico y define como cantidad aceptable para el ácido cítrico un valor inferior a 4,5% m/m (Ministerio de Educación nacional [MEN], Ley 09 de 1979, Resolución 799, 1991).

La cantidad de antioxidante detectada en los alimentos se reporta en la tabla 3. En esta se observa que el único alimento analizado en el que se detectó vitamina E fue la leche y la cantidad registrada fue mínima (0,0082-0,0125 g/L). Probablemente, esta se adiciona para cumplir con el valor nutricional diario recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 'Food and Agriculture Organization'), el cual es de 0,15-2,0 mg por kg de peso del consumidor (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2003). Es importante resaltar que el decreto colombiano que reglamenta la producción, procesamiento y comercialización de la leche no hace mención a este parámetro (MEN, Ley 09 de 1979, Decreto 2473 de 1983). Asimismo, las concentraciones de BHT estuvieron por debajo del límite establecido para los antioxidantes de origen sintético en alimentos, el cual debe ser 200,0 mg/kg para BHT solo o en mezcla con cualquier otro tipo de antioxidante (Codex Stan 192-1995). La cantidad detectada del BHT en margarinas estuvo dentro del rango reportado por Saad et al. (2007), Sin et al., (2006) y Maziero et al. (2001), quienes presentaron valores de 0-154,2 mg/kg, 46,5 mg/kg y 0-197 mg/kg, respectivamente, en este mismo producto. Los antioxidantes fenólicos sintéticos son ampliamente usados para prevenir la peroxidación lipídica durante el procesamiento y almacenamiento de algunos alimentos (Perrin y Meyer, 2002).

Los azúcares analizados fueron extraídos satisfactoriamente de todas las matrices evaluadas. En las condiciones cromatográficas empleadas, la fructuosa, la glucosa, la sacarosa y la lactosa presentaron los tiempos de retención (t_R) de $3,922 \pm 0,2961$, $4,191 \pm 0,2096$, $3,517 \pm 0,1759$ y $3,856 \pm 0,1927$ min, respectivamente. Los contenidos de estos mismos analitos se presentan en la tabla 4.

Tabla 3. Concentración de los antioxidantes vitamina E y BHT en las muestras comerciales de los alimentos evaluados

Muestra	Concentración de antioxidante en (g/L)	
	Vitamina E	BHT
Leche entera	0,0082	n. d.
Leche saborizada	0,0125	n. d.
Aceite (mezcla de aceites vegetales)	n. d.	0,0331
Aceite extraliviano	n. d.	0,0200
Margarina 1	n. d.	0,0180
Margarina 2	n. d.	0,0370
Galletas 1	n. d.	0,0753
Galletas 2	n. d.	0,0509
Tostadas 1	n. d.	0,0778
Tostadas 2	n. d.	0,0370

Nota: n. d.: no detectado

Fuente: Los autores

En los diferentes jugos evaluados, los valores encontrados para fructosa y glucosa están en consonancia con los límites permitidos por el código de prácticas de la Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union (AIJN) (1999), pero los datos obtenidos para la sacarosa no se ajustaron con el valor establecido. Según Cordella et al., (2002), la adición de azúcares es una de las adulteraciones más comunes en jugos de frutas y esto podría estar sucediendo en los materiales evaluados.

El contenido de azúcares reductores (fructosa y glucosa) en miel (0,6454 g/L o 64,5% expresado en porcentaje en peso) se encuentra dentro del límite permitido para este alimento, el cual es del 65% en peso de azúcares invertidos (fructosa y glucosa) como mínimo. Además, no se detectó sacarosa en la muestra comercial de miel analizada, por lo tanto, se confirmó que este alimento no estaba adulterado por la caramelización de este disacárido, como lo describe en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1273 (1997).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción y de elusión en cada uno de los analitos propuestos (ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares), se evaluaron los parámetros analíticos de linealidad, precisión, exactitud, selectividad y sensibilidad del método.

Tabla 4. Concentraciones obtenidas de fructosa, glucosa, sacarosa y lactosa en muestras comerciales de alimentos seleccionados

Muestra	Concentración de azúcar en g/L			
	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa
Mermelada de guayaba	0,4003	0,4693	0,2738	n. e.
Mermelada de mora	0,4116	0,3994	0,5401	n. e.
Jugo de manzana	19,89	24,38	82,27	n. e.
Jugo de naranja	7,892	10,78	73,22	n. e.
Miel de abejas	0,2636	0,3818	n. e.	n. e.
Leche saborizada	n. e.	n. e.	n. d.	9,299
Leche entera	n. e.	n. e.	n. d.	39,60
Leche condensada	n. e.	n. e.	0,9512	Nd

Nota: n. d.: no detectado; n. e.: no evaluado

Fuente: Los autores

Linealidad. Para cada uno de los analitos evaluados (ácidos, antioxidantes y azúcares), los intervalos de confianza encontrados para la pendiente ($m \neq 0$) y ordenada al origen (incluso al 0) fueron los indicados para el nivel de confianza empleado (el 95% con $\alpha = 0,05$). Además, estos resultados fueron confirmados mediante la prueba *t* de student realizada para la pendiente (m) y ordenada al origen (b), utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Se determinó que todos los componentes de los alimentos analizados tenían una pendiente significativamente diferente al cero, pasaron por el origen (0) y, además, presentaron una alta correlación lineal.

Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración fueron óptimos: ácido ascórbico $r^2 = 0,9957$, ácido cítrico $r^2 = 0,9984$; BHT $r^2 = 0,9976$, vitamina E $r^2 = 0,9998$; fructosa $r^2 = 0,9997$, glucosa $r^2 = 0,9995$, lactosa $r^2 = 0,9998$ y sacarosa $r^2 = 0,9998$.

Precisión. Los coeficientes de variación en cada uno de los análisis, tanto para la extracción como para el método de cuantificación, fueron inferiores al 5%, lo cual es concordante con lo reportado por Pérez (2001). En consecuencia, la metodología empleada para la detección y determinación de los ácidos ascórbico y cítrico, los antioxidantes BHT y vitamina E y los azúcares fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa fue precisa tanto a nivel instrumental y del método empleado.

Exactitud. Para ninguno de los componentes analizados se presentaron diferencias

significativas para la recuperación y los coeficientes de variación fueron inferiores al 5% en la determinación y cuantificación de cada uno de los constituyentes presentes en las muestras comerciales de alimento evaluadas.

Selectividad. Los picos de los ácidos ascórbico y cítrico, los antioxidantes BHT y vitamina E y los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa presentaron diferente tiempo de retención. Además, los picos fueron simétricos y tuvieron una resolución superior a 1,500, condición necesaria para lograr una separación del 95% entre dos compuestos (Quattrochi et al., 1992; Rodríguez et al., 2002).

Sensibilidad. Se evaluaron los parámetros del límite de detección (cantidad mínima detectable [CMD]) y límite de cuantificación (cantidad mínima cuantificable [CMC]), los cuales se presentan en la tabla 5.

Como se observa en la tabla 5, la CMD para todos los compuestos analizados fue inferior a 5µg, por lo cual, se comprobó que la sensibilidad determinada en el método establecido fue adecuada y que las cantidades encontradas poseen un 95% ($\alpha = 0,05$) de probabilidad de ser detectadas en los intervalos de concentración estudiados (Zhangou, y Jiuru, 2002).

Tabla 5. CMD y CMC para las curvas de calibración de los ácidos ascórbico y cítrico, los antioxidantes BHT y vitamina E y los azúcares fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa

Compuesto analizado	t_R (minutos)	Rango lineal de concentración (mg/L)	Coefficiente de variación (CV)	Cantidad mínima detectable (CMD) (µg)	Cantidad mínima cuantificable (CMC) (µg)
Ácido ascórbico	1,648 ± 0,0830	6,250-100,0	2,930	0,3160	1,075
Ácido cítrico	2,315 ± 0,1158	62,50-1000,0	2,363	1,072	4,665
BHT	1,500 ± 0,0750	1,562-100,0	13,49	0,3017	0,6676
Vitamina E	3,300 ± 0,1650	3,750-240,0	7,507	0,09450	0,3549
Fructosa	3,922 ± 0,2961	250,0-4000	10,83	1,871	5,489
Glucosa	4,191 ± 0,2096	156,2-5000	24,17	3,485	11,47
Lactosa	3,856 ± 0,1927	156,2-5000	16,12	2,755	7,875
Sacarosa	3,517 ± 0,1759	156,2-5000	19,95	1,662	7,265

Fuente: Los autores

4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que las etapas empleadas en la preparación y la remoción de interferencias de cada una de las de las muestras analizadas fueron apropiadas y adecuadas para la determinación de los analitos evaluados (ácidos, antioxidantes y azúcares) a través de la CLAE, y se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores del 90%.

Las condiciones cromatográficas establecidas para cada uno de los analitos evaluados, ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares, fueron óptimas para el análisis de estos compuestos en las diferentes matrices de alimentos ensayadas. Las determinaciones realizadas fueron específicas, sensibles, precisas, lineales, reproducibles y rápidas, lo que permitió visualizar a esta técnica como una herramienta potente para el análisis de estos analitos en muestras comerciales de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira y al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias).


REFERENCIAS

- Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union (AIJN). (1999). Code of Practice: Evaluation of fruit and vegetable juices. Brussels, p. 177.
- BIO-RAD Guide to aminex columns and applications (2001). Published by BIO-RAD. Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547. Estados Unidos.
- Blenford, D. (1995). Colouring consumer's perceptions. *Food Ingredient Analysis International*, 17, 10-11.
- Bristian, B. (2002). Taking stock of antioxidants. *Harvard Health Letter*, 4, 1-3.
- Castellari, M. et al. (2001). Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol and 5-HMF in beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV-refractive index double detection. *Journal of Chromatographic Science*, 3, 19-23.
- Codex Stan 192-1995. Norma general del Codex para los aditivos alimentarios. FAO, Roma. Revisión 2010, p. 284.
- Cordella, C. et al. (2002). Recent developments in food characterization and adulteration

- detection: technique-oriented perspectives. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, 751-1764.
- Cunniff, P. (1997). AOAC, Official methods of analysis. Official methods; 983.15: phenolic antioxidants in oils, fats and butter oil, liquid chromatographic method. 986.13: quinic, malic, citric acid in cranberry juice cocktail and apple juice. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- Farah, Z.; Rettenmaier, R. y Atkins, D. (1992). Vitamin content of camel milk. *International Journal Vitamin Nutricional Resolution*, 62, 30-33.
- Fernández-Monge, M. (2000). Información sobre aditivos alimentarios. Difusión Tecnológica. Servicio de Información Alimentaria (AZTI), 1-6.
- Furusawa, N. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*, 12, 27-29.
- Gawlik, M.T. et al. (2003). Optimization and validation of high-performance liquid chromatographic method for determination of α - and δ tocopherols in rat plasma and erythrocytes. *Acta Chromatographic*, 13, 185-195.
- Gueguen, S. et al. (2002). An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of α -tocopherol, retinol and five carotenoids in human serum. *Journal Chromatographic Science*, 40, 69-76.
- Gratzfeld-Hüsigen, A. y Schuster, R. (2001). HPLC for food analysis: A Primer. Alemania: Agilent Technologies Company.
- Karadeniz, F. (2004). Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turk Journal Agriculture Formulations*, 28, 267-271.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y World Health Organization (WHO) (2003). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2007). [ref. de 15 marzo 2011]. Recuperado de <http://jecfa.ilsa.org/index.htm>.
- Maziero, G. C.; Baunwart, C. y Toledo, M. C. (2001). Estimated of the theoretical maximum daily intake of phenolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ in Brazil. *Food Additives Contaminates*, 18, 365-373.
- República de Colombia. Ministerio de Salud. Ley 09 de 1979, Resolución 7992 del 21 junio de 1991. Elaboración, conservación y comercialización de jugos, concentrados, néctares, pulpas, pulpas edulcoradas y refrescos de frutas.
- República de Colombia. Ministerio de Salud. Ley 09 de 1979 Decreto 2473 del 30 de agosto de 1983. Producción, procesamiento, transporte y comercialización de la leche.

- República de Colombia. Norma Técnica Colombiana (NTC) 1273 (1997). Miel de abejas.
- Pérez, C. (2001). Validación de métodos analíticos (p. 332). Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.
- Perrin, C. y Meyer, L. (2002). Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chemistry*, 77, 93-100.
- Quicazán, M. Z.; Sandoval, A. y Padilla, G. (2003). Evaluación de la fermentación de bebida de soya con un cultivo láctico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3, 92-99.
- Quattrochi, O.; Abelaíra, S. y Laba, R. (1992). Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes gráficas Farro.
- Rodríguez, H.; Guerrero, J. Y. y Castro, R. (2002). Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con derivación poscolumna por fluorescencia. *Revista Colombiana de Química*, 31, 7-18.
- Saad, B. *et al.* (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, 105, 389-394.
- Shui, G. y Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 977, 89-96.
- Sin, D. W. M. K., *et al.* (2006). Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: method validation and estimation of measurement uncertainty. *Journal of Food Composition Analysis*, 19, 784-791.
- Stanton, R. (2001). Sugar: why Australia should retain a dietary guideline. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, 58, 31-36.
- Supelco Chromatography Catalog (2005-2006). Published by SUPELCO, Inc, SUPELCO park, Bellefonte, PA 16823-0048, Estados Unidos.
- Trifiro, A. *et al.* (1997). Use of ion chromatography for monitoring spoilage in the fruit juice industry. *Journal of Chromatography A*, 770, 243-252.
- Willians, P. (2001). Sugar: is there a need for a dietary guideline in Australia. *Australian Journal Nutrition and Dietetics*, 58, 26-31.
- Yuan, J. P. y Chen, F. (1999). Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 64, 423-427.
- Zhangou, C. y Jiuru, L. (2002). Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid and succinic acid in *Fructus mume* by

reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography Science*, 40, 25-29.

Zhao, B. *et al.* (2004). Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high performance liquid chromatography with photodiode–array detection. *Journal Pharmaceutical Science*, 7, 200-204 

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Correa N. Yaned M., Mosquera M. Óscar M. y Jiménez G. Diego A Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares en alimentos Revista Tumbaga (2012), 7, 115-129	Día/mes/año 15/01/12	Día/mes/año 05/04/12