

Validación de la metodología analítica para determinar la cuantificación de taninos en la pepa de palta (*Persea americana* Miller var. *hass*) por cromatografía líquida de alta presión

RECIBIDO: 12/06/14 ACEPTADO: 12/10/14

VÍCTOR AUGUSTO CASTRO ZAVALETA*
 NOÉ ILDEFONSO COSTILLA SÁNCHEZ**

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación intitulado Validación de una metodología analítica para determinar Taninos (Catequina) en pepa de palta (*Persea americana* Miller var. *hass*) por cromatografía líquida de alta resolución" (HPLC), tiene por objetivo validar una metodología por HPLC para determinar la concentración de estos analitos, haciendo uso de un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético glacial al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 35 °C. Encontrándose que los parámetros evaluados: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión del método y exactitud, están dentro de los valores aceptados para una validación.

Palabras clave: validación, taninos (catequina), HPLC

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY TO DETERMINE THE QUANTIFICATION OF TANNINS IN THE PIT AVOCADO (*PERSEA AMERICANA* MILLER VAR. *HASS*) BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

In the present research work entitled Validation of an analytical methodology for determining tannins (catechin) in pit (integument) avocado (*Persea americana* Miller var. *Hass*) by high resolution liquid chromatography "HPLC), is to validate a methodology HPLC to determine the concentration of these analytes, using an Agilent 1100 gas chromatograph with diode array detector was used with a UV-Visible octadecylsilane column (C18) of 150 mm length and 4.6 mm internal diameter; was used as mobile phase solution A (methanol) and solution B (glacial acetic acid 0.1%), with a travel time of 15 minutes, in an isocratic gradient of 15% A and 85% B; read at a wavelength of 210 nm, with a flow rate of 1 mL / min. was injected 10 uL sample at a temperature of 35 ° C. Finding that the evaluated parameters: linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy of the method are within accepted values for validation.

Keywords: validation, tannins (catechin), HPLC

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los fitofármacos han ido ganando terreno dentro del arsenal terapéutico mundial, fundamentalmente por su escasa toxicidad, bajos costos y por utilizar tecnologías de bajos niveles de inversión e insumos. Lo cual a su vez ha incidido poderosamente en la expansión, desarrollo y consolidación de la producción de dichos medicamentos. Se dice que el 80 % de la población mundial utiliza plantas para el tratamiento de las enfermedades y en los países industrializados el 35 % de los medicamentos prescritos contienen principios activos de origen natural¹. Todo lo anterior da una medida de la importancia de los fitofármacos para los países del tercer mundo; por su parte en Cuba se le ha dado una importancia estratégica a los mismos y se ha ido desarrollando todo un sistema que abarca desde la agrotecnia de la especie vegetal (palta), hasta la confección del producto terminado y su registro.

La parte activa de dicho producto es el extracto acuoso de la pepa (*Persea Americana* Millar var. *hass*).

El presente trabajo tiene como objetivo la validación de un método analítico en HPLC de alta resolución para la cuantificación de los taninos el mismo, que sustituya al método volumétrico actualmente en uso, el cual no es preciso, tiene una alta dependencia del analista y es muy laborioso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Métodos

Las muestras de pepa de palta fueron adquiridas en el centro de acopio (mercado mayorista de Trujillo, proveniente de la sierra del departamento de La Libertad).

Se preparó una solución madre de Catequina de 1 mg/mL, de la cual se tomó 10, 50, 100, 150, 200 y 250 µL y se les adicionó a cada una de ellas en fioles de 10 mL, llevándose a su respectivo aforo con agua ultrapura. De la cual se obtuvieron soluciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL respectivamente.

* Profesor investigador de la Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa.

** Profesor investigador de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

Se pesó 0,5 g de polvo de tegumento de la pepa de palta y se le colocó en un tubo de ensayo, se le agregó 4 mL de agua ultra pura y se llevó al ultrasonido por 15 minutos, luego se centrifugo a 3500 rpm por un lapso de 10 minutos, se tomó 2 mL del sobrenadante y se filtró haciendo uso de filtros jeringa de celulosa regenerada de 25 mm de diámetro y 0,2 µm de poro; colocándose en viales ámbar de 1,5 mL.

Para determinar la linealidad del método, se evaluaron 6 soluciones estándares comprendidas entre 1 y 25 µg/mL de Catequina empleándose un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético glacial al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 35 °C.

Se preparó soluciones estándares de Catequina menores a 1 µg/mL, hasta encontrar la concentración, a la cual en el cromatograma aparezca un pico en el tiempo de retención característico del analito, pero que no sea cuantificable por el equipo.

Se obtuvo aplicando la fórmula:

$$L.C.= (10/3) L.D.$$

Donde:

L.C.: Límite de cuantificación.

L.D.: Límite de detección.

Para determinar la precisión del método, se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se prepararon muestras de 8 µg/mL, 10 µg/mL y 12 µg/mL de Catequina por triplicado, y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético glacial al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 35 °C.

La exactitud del método se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se añadieron cantidades conocidas de Catequina

a la muestra problema analizada previamente para obtener concentraciones finales de 10 µg/mL, 12 µg/mL y 14 µg/mL por triplicado y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 35 °C.

2.2. Materiales

Material de estudio: se utilizó un estándar de Taninos (catequina) en el tegumento y muestras de pepa de palta hass.

Material de vidrio: fioles de 25, 50, 100, 500 y 1000 mL, matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL, probetas de 25 y 100 mL, vasos de precipitación de 50, 100, 500 y 1000 mL, viales ámbar de 1,5 mL.

Reactivos: ácido acético glacial, agua destilada, agua ultra pura, catequina y metanol grado HPLC

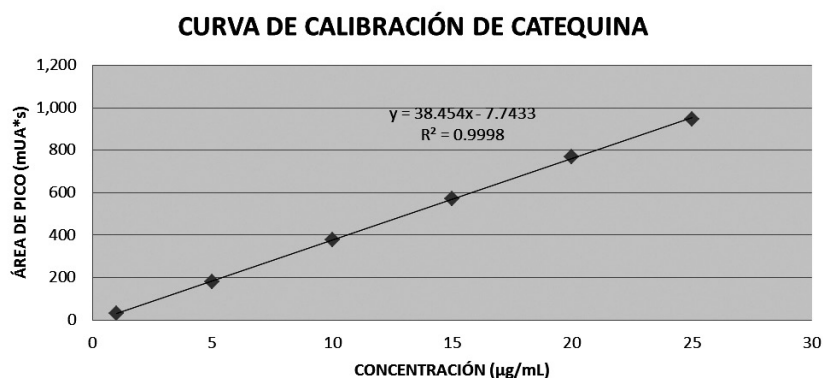
Equipos: balanza Analítica Sartorius 2942, Sensibilidad 0,0001 g, cromatógrafo Agilent 1100 series, filtro de vacío SANILAB, micropipeta 100-1000 µL, micropipeta 20-200 µL y sistema de purificación para obtener agua ultra pura: Modelo: EASY PURE, marca: Barnsted

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Resultados

Tabla 1. Linealidad de las concentraciones en mg/mL de Taninos (Catequina)

Nivel	Concentración mg/mL	Área pico (mUA*s)
1	1	32,13851
2	5	180,08177
3	10	375,92230
4	15	572,80670
5	20	767,45276
6	25	947,67609

Gráfico 1. Curva de calibración de Taninos (Catequina).**Tabla 2.** Límite de detección de Taninos (Catequina)

ANALITO	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ÁREA PICO (mUA*s)
Catequina	0,21	0,33204

Tabla 3. Límite de cuantificación de Taninos (Catequina)

ANALITO	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ÁREA PICO (mUA*s)
Catequina	0,7	30,71070

Tabla 4. Precisión del método en la determinación de Taninos (Catequina)

Ensayo	Concentración (mg/mL)	Área pico (mUA*s)	Cantidad recuperada (mg/mL)	Cantidad recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Desviación estándar relativa (%) (2,0%)
1	8 (80%)	294,70282	7,86	98,31	99,71	1,76	1,77
		305,12030	8,13	101,70			
		297,24002	7,93	99,13			
2	10 (100%)	376,56897	9,99	99,94	100,36	1,25	1,24
		383,63437	10,17	101,77			
		374,43006	9,93	99,38			
3	12 (120%)	452,04816	11,95	99,64	99,83	0,89	0,89
		449,36517	11,88	99,05			
		457,43646	12,09	100,80			
PROMEDIO (%)				99,97			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR				1,20			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (%) (2,0%)				1,20			

Tabla 5. Exactitud del método en la determinación de Catequina en pepa de palta

Ensayo	Concentración (mg/mL)	Área pico (mUA*s)	Cantidad recuperada (mg/mL)	Cantidad recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Desviación estándar relativa (%) (2,0%)
1	10	377,72824	10,02	100,24	99,55	0,66	0,66
		372,66486	9,89	98,92			
		374,83847	9,94	99,49			
2	12	460,75049	12,18	101,52	100,78	0,66	0,65
		454,89499	12,03	100,25			
		456,27179	12,06	100,55			
3	14	538,66953	14,20	101,49	101,07	0,76	0,75
		531,64719	14,02	100,19			
		538,81268	14,21	101,52			
PROMEDIO (%)				100,46			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR				0,92			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (%) (2,0%)				0,91			

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir en:

- La curva de calibración para Taninos (Catequina) está regida por la ecuación $Y = 38,454X - 7,7433$ con un coeficiente de correlación de 0,9998.
- El límite de detección para Taninos (Catequina) es de 0,21 µg/mL.
- El límite de cuantificación para Taninos (Catequina) es de 0,7 µg/mL.
- La precisión del sistema en la determinación de Taninos (Catequina) obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.
- La precisión del método en la determinación de Taninos (Catequina) obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.
- La exactitud del método en la determinación de Taninos (Catequina), obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.

5. LITERATURA CITADA

[1] Contreras-Domínguez M, Marnet N, Perraud-Gaime I, Roussos S, Guyot S, Augur C. Degradación inicial de taninos condensados por *Aspergillus fumigatus* MC8. XI Congreso

Nacional De Biotecnología y Bioingeniería. 2005; México (Yucatán).

- [2] Sánchez LM, Mancebo B, Faure R, Travieso MC. Validación de la técnica para la determinación de catequina en tabletas de *Rhizophora mangle* L. por CLAR. *Revista Cubana de Farmacia*. 2010; 45(1): 58-70.
- [3] Cala M, Vásquez A, Garcia A, Martinez JR, Stashenko E. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2011; 136(35): 371-379.
- [4] Gracia Nava Manuel Alejandro. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. *Rev Acad* 2009; 1-4.
- [5] Mónica Cala, Ángela Vásquez, Alejandro García. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.:* Volumen xxxv, número 136-septiembre de 2011: 2 -3.
- [6] J. A. García-Fajardo; M. del R. Ramos-Godínez; J. Mora-Galindo Estructura de la semilla de

- aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas 1999. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 123-128. 3-4.
- [7] Miguel A. Sogorb Sánchez, Eugenio Vilanova Gisbert. 2004. "Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos" Aplicaciones Toxicológicas, Medioambientales y Alimentarias. Editorial Dios de Santos – España. Cap. 9, pág. 173.
- [7] Ramón Compañó B.- Ángel Ríos C. "Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos". Editorial Síntesis – España. Cap. 11, pág. 213-241.
- [9] Harvey, David. 2002. "Química Analítica Moderna". Editorial Concepción Fernández – España.
- [10] Ledezma M. Determinación de vitamina C en frutas por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC". *Tecnología en marcha*.
- [11] Skoog D.; Holler F.; Nieman T. 2001 "Principios de Análisis Instrumental". 50 ed. Editorial Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A. Madrid (España). Pág. 11-19, 937-939.
- [12] Willard H.; Dean J. ; Settle F. 1991. "Métodos Instrumentales de Análisis". 5ta edición, Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México D.F. (México) pág. 1 y 2.
- [13] Miller J.C., Miller j.n. 1993 "Estadística para Química Analítica". 20 ed. Edición Addison-Wisley Iberoamericana. Delaware (E.U.A.). pág. 42-52.
- [14] Willey 2007, HPLC for Pharmaceutical Scientists, editado por YURI KAZAKEVICH y ROSARIO LOBRUTTO.
- [15] Quattrocchi O. A., Abelaida S. I., Lava R. F. "Introducción a la HPLC- Aplicación y práctica", Argentina. 1992.
- [16] Candelas M. G., Alanís M. G., Del Río F. "Extracción y cuantificación por HPLC de licopeno en tomate y polvo de tomate". Universidad autónoma de Guanajuato. México.
- [17] Callejón R. "Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales" Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. España.
- [18] Mostacero J., Mejía F., Gamarra O. "Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú". Universidad Nacional de Trujillo 2.a ed. 2002.
- [19] Meyer R, Chardonnnes F, Hübner P, Lüthy J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 1996; 203: 339–344.
- [20] Hupfer Ch, Hotzel H, Sachse K, Engel KH. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1998; 206: 203–207.
- [11] Agater IB, Brianth KJ, Liewellyn JW, Sawyer R, Bailey J, Hitchcock CHS. The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. *J Sci Food Agric* 1986; 37: 317–331.
- [22] Janssen FW, Voortman G, De Baai JA. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and imonoperoxidase staining. *J Agric Food Chem* 1987; 35: 563–567.
- [23] Molander E. Determination of soya protein in meat products by standard curves obtained from SDS gel electrophoresis. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1982; 174: 278–281.
- [24] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 1994; 45: 4635–4638.
- [25] Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K. Isoflavones in soy-based infant formulas. *J Agric Food Chem* 1997; 42: 1666–1673.
- [26] Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 1994; 9: 1905–1913.
- [27] Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 1998; 264: 1–7.
- [28] Wilkinson AP, Wähälä K, Williamson G. Identification and quantitation of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *J Chromatogr B* 2002; 777: 93–109.
- [29] Franke AA, Custer LJ, Wang W, Yang, Shi CH. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and human fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 37: 263–272.
- [30] Körs M, Steinhart H. CTAB electrophoresis and immunoblotting: a new method for the determination of soy proteins in meat products. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 205: 224–226.

- [31] Shihabi ZK, Kute T, Garcia LL, Hinsdale M. Analysis of isoflavones by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1994; 680: 181–185.
- [32] Klejdus B, Vitamvášová D, Kubáň V. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1999; 839: 261–263.
- [33] Griffith AP, Collison MW. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2001; 913: 397–413.
- [34] Careri M, Elviri L, Mangia A. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of isoflavonoids in soybeans. Study of extraction procedure by experimental design. *Chromatographia* 2001; 54: 45–50.
- [35] Hutabarat LS, Mulholland M, Greendlied H. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 1998; 795: 377–382.