

**Validación del método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de
Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de
azúcar**

Sandra Patricia Orozco Pabón

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Química Farmacéutica
Santiago de Cali, Valle del Cauca
2016

**Validación del método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de
Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de
azúcar**

Sandra Patricia Orozco Pabón

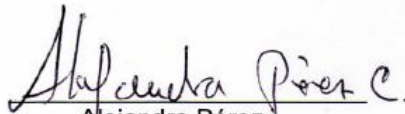
TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA

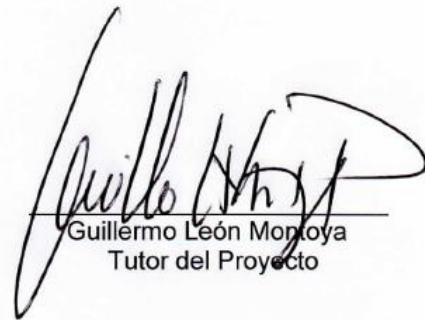
Tutores: Guillermo León Montoya Peláez, PhD. y Claudia Patricia Marín, MBA

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Química Farmacéutica
Santiago de Cali, Valle del Cauca
2016



APROBADO POR:


Alejandra Pérez
Evaluadora


Guillermo León Montoya
Tutor del Proyecto

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de proyecto de grado por brindarme todo el apoyo en el ámbito académico y personal.

A mi esposo, padres y familia por apoyarme incondicionalmente durante toda esta etapa de mi vida.

A mis compañeros y amigos de la Universidad con quienes compartí y aprendí constantemente, gracias por su amistad.

A Lina y Julio, por creer en mí e impulsarme a estudiar esta hermosa carrera. A mis amigas y amigos que siempre tuvieron una palabra de apoyo.

A la Universidad Icesi por brindarme las herramientas necesarias para convertirme en una gran profesional.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE GRÁFICAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ANEXOS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
2.1 Planteamiento del problema de investigación y su justificación.....	14
2.2 Marco teórico y estado del arte	15
2.2.1 Industria azucarera en Colombia	15
2.2.2 El azúcar y la melaza.....	16
2.2.3 Ácido <i>trans</i> -Aconítico	17
2.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de arreglo de fotodiodos (PDA)	18
2.2.5 Validación de métodos analíticos y sus parámetros.....	20
2.3 Objetivos	21
2.3.1 Objetivo general.....	21
2.3.2 Objetivos específicos	21
2.4 Metodología	22
2.4.1 Procedimiento del método analítico HPLC- PDA	22
2.4.2 Realización de protocolo de validación	22
2.4.3 Validación del método analítico	23
2.4.4 Procedimiento Operativo Estándar (POE).....	26
2.5 Resultados y discusión.....	27
2.5.1 Especificidad	27
2.5.2 Linealidad	32
2.5.3 Precisión.....	37
2.5.4 Exactitud.....	41
2.5.5 Límite de detección y cuantificación.....	42
2.5.6 Robustez	44
2.5.7 Estabilidad de la solución	45

2.5.8 Degradación ácida	48
2.6 Conclusiones.....	51
2.7 Recomendaciones.....	51
3. REFERENCIAS	53
4. ANEXOS.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Datos obtenidos de concentración de Ácido trans-Aconítico vs áreas para linealidad del sistema.	32
Tabla 2: Datos obtenidos de concentración de Ácido trans-Aconítico vs áreas para linealidad del método.	35
Tabla 3: Datos obtenidos para la determinación de la precisión del sistema instrumental.	37
Tabla 4: Datos obtenidos para la determinación de la precisión del método (Analista 1-Día 1).	38
Tabla 5: Datos obtenidos para la determinación de precisión intermedia (Analista 2-Día 2)	40
Tabla 6: Datos de porcentaje de ATA en melaza. Analista 1 y 2.	40
Tabla 7: Datos obtenidos para la determinación de exactitud del método.	41
Tabla 8: Datos obtenidos para la determinación del límite de detección y cuantificación.	42
Tabla 9: Datos obtenidos para determinación de robustez.	45
Tabla 10: Datos obtenidos para la determinación de estabilidad de la solución. ...	46

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Producción de melaza para mercado nacional 2006-2015. (Asocaña, 2016)	16
Gráfica 2: Linealidad del sistema. Área de estándar Ácido <i>trans</i> -Aconítico vs concentración de estándar Ácido <i>trans</i> -Aconítico	33
Gráfica 3: Linealidad del método. Área de estándar Ácido <i>trans</i> -Aconítico vs concentración de estándar Ácido <i>trans</i> -Aconítico	36
Gráfica 4: Límite de detección y cuantificación.	43
Gráfica 5: Estabilidad de la solución A) Solución estándar de Ácido <i>trans</i> -Aconítico B) Solución muestra de melaza.....	47
Gráfica 6: Degradación ácida pH 2.5. A) Solución estándar de Ácido <i>trans</i> -Aconítico B) Solución muestra de melaza.....	49
Gráfica 7: Resultados de cuantificación de Ácido <i>trans</i> -Aconítico en diversas matrices.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de fabricación de azúcar. (Ingenio El Viejo, 2011)	17
Figura 2: Estructura del Ácido <i>trans</i> -Aconítico	18
Figura 3: Funcionamiento del detector PDA (Swartz, 2010).....	19
Figura 4: Estándar de Ácido <i>trans</i> -Aconítico. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA.	27
Figura 5: Estándar de Ácido <i>cis</i> -Aconítico. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA.	28
Figura 6: Muestra de melaza. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA	29
Figura 7: A) Cromatograma de solución de azúcar blanca B) Cromatograma de solución blanco (Agua tipo I).....	30
Figura 8: Cromatograma de resolución entre estándares de Ácido <i>trans</i> -Aconítico y Ácido <i>cis</i> -Aconítico.....	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de validación del método analítico cromatográfico para la cuantificación de Ácido <i>trans</i> -Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.	55
Anexo 2: Procedimiento operativo estándar (POE) de la utilización del método analítico cromatográfico para la cuantificación de Ácido <i>trans</i> -Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.	73

RESUMEN

El Valle del Cauca posee una gran cantidad de hectáreas de tierra sembradas con caña de azúcar. Por esta razón, es el mayor productor de azúcar y melaza del país. Esta última es un subproducto que se obtiene como resultado del proceso productivo del azúcar.

La melaza está compuesta por diversas sustancias, entre las cuales se encuentra el Ácido *trans*-Aconítico (ATA) que resulta muy útil en los procesos asociados al desarrollo de nuevos materiales poliméricos de gran importancia tanto en la industria de empaques y alimentos como en la biomédica. Dependiendo del tipo de melaza, se puede encontrar entre 0.9% y 5.5% de Ácido *trans*-Aconítico.

Por lo tanto, a fin de obtener un método cromatográfico idóneo, económico y accesible para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza proveniente de la caña de azúcar, se planteó la validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) y la elaboración del procedimiento analítico estándar (POE) de dicho método.

Para lograr estos objetivos, se evaluaron los siguientes parámetros de validación: linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), robustez, exactitud, especificidad, estabilidad de solución, límite de detección y cuantificación del método analítico, obteniendo como resultado que dichos parámetros cumplieron en su totalidad con los criterios de aceptación establecidos en la literatura, y además, el método analítico tiene un límite de detección y cuantificación de 0.00093% y 0.0010% de Ácido *trans*-Aconítico en melaza respectivamente. También, se determinó que las soluciones estándar y muestra son estables hasta 12 horas y no son sensibles a degradación ácida. De acuerdo a lo anterior, se concluyó que el método analítico desarrollado para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza se encuentra validado y es apto para su utilización.

Finalmente, este proyecto contribuirá al desarrollo de nuevas investigaciones en torno a los métodos de extracción del Ácido *trans*-Aconítico, que son de alta importancia para obtener productos de gran valor y utilidad que se deriven de subproductos de procesos industriales como la obtención del azúcar. Con respecto a esto, cabe destacar que estas investigaciones evitarán la síntesis de sustancias por medios artificiales y se incentivará la extracción de productos a partir de fuentes naturales, que ayuden a disminuir los impactos ambientales.

Palabras claves: Validación, Ácido *trans*-Aconítico, Melaza, Cromatografía Líquida.

ABSTRACT

The state of *Valle del Cauca* located in Colombia, has a great amount of land hectares cultivated with sugar cane, for this reason, it is the major producer of sugar and molasses in the country. Molasses is a sub-product which is obtained as a result of the sugar productive process.

Molasses is composed of several substances, and one of them is the *trans*-Aconitic acid (TAA) that is very useful in associated processes for the development of new polymeric materials, which are very important in the packaging, food and bio-medic industries. Depending on the type or source of molasses, the *trans*-Aconitic acid (TAA) could have a concentration of 0.9% and 5.5%.

Therefore, with the aim of obtaining a chromatographic method suitable, economic and accessible for quantification of *trans*-Aconitic acid in molasses resulting from sugar cane, it was proposed a validation of the analytical method of high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-PDA) and the elaboration of the standard operating procedure (SOP) of this method.

In order to achieve these objectives, the parameters evaluated were: linearity, precision (repeatability and intermediate precision), robustness, accuracy, specificity, stability of solution, detection and quantification limit of the analytical method, obtaining as a result, that all of these parameters accomplished the acceptance criteria established in the literature, besides, the analytical method has a detection and quantification limit of 0.00093% and 0.0010% of *trans*-Aconitic acid respectively. In addition, it was determined that the standard and sample solutions, are stable for 12 hours and are not sensitive for acid degradation. According to this, it was concluded that the analytical method developed for the quantification of *trans*-Aconitic acid in molasses, is validated and suitable for its utilization.

Finally, this project will contribute to the development of new investigations about extraction methods of *trans*-Aconitic acid; which are of great importance, in order to obtain products of great value and utility, which are derived from sub-products of industrial processes, such as, the sugar extraction. In order to this, is very important to highlight that artificial synthesis processes of substances like these, are avoided, and the extraction, starting from natural sources, will be incentivized, and as a result, the negative impact in the environment will decrease.

Keywords: *Validation, trans-Aconitic acid, Molasses, Liquid Chromatography.*

1. INTRODUCCIÓN

La melaza es un subproducto derivado del proceso de obtención de azúcar proveniente de la caña y se emplea principalmente como edulcorante. En el 2014, se reportaron 230.303 hectáreas sembradas con caña de azúcar de las cuales el Valle del Cauca posee el 72.2% (Asocaña, 2015). Sin embargo, la diversidad de sus componentes ha dado pie a múltiples investigaciones, dentro de las que se destaca el Ácido *trans*-Aconítico, que se encuentra en mayor proporción en este subproducto. Malmay y colaboradores realizaron ensayos con el método de extracción líquido-líquido para la obtención de ácidos carboxílicos de la melaza debido a su aplicación en la industria alimenticia y química (Malmay, Monteil, & Molinier, 1995). Por otro lado, Pislor y colaboradores compararon además de dicho método; la precipitación y la cromatografía (Pislor, Pontalier, & Albet, 2009). Kanitkar y colaboradores en el año 2013, desarrollaron ensayos de recuperación de Ácido *trans*-Aconítico con una pureza del 99.9%, encontrando que puede ser utilizado para sintetizar polímeros útiles en la industria biomédica (Kanitkar, Aita, & Madsen, 2013).

Estos importantes estudios de extracción de Ácido *trans*-Aconítico y sus aplicaciones, crearon la necesidad de desarrollar métodos analíticos con el objetivo de cuantificar este ácido en la melaza y así calcular su porcentaje de recuperación. Montoya y colaboradores desarrollaron y validaron un método cromatográfico (UPLC) con detector *light scattering* y el grupo de productos naturales de la Universidad Icesi desarrolló a inicios del año 2016 un método cromatográfico (HPLC) con detector PDA (Montoya, Londoño, Cortés, & Izquierdo, 2014).

En la actualidad el método de cuantificación que se desarrolló y validó en la Universidad Icesi (Montoya et al., 2014) tiene un costo elevado, es poco robusto y de baja reproducibilidad. A causa de esto, se desarrolló un método HPLC-PDA que es más económico, sencillo y de uso rutinario en la misma Universidad que requiere ser validado para comprobar que es idóneo y confiable. Por lo tanto, este proyecto tiene como objetivos validar dicho método de acuerdo a parámetros reportados en la literatura que son definidos en el protocolo de validación previamente y realizar un procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización rutinaria del método. Para lograrlo se evaluaron parámetros de validación como exactitud, precisión, linealidad, especificidad, robustez, degradación ácida, estabilidad de solución, límite de detección y cuantificación, con el fin de evaluar el sistema instrumental y el método analítico.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema de investigación y su justificación.

El Valle del Cauca es el mayor productor de azúcar del país; razón por la cual grandes cantidades de melaza se generan como resultado del proceso productivo del azúcar. Técnicamente, la melaza se obtiene después del proceso de cristalización del azúcar y es de interés no solo por su propiedad edulcorante, sino por su alto contenido de Ácido *trans*-Aconítico, que la convierte en una fuente natural y económica de este compuesto.

El Ácido *trans*-Aconítico tiene aplicaciones industriales en los alimentos como aditivo saborizante y en la industria de empaques alimentarios como películas antioxidantes debido a que es un agente entrecruzante de cadenas poliméricas de baja toxicidad, lo que hace que su cuantificación y extracción sea de vital importancia. Debido a esto, se están realizando investigaciones en la Universidad Icesi sobre posibles métodos de extracción de este ácido de la melaza, con el fin de aprovechar este bioproducto que se encuentra de forma abundante y es de fácil adquisición en la región.

Es así como, surge la necesidad de contar con un método analítico validado de cuantificación del Ácido *trans*-Aconítico en la melaza, con el objetivo de medir el rendimiento del proceso de extracción.

En la literatura se encuentran varios métodos para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en diferentes matrices, sin embargo, se encuentran pocos métodos para la determinación del ácido en la melaza. Uno de ellos fue desarrollado y validado en la Universidad Icesi, donde se utilizó un cromatógrafo líquido UPLC con detector *light scattering* (Montoya et al., 2014). El equipo utilizado y el detector tienen un costo muy alto, por lo que es de difícil adquisición para industrias pequeñas y laboratorios de investigación con limitado poder adquisitivo. Además, el detector *light scattering* presenta variaciones en la cuantificación del analito que afectan la reproducibilidad y robustez del método.

A raíz de lo anterior, se desarrolló un método por cromatografía líquida HPLC con detector de arreglo de fotodiodos, que es un equipo más sencillo y económico que el UPLC (cromatografía líquida de ultra-alta resolución) que será validado, con el objetivo de desafiar el método y comprobar que los resultados que se obtengan en la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico son confiables y que pequeñas variaciones en el desarrollo del método, como cambio de analista, cambios en días de análisis, factores ambientales y demás perturbaciones en la metodología, no afectan el resultado del análisis y que cualquier persona capacitada en el área

analítica puede seguir el procedimiento como está escrito y obtener siempre los mismos resultados.

Por consiguiente, la validación del método de cuantificación del Ácido *trans*-Aconítico, hace parte del proceso de obtención de un bioproducto valioso que puede ser empleado posteriormente para la creación de nuevos procesos industriales.

2.2 Marco teórico y estado del arte

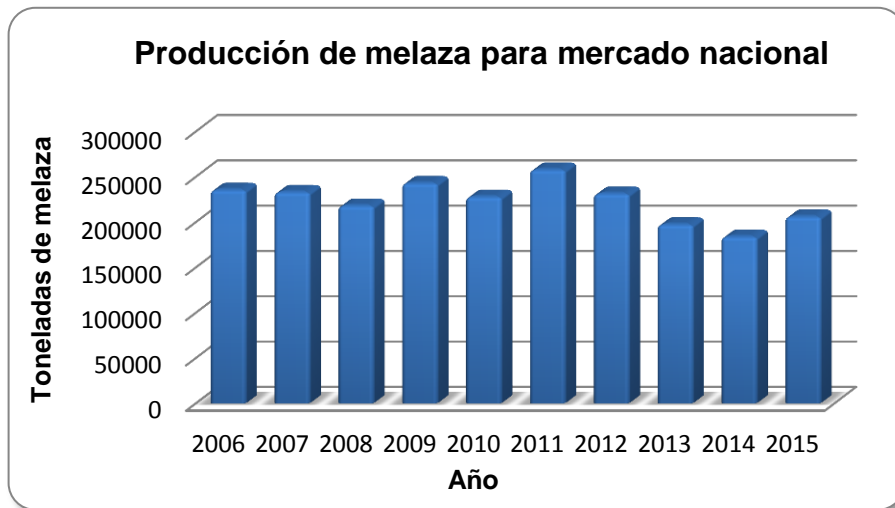
2.2.1 Industria azucarera en Colombia

El sector azucarero en Colombia está ubicado principalmente en cinco departamentos: Caldas, Quindío, Risaralda, Cauca y Valle del Cauca. En el 2014, se reportaron 230.303 hectáreas de área sembrada de caña de azúcar, de las cuales el 25% pertenece a 14 ingenios azucareros y el 75% a 2750 cultivadores de caña. El Valle del Cauca posee el 72.2% de dichas áreas (Asocaña, 2015).

En el año 2015 se exportaron 725 mil toneladas de azúcar y las ventas al mercado nacional fueron de 1.6 millones de toneladas (Asocaña, 2016). Colombia presentó una participación mundial en producción azucarera de 1.4% entre los años 2013 y 2014 (Asocaña, 2015).

Por otra parte, los ingenios azucareros con los que cuenta el país no solo producen azúcar, sino que también algunos de ellos fabrican alcohol carburante, bagazo, que es un subproducto utilizado en la industria papelera, abonos, jugos clarificados, energía eléctrica, preparaciones alimenticias y melazas. (Asocaña, 2015)

En la gráfica 1 se observa el comportamiento de la producción de melaza que está destinada al mercado nacional desde el año 2006 hasta el 2015. Desde el año 2006 se evidencia un comportamiento constante hasta el año 2013, momento en el que se produjo una disminución en la cantidad de melaza disponible para el mercado nacional generado por el aumento de exportación del producto. (Asocaña, 2016)



Gráfica 1: Producción de melaza para mercado nacional 2006-2015. (Asocaña, 2016)

2.2.2 El azúcar y la melaza

El proceso de obtención de azúcar a partir de la caña se ilustra en la figura 1. Éste comienza con la recepción y preparación de la caña, donde los tallos entran a una mesa alimentadora para ser cortados y desfibrados por un juego de cuchillas. Las fibras de caña pasan a una serie de molinos que extraen el jugo diluido. Una vez en el último molino se obtiene el bagazo, que es la fibra resultante del proceso de molienda (Flores, Galicia, Lassmann, Osorio, & Senties, 2008).

Seguidamente, el jugo diluido se somete a un proceso de depuración y clarificación por medio de la adición de cal y una elevación de temperatura hasta los 105°C. En esta etapa se eliminan impurezas insolubles con la reacción química que se presenta entre el jugo, cal y la adición de un floculante que permite la separación de lodos mediante un proceso de sedimentación. El lodo que contiene un bajo porcentaje de sacarosa, se evacúa por la parte inferior del clarificador y el jugo claro se extrae por la parte superior. El lodo se mezcla con bagazillo (cachaza) y se somete a filtración para extraer jugo filtrado que vuelve al proceso de clarificación (Flores et al., 2008).

Posteriormente, el jugo claro extraído del clarificador se somete a evaporación para eliminar la mayor parte de agua contenida, para producir finalmente meladura, la cual está compuesta por sacarosa cristalizante que es azúcar, y no cristalizante, que se denomina miel. La meladura pasa a unos tachos donde se termina de evaporar y se forma una masa compuesta por cristales y miel, que luego se envía a centrifugadores donde se separan los cristales de azúcar de la

miel final (melaza), que es un material no cristalizable. Finalmente, los cristales se secan para obtener el azúcar. (Flores et al., 2008)

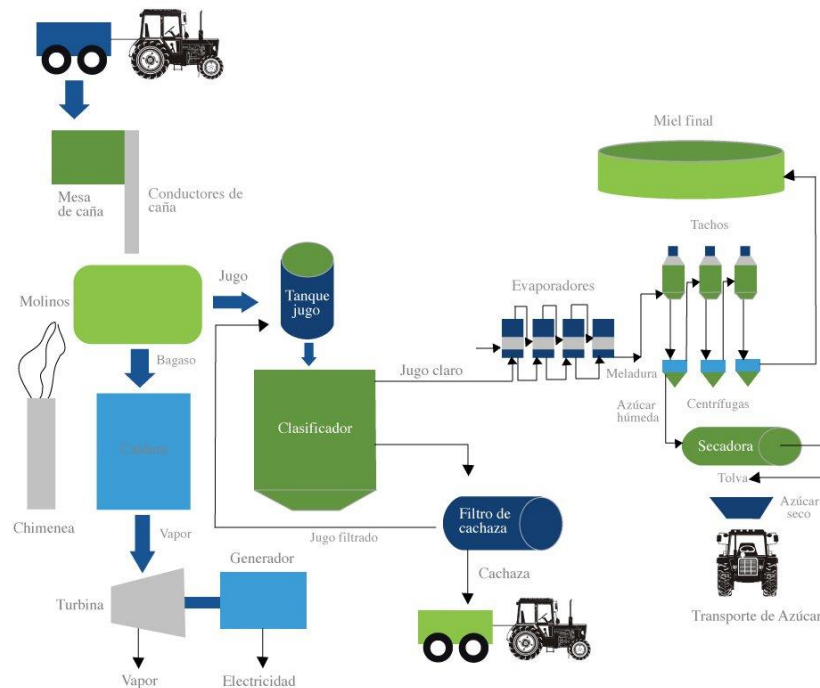


Figura 1: Proceso de fabricación de azúcar. (Ingenio El Viejo, 2011)

Asimismo, la melaza es un subproducto del proceso de obtención de azúcar a partir de la caña, y como se observa en la gráfica 1, se produce en cantidades significativas en el país, lo que ha fomentado la investigación para el aprovechamiento de este compuesto.

El jugo de caña está compuesto por sacarosa en mayor proporción, glucosa, fructosa, oligosacáridos, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas, almidón, ceras, flavonoides y polifenoles entre otros. (Zossi, Cárdenas, Sorol, & Sastre, 2010). La melaza contiene los mismos componentes que el jugo de caña, además de calcio, magnesio, fósforo, potasio, niacina, piridoxina y riboflavina entre otros. Su composición varía de acuerdo a la variedad de caña de azúcar, suelo, clima y sistema de evaporación en el proceso de fabricación del azúcar (Castillo & Forero, 2007)

2.2.3 Ácido *trans*-Aconítico

El ácido carboxílico de interés en este proyecto es el Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza en mayor proporción, aunque también se presenta en bajas cantidades en su forma isomérica *cis*, debido a que es utilizado por la planta de

caña en el ciclo de Krebs y se almacena poco en la planta (Gil. N, 2007). En el proceso de clarificación del jugo de caña se elimina aproximadamente un 16% del Ácido Áconítico, que se puede encontrar posteriormente en la melaza. (Zossi et al., 2010). Éste es un ácido orgánico tribásico insaturado que se encuentra en forma de sólido de color blanco, con un punto de fusión de 195°C. Dependiendo del tipo de melaza, se puede encontrar entre 0.9% y 5.5%. (Kanitkar et al., 2013). Estos autores, lograron extraer Ácido *trans*-Aconítico en una melaza proveniente de Louisiana, EEUU que contenía el 2.8% del ácido con un rendimiento de 34% a 69% y pureza de 99%.

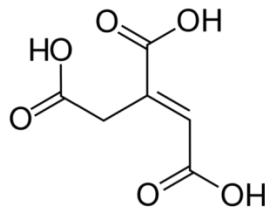


Figura 2: Estructura del Ácido *trans*-Aconítico

El Ácido *trans*-Aconítico es utilizado como un bioproducto que actúa como agente entrecruzante de cadenas poliméricas que está aprobado por la FDA como aditivo saborizante de alimentos. En un estudio realizado por Gilfillan y colaboradores se encontró que el Ácido Áconítico tiene propiedades elastoméricas para formación de capas con almidón que pueden ser utilizadas además de la industria de empaques, en medicina como películas de barrera junto con agentes antibacteriales y como películas antioxidantes en el empaque de alimentos (Gilfillan & Doherty, 2016). Además, los biopolímeros producidos con este ácido pueden utilizarse como andamios en ingeniería de tejidos o para liberación de fármacos en aplicaciones biomédicas (Kanitkar et al., 2013).

2.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de arreglo de fotodiodos (PDA)

Para cuantificar el Ácido *trans*-Aconítico en la melaza, se recibió la asistencia del área de investigación de productos naturales a cargo del profesor Guillermo Montoya y del área de validaciones de métodos analíticos a cargo de la profesora Claudia Patricia Marín de la Universidad Icesi, para desarrollar el método por HPLC en fase reversa, que tiene como principio la utilización de una fase estacionaria menos polar que la fase móvil, la cual es principalmente acuosa.

El principio de separación de la cromatografía por fase reversa depende de la interacción hidrofóbica de enlace entre el analito que está siendo arrastrado por la fase móvil, y un ligando hidrofóbico presente en la fase estacionaria. Por lo tanto,

la adsorción del compuesto de interés con la fase estacionaria, es proporcional a la superficie de contacto alrededor de un fragmento apolar del analito que interacciona con la fase móvil, es decir, que debido a la elevada tensión superficial de la fase móvil acuosa y a la hidrofobicidad del analito, este es desplazado de la fase móvil hacia la fase estacionaria. (Meyer, 2004)(Cristóbal, Peña, Aguarales, Córdoba, & González, 2011).

Como se observa en la figura 2, el Ácido *trans*-Aconítico tiene en su estructura tres ácidos carboxílicos, donde dos de ellos generan una densidad electrónica que produce un momento dipolar que se puede cancelar entre los mismos, lo que puede estar generando una apolaridad en la molécula que hace que este compuesto se retenga en una columna C18, siguiendo el principio de interacción hidrofóbica de enlace.

Por otro lado, la señal del método se obtiene por medio de un detector PDA, cuyo principio es detectar en una o más longitudes de onda, generadas por una lámpara de amplio espectro. Este instrumento puede sintonizarse para operar en la máxima absorbancia del analito o en la longitud de onda donde se presenta mayor selectividad del mismo (Swartz, 2010). De esta manera, estas características del detector contribuyen no solo a la cuantificación del analito en cuestión, sino que también es una herramienta muy valiosa para la validación del método, en términos de la confirmación de la identidad del Ácido *trans*-Aconítico y la determinación de la pureza de la señal.

En la figura 3 se observa un esquema del funcionamiento del detector PDA, donde la luz de una lámpara de amplio espectro pasa a través de una celda de flujo antes de golpear una rejilla de refracción, lo que permite que se distribuya a través de un arreglo de fotodiodos que recibe todas las longitudes de onda dispersadas (Swartz, 2010).

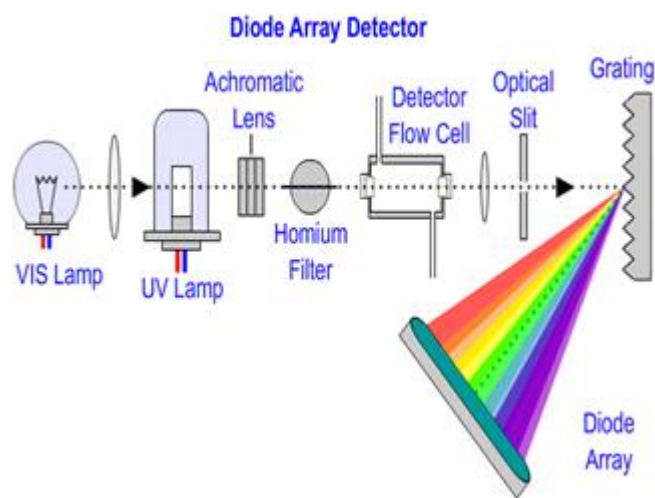


Figura 3: Funcionamiento del detector PDA (Swartz, 2010)

Uno de los métodos existentes para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza fue desarrollado y validado en la Universidad Icesi, donde se utilizó un cromatógrafo líquido UPLC con un detector *light scattering* (Montoya et al., 2014), que es un método más costoso y menos reproducible, debido a que el detector nebuliza la muestra que proviene de la columna cromatográfica. Para lograr dicho proceso, se utiliza nitrógeno; gas que se encarga de arrastrar la muestra.

2.2.5 Validación de métodos analíticos y sus parámetros

La validación de un método analítico es el proceso documentado mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio, que el método es adecuado para su utilización (ICH, 2005).

Los parámetros a evaluar para validar el método analítico son: exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, estabilidad de la solución, degradación ácida, linealidad, rango, y robustez (FDA, 2015). Esto con el objetivo de desafiar el método y validar que los resultados que se obtengan en la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza por medio del HPLC-PDA son confiables, y que pequeñas variaciones en el desarrollo del método, no afectan el resultado del análisis y que cualquier persona capacitada en el área analítica puede seguir el POE obteniendo siempre los mismos resultados.

La evaluación de la especificidad de un método analítico, permite determinar su capacidad para identificar el analito en presencia de los demás componentes que se encuentran en la matriz, sin riesgo de interferencias en la señal. Por otro lado, la determinación de la exactitud expresa la cercanía entre un valor verdadero y el valor determinado en la cuantificación del analito, expresado en porcentaje de recuperación (ICH, 2005).

La precisión del método brinda información sobre la cercanía entre una serie de datos obtenidos después de varias preparaciones de una misma muestra homogénea, con lo que se evalúa la repetibilidad del método analítico. Además, la realización de precisión intermedia toma en cuenta la variación que puede surgir en el análisis realizado por varios analistas en días diferentes (ICH, 2005).

Seguidamente, otros de los parámetros que se evalúan son la linealidad y rango, asumidos como la capacidad que tiene el método de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito. Además, se determina el límite de detección y cuantificación, que es la cantidad mínima que el método puede detectar y cuantificar respectivamente (ICH, 2005).

La robustez es una medida de la capacidad que tiene el método de permanecer constante al ser sometido a pequeñas variaciones cromatográficas, en el caso del equipo HPLC (fase móvil, temperatura columna, flujo)(ICH, 2005).

Además, en los métodos analíticos donde es necesario preparar soluciones muestra, se debe evaluar en lo posible su estabilidad, con el objetivo de utilizar dichas soluciones por un periodo de tiempo adecuado, especialmente en el caso de métodos instrumentales como el HPLC, donde las corridas de las muestras son largas o la cantidad de estas son significativas, permaneciendo un largo periodo de tiempo en el equipo.(McPolin, 2009)

Finalmente, otro de los parámetros a evaluar en una validación es la degradación forzada, donde el estándar y la muestra del producto que se están analizando se someten a degradaciones bajo varias condiciones de estrés (luz, calor, oxidación, humedad, hidrólisis ácida y básica). Esto con el fin de brindar información sobre qué productos de degradación se pueden esperar (McPolin, 2009).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Validar el método para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza proveniente de la caña de azúcar por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de fotodiodos, de acuerdo a los parámetros reportados en la literatura, para diciembre de 2016.

2.3.2 Objetivos específicos

- Elaborar un protocolo de validación del método cromatográfico para la cuantificación del Ácido *trans*-Aconítico en la melaza con los diferentes parámetros a evaluar.
- Validar el método analítico de acuerdo a los parámetros establecidos en la guía ICH Q2 R1, con el fin de comprobar su idoneidad en la cuantificación de Ácido *trans*- Aconítico en la melaza.
- Realizar un procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización rutinaria del método cromatográfico de cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza.

2.4 Metodología

2.4.1 Procedimiento del método analítico HPLC- PDA

El método cromatográfico HPLC-PDA de cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza que se validó, consiste en la preparación de una curva de calibración de estándar de dicho ácido en Agua tipo I entre 20 y 200 ppm, que por medio de una regresión lineal, se determinó la ecuación de la recta que permitió hallar la concentración de Ácido *trans*-Aconítico presente en una muestra preparada de melaza en Agua tipo I de 5 mg/mL. Los estándares y las muestras se inyectan en el equipo con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Equipo HPLC con detector PDA.(Chrom Elite Merck)
- Columna: Kinetex C18 2.6 µm 100mm x 4.60 mm (Utilizar pre-columna)
- Flujo: 0.8 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua pH 2.5 (Con HCl) : Acetonitrilo (95:5)
- Longitud de onda: 240 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL
- Tiempo de retención aproximado: 2.5 minutos

Por lo tanto, para el desarrollo del presente proyecto de grado se propusieron tres etapas para dar cumplimiento a los objetivos propuestos: realización del protocolo de validación, validación del método analítico y por último, la realización de un procedimiento operativo estándar (POE).

2.4.2 Realización de protocolo de validación

Para la ejecución del protocolo, primero se consultó la normatividad internacional vigente como la ICH Q2 R1, que establece los parámetros de validación aplicables dependiendo del tipo de procedimiento analítico que se quiere desafiar, en este caso, un método de cuantificación. Además, se revisaron los lineamientos específicos para la validación de métodos analíticos con matrices alimenticias de la FDA. (FDA, 2015)

Una vez se establecieron los parámetros, se realizó el protocolo de validación del método cromatográfico HPLC-PDA de cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en la melaza, en el cual se definieron los objetivos, alcance, antecedentes, responsabilidades y autoridades, parámetros a evaluar durante la validación, materiales, equipos y descripción del proceso de cuantificación del Ácido *trans*-Aconítico, incluyendo la metodología detallada para la realización de cada

parámetro de validación, criterios de aceptación y recomendaciones generales para llevar a cabo la validación.

Este fue el documento guía para el seguimiento del proceso de validación (Anexo 1).

2.4.3 Validación del método analítico

Para desafiar el método analítico cromatográfico, se evaluaron los siguientes parámetros de validación: exactitud, linealidad, rango, precisión (sistema, método y precisión intermedia), especificidad, robustez, estabilidad de la solución, hidrólisis ácida, límite de detección y cuantificación.

2.4.3.1 Especificidad

Se realizaron inyecciones en el equipo HPLC-PDA de blanco (Agua tipo I), matriz blanco (Azúcar blanca), muestra (Melaza) y estándares de Ácido *trans*-Aconítico y Ácido *cis*-Aconítico a concentración de 100 ppm, con el objetivo de analizar si hay alguna interferencia de alguno de estos componentes en el tiempo de retención del pico de interés, a la longitud de onda máxima de absorción establecida en el método analítico, donde la cuantificación es más conveniente que es 240 nm. Además, se determinó el parámetro de pureza de pico, que por medio del detector de arreglo de fotodiodos pudo ser analizado, el cual confirma que la señal es ópticamente pura y que no hay interferencias debido a otros componentes de la muestra o a los solventes utilizados en el método de analítico.

2.4.3.2 Linealidad y rango

Este parámetro de validación se realizó para establecer una relación lineal entre la respuesta y la concentración del analito. Se evaluó la linealidad del sistema instrumental y del método. Por lo tanto, se llevó a cabo por medio de la curva de calibración estándar utilizada en el método de cuantificación del Ácido *trans*-Aconítico, en la cual se utiliza estándar del mismo, para realizar una regresión lineal. (ICH, 2005)

Asimismo, para la linealidad del sistema se preparó una solución stock a una concentración de 500 ppm de Ácido *trans*-Aconítico y posteriormente se tomaron diferentes alícuotas de esta solución para la preparación de las soluciones a 5 niveles de concentración que harán parte de la curva de calibración. (20, 60, 100, 150 y 200 ppm). La linealidad del método se realizó de un modo similar, pero

utilizando 5 matrices enriquecidas (soluciones de azúcar blanca a las que se le adiciona la cantidad definida de estándar de Ácido *trans*-Aconítico), una por cada nivel de concentración.

La linealidad se estableció por medio de la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta de los datos obtenidos a las diferentes concentraciones. Por medio de esta se halla el coeficiente de correlación (r), el intercepto (b), pendiente de la línea de regresión (m) y la suma de cuadrados residuales para determinar el test de homogeneidad de varianzas.

El rango se estableció por medio de la prueba de linealidad, puesto que es el intervalo de concentraciones de la curva de calibración estándar.

2.4.3.3 Precisión

Precisión del sistema: Se prepararon dos estándares de Ácido *trans*-Aconítico en una concentración de 100 ppm. Se inyectaron en el equipo HPLC-PDA, cinco veces consecutivas cada uno de estos y se determinó el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas en las cinco repeticiones de cada estándar.

Precisión del método: Se realizó inyectando la curva de calibración estándar y 6 muestras de melaza para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico. Se determinó el porcentaje del analito, la desviación estándar y se comparó con el criterio de aceptación establecido en la literatura para determinar la precisión.

Precisión intermedia: Se realizó el mismo procedimiento para la determinación de precisión del método, pero lo ejecutó un analista diferente, en un día diferente al realizado anteriormente. Se tomaron los datos de los dos analistas, se determinó el porcentaje del Ácido *trans*-Aconítico en melaza y la desviación estándar de estos valores, que finalmente se compararon con el criterio de aceptación establecido en el protocolo de validación.

2.4.3.4 Exactitud

Se determinó enriqueciendo una matriz blanco, que es una sustancia que se asemeja a la melaza y sus componentes, (azúcar blanca), con estándar de Ácido *trans*-Aconítico, con el fin de establecer una concentración conocida del analito que posteriormente se pudiera cuantificar, para así, determinar un porcentaje de recuperación del ácido que corresponda a la cantidad adicionada de estándar del mismo.

Por consiguiente, se enriqueció la matriz blanco (azúcar blanca) con 3 niveles de concentración del estándar de: 80%, 100% y 120% por triplicado que corresponden a concentraciones de 80, 100 y 120 ppm, los cuales posteriormente se inyectaron en el equipo HPLC junto con la curva de calibración estándar, esto con el fin de cuantificar el Ácido *trans*-Aconítico presente y determinar el porcentaje de recuperación y desviación estándar de las 3 réplicas de cada nivel de concentración (ICH, 2005). Además, se realizó la prueba de Cochran que permitió evaluar si las varianzas de las concentraciones son equivalentes (Cuadrado & Forn, 2001). Estos valores se compararon con los criterios de aceptación establecidos en el protocolo.

2.4.3.5 Límite de detección y cuantificación

Estos límites se determinaron por medio del método de la ICH Q2/R1 basado en la realización de una curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones de estándar de Ácido *trans*-Aconítico con 3 concentraciones conocidas por triplicado, cercanas a los límites de detección y cuantificación esperados (2, 10 y 20 ppm) y se inyectaron en el equipo HPLC-PDA. Se determinó la ecuación de la recta de la concentración vs respuesta y seguidamente, se extrapola a concentración cero en dicha ecuación, con el fin de obtener la señal ruido del equipo. Luego, se graficó la desviación estándar de las respuestas halladas anteriormente con respecto a las concentraciones evaluadas, con el fin de definir la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido.

De esta forma, con las ecuaciones definidas en la literatura, se calculó el límite de cuantificación del método que es igual a la concentración del Ácido *trans*-Aconítico que proporciona una señal 10 veces mayor al ruido y el límite de detección proporciona una señal 3 veces mayor al ruido. (Cuadrado & Forn, 2001).

2.4.3.6 Robustez

Para evaluar este parámetro se preparó un estándar de Ácido *trans*-Aconítico a una concentración de 100 ppm y se inyectó por duplicado al equipo HPLC-PDA a las condiciones cromatográficas especificadas en el método analítico. Luego se realizaron variaciones a dichas condiciones y se inyectó igualmente por duplicado a cada una de las modificaciones, con el objetivo de determinar los tiempos de retención del pico de Ácido *trans*-Aconítico y los platos teóricos de la columna cromatográfica. Las variaciones a las condiciones cromatográficas del método analítico fueron las siguientes(ICH, 2005):

- *Composición de la fase móvil ($\pm 2\%$):*
Condición 1: Acetonitrilo : Agua pH 2.5 (3: 97) y Condición 2: Acetonitrilo : Agua pH 2.5 (7: 93).
- *Temperatura de la columna cromatográfica ($\pm 2^\circ\text{C}$)*
Condición 1: 23°C y Condición 2: 27°C .
- *Tasa de flujo ($\pm 0.1 \text{ mL/min}$):*
Condición 1: 0.7 mL/min y Condición 2: 0.9 mL/min
- *pH de la fase móvil (± 5 unidades de pH):*
Condición 1: 2.0 y Condición 2: 3.0

2.4.3.7 Estabilidad de la solución

La estabilidad de la solución se realizó preparando estándar de Ácido *trans*-Aconítico a una concentración de 100 ppm y solución muestra de melaza. Estas soluciones se inyectaron en el equipo HPLC-PDA cada hora por un periodo de tiempo de 12 horas, para cuantificar la cantidad de Ácido *trans*-Aconítico en cada tiempo, y así observar el tiempo máximo que las soluciones pueden permanecer preparadas sin alterar su concentración con respecto al tiempo de inicio.

2.4.3.8 Degradación ácida

Se preparó estándar de Ácido *trans*-Aconítico a una concentración de 100 ppm y solución muestra de melaza reemplazando el Agua tipo I por Agua a pH 2.5 con Ácido Clorhídrico. Estas dos soluciones se inyectaron en el equipo HPLC-PDA cada hora por un periodo de tiempo de 12 horas, con el fin de cuantificar la cantidad de Ácido *trans*-Aconítico en cada tiempo y observar si hay degradación del analito en medio ácido.

2.4.4 Procedimiento Operativo Estándar (POE)

Una vez culminada la validación del método y analizados todos los resultados, se elaboró el POE del método analítico, que incluye objetivo, alcance, responsabilidades y autoridades, materiales y equipos, descripción detallada del procedimiento (preparación muestras, estándares y condiciones cromatográficas), referencias e historial de cambios. En el POE se especificaron las recomendaciones que se deben tener en cuenta durante la ejecución del método, como resultado de la validación (Anexo 2).

2.5 Resultados y discusión

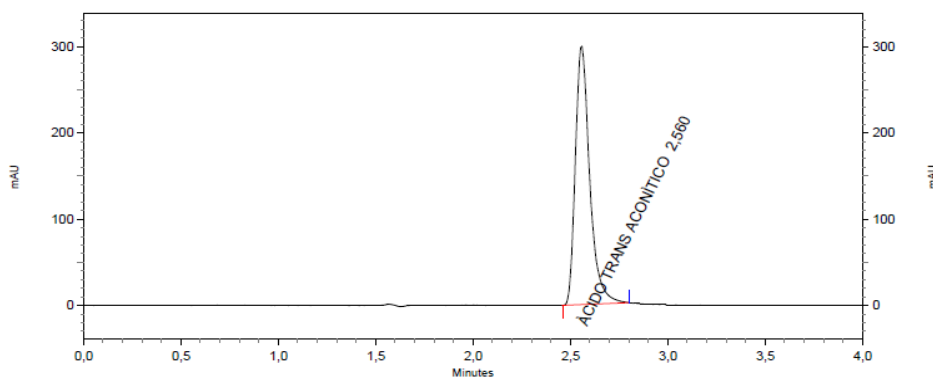
Todos los parámetros de validación se realizaron aplicando las condiciones cromatográficas descritas en el punto 2.4.1 del método analítico HPLC-PDA. Los resultados para cada uno de ellos fueron los siguientes:

2.5.1 Especificidad

Estos son los resultados de las inyecciones en el equipo HPLC-PDA de las diferentes soluciones para determinar la especificidad del método.

A

DAD-CH1 240 nm Results					
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Peak purity
ÁCIDO TRANS ACONÍTICO	2,56	6128612	6224	1,4	1,000000



B

C:\PROYECTOS LCU No.3\ACIDO TRANS ACONITICO\Data\11JUL2016\STD 100 PPM ATA 0

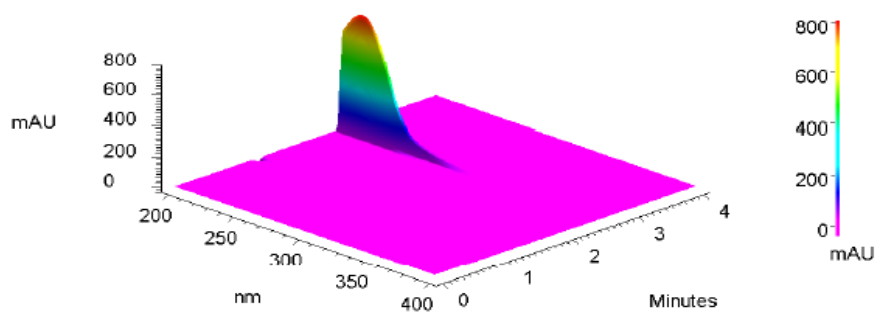
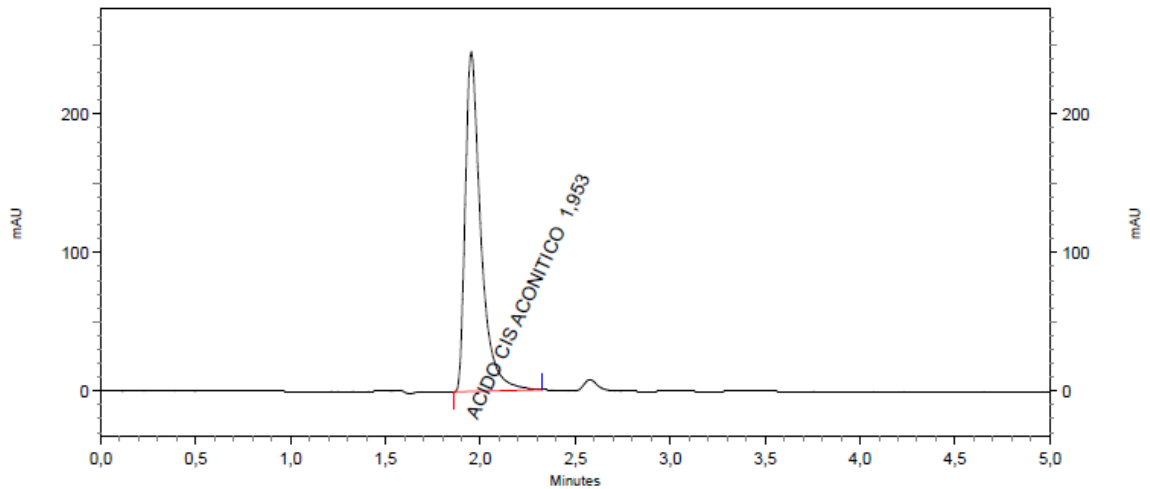


Figura 4: Estándar de Ácido *trans*-Aconítico. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA.

A

DAD-CH1 240
nm Results

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Peak purity
ACIDO CIS ACONITICO	1,95	5591624	3045	1,9	1,000000



B

C:\PROYECTOS LCU No.3\ACIDO TRANS ACONITICO\Data\11JUL2016\STD ACIDO CIS_ACC

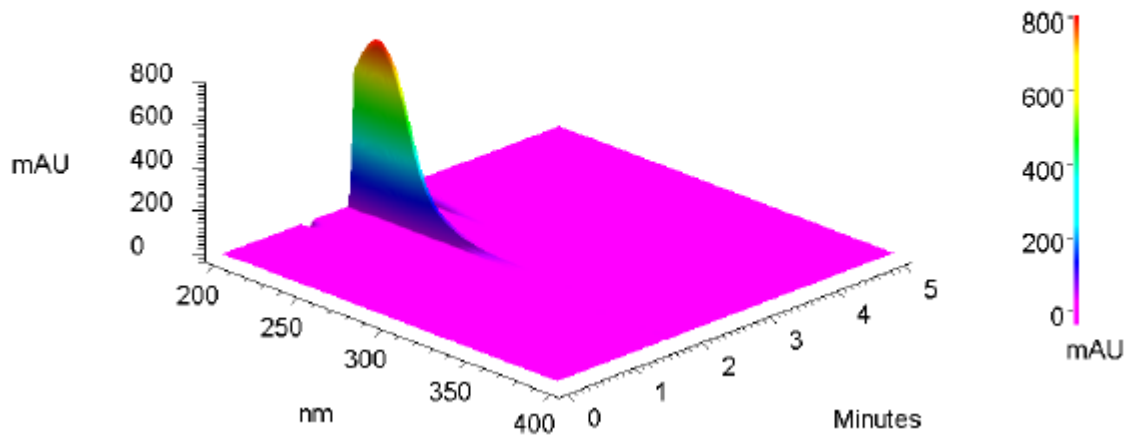
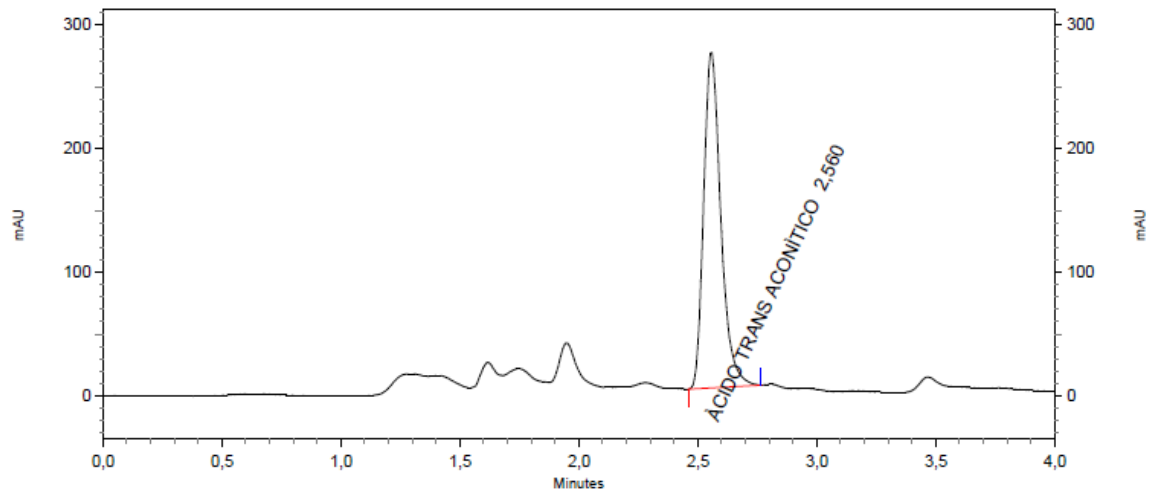


Figura 5: Estándar de Ácido *cis*-Aconítico. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA.

A

DAD-CH1 240
nm Results

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Peak purity
ÁCIDO TRANS ACONÍTICO	2,56	5430750	6283	1,3	0,996422



B

C:\PROYECTOS LCU No.3\ACIDO TRANS ACONITICO\Data\11JUL2016\M1 MELAZA

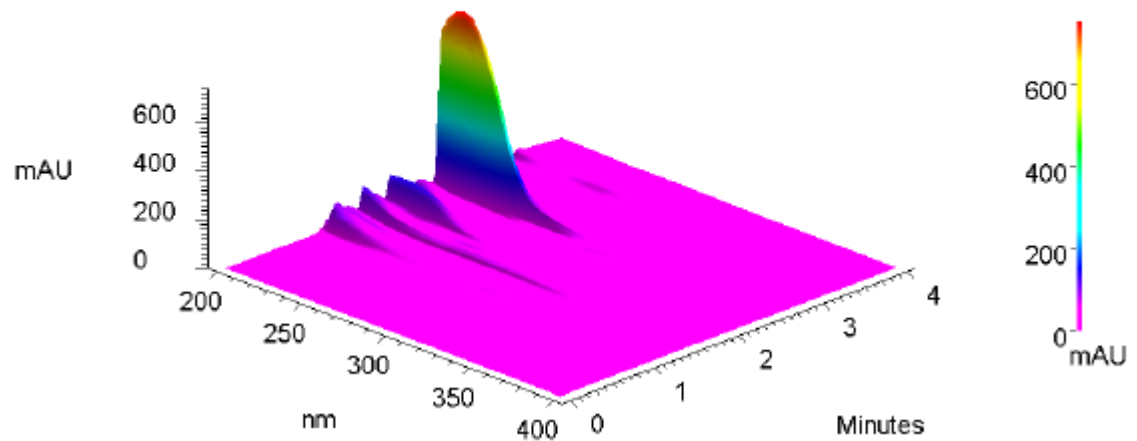
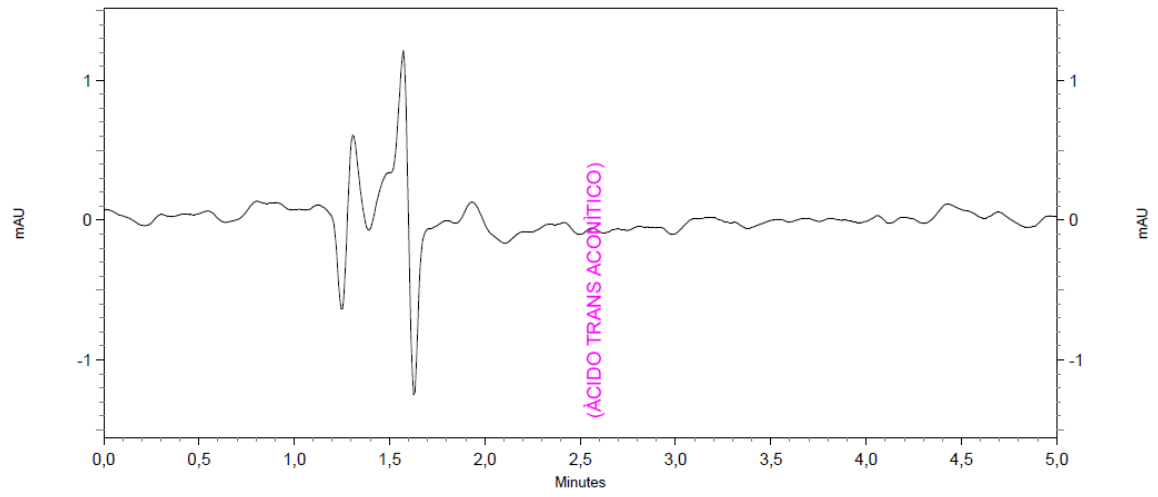


Figura 6: Muestra de melaza. A) Cromatograma a 240 nm. B) Cromatograma 3D detector PDA

A



B

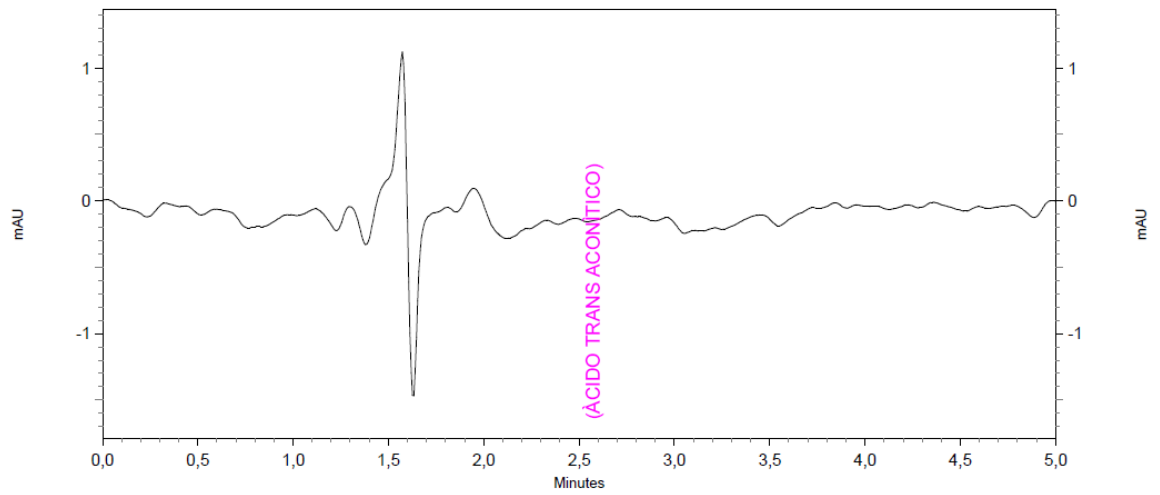


Figura 7: A) Cromatograma de solución de azúcar blanca B) Cromatograma de solución blanco (Agua tipo I).

Los tiempos de retención del Ácido *trans*-Aconítico y *cis*-Aconítico son de 2.6 min y 1.9 min respectivamente. La resolución entre los dos picos es de 5.1 como se observa en la figura 8. Por consiguiente, el método tiene la capacidad de separar dichos isómeros. Además, en las soluciones de azúcar blanca y blanco (Agua tipo I) no se detecta Ácido *trans*-Aconítico que pueda producir interferencias en la medición de dicho analito (Figura 7A y 7B). Esto es muy importante, dado que la azúcar blanca es utilizada en la validación como matriz blanco, debido a su similitud en componentes a la melaza pero que no contiene el analito en estudio.

El parámetro de pureza de pico del Ácido *trans*-Aconítico en la solución estándar es de 1.000000 y en la solución muestra (melaza) es de 0.996422 como se observa en las figuras 4 y 6 respectivamente.

DAD-CH1	240 nm Results Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Resolution (USP)
	ACIDO CIS ACONITICO	1,89	7064835	3798	1,7	0,0
	ACIDO TRANS ACONITICO	2,52	6347092	6521	1,5	5,1

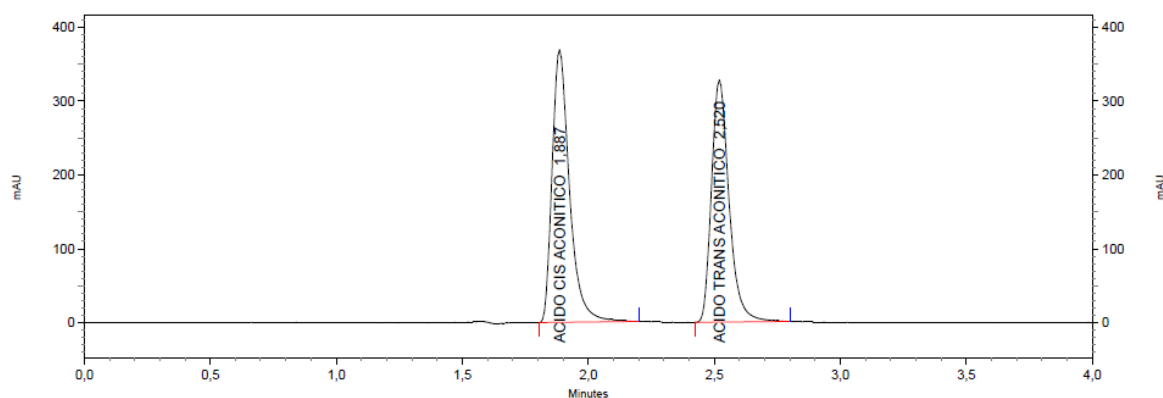


Figura 8: Cromatograma de resolución entre estándares de Ácido *trans*-Aconítico y Ácido *cis*-Aconítico.

El criterio de aceptación del parámetro de pureza de pico para el software *EZ-Chrome* utilizado, es un valor cercano a 1.0000, por lo que se puede decir que el pico de Ácido *trans*-Aconítico en la solución estándar y muestra es puro ópticamente, y que no hay ningún tipo de interferencias que afecten el valor del área determinada por el método. Es decir, que al observar los cromatogramas 3D de las figuras 4b y 6b, no se observan señales al tiempo de retención de 2.6 min, en otras longitudes de onda que disminuyan la pureza de la señal obtenida del analito.

En la figura 6a y 6b, se observan señales pequeñas pertenecientes a los diferentes componentes de la melaza, sin embargo, ninguno de estos picos se solapa con el pico de Ácido *trans*-Aconítico en su tiempo de retención.

Por estas razones, se concluye que el método analítico es específico puesto que tiene la capacidad de identificar y cuantificar el Ácido *trans*-Aconítico de forma inequívoca en presencia de los diferentes componentes de la melaza y además, asegura que la respuesta obtenida es debida solo al analito. (Cuadrado & Forn, 2001)

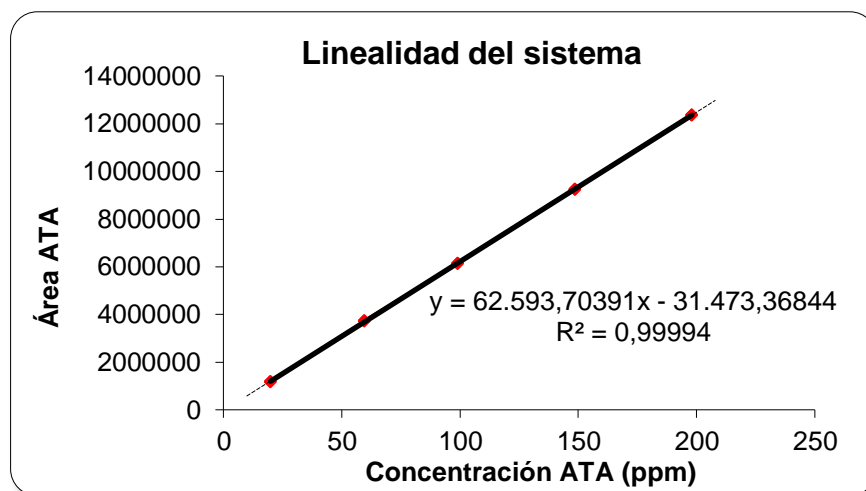
2.5.2 Linealidad

2.5.2.1 Linealidad del sistema

Inicialmente se evaluó la linealidad del sistema instrumental por medio de una curva de calibración de estándares de Ácido *trans*-Aconítico, obteniendo los valores de la tabla 1.

Concentración teórica ATA (ppm)	Concentración real ATA ppm	Respuesta/ Áreas
20	20	1170197
20	20	1183275
20	20	1185162
60	59	3725144
60	59	3746251
60	59	3748476
100	99	6128612
100	99	6143266
100	99	6164849
150	148	9240493
150	148	9236049
150	148	9268523
200	198	12367889
200	198	12348960
200	198	12379598
SUMAS =	1574	98036744

Tabla 1: Datos obtenidos de concentración de Ácido *trans*-Aconítico vs áreas para linealidad del sistema.



Gráfica 2: Linealidad del sistema. Área de estándar Ácido *trans*-Aconítico vs concentración de estándar Ácido *trans*-Aconítico

El coeficiente de correlación (r) hallado fue de 0.99997 y el coeficiente de determinación (r^2) fue de 0.99994. Debido a que el criterio de aceptación para el parámetro r , es que este debe ser mayor a 0.99990 (Bliesner, 2006), se puede concluir que hay un alto grado de relación entre la concentración y las áreas obtenidas como respuestas del sistema instrumental.

Además del parámetro de correlación, se realizó un análisis de varianzas por medio del test de Cochran, a través del cual se determinó el valor de G_{exp} con la ecuación 1, cuyo resultado fue de 0.626. S^2_{max} es la varianza máxima de los estándares a todos los niveles de concentración y se divide entre la varianza de cada estándar.

$$G_{exp} = \frac{S^2_{max}}{S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5} \quad \text{Ecuación 1}$$

El G_{tablas} fue de 0.683 con un grado de significación de $\alpha=0,05$, $K=5$ (niveles de concentración) y $n=3$ (réplicas por cada nivel). Puesto que, el criterio de aceptación es que el G experimental es menor al G de tablas., se concluye que las varianzas de cada concentración son homogéneas y el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados. (Cuadrado & Forn, 2001).

También se realizó el test de la pendiente, que permite comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero. Esto se realizó por medio de la prueba t de Student con la ecuación 2, donde b es la pendiente y S_b es la raíz de la varianza de la pendiente.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{Sb}$$

Ecuación 2

El valor obtenido del t_{exp} fue de 449.56, y el t_{tablas} que es el valor de distribución de student teórico, fue de 2.16. Este último, se determinó para n-2 grados de libertad y un grado de significación $\alpha=0,05$. El criterio de aceptación es que el valor del t experimental debe ser mayor al t de tablas. Por lo tanto, la pendiente es estadísticamente distinta de cero.

Finalmente, se realizó el test de coeficiente de variación de factores de respuesta. Estos últimos, son una expresión de la sensibilidad de calibración, es decir, que los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Así que, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 2% para que cumpla el test (Cuadrado & Forn, 2001). El coeficiente de variación se determinó por medio de la ecuación 3.

$$CV = \frac{S_f}{\bar{f}} \times 100$$

Ecuación 3

El factor de respuesta es el cociente entre la respuesta (Área del pico) y la concentración de cada estándar, S_f es la desviación estándar promedio de los factores de respuesta de cada estándar y \bar{f} es el promedio de los factores de respuesta de cada estándar. El coeficiente de variación hallado fue de 0.326, por lo que se puede decir que los factores de respuesta son semejantes entre sí.

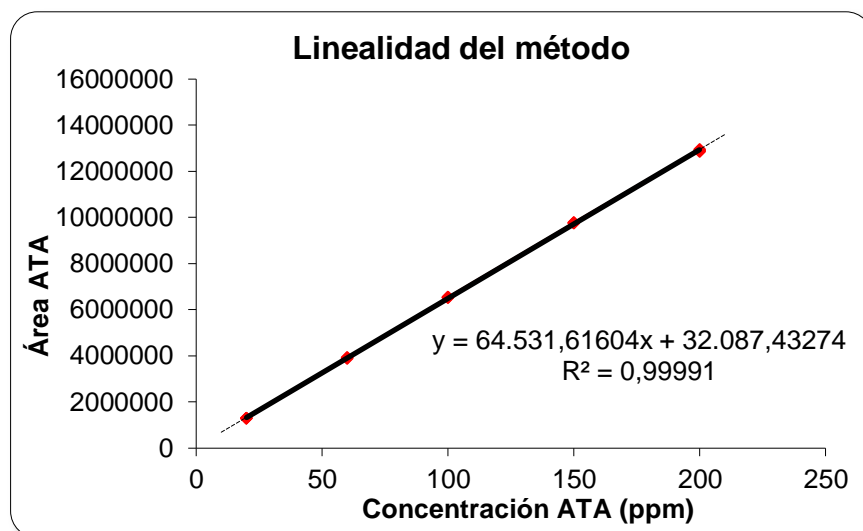
En conclusión, el sistema instrumental cumple el test de correlación, coeficiente de variación de factores de respuesta, test de la pendiente y homogeneidad de varianzas, por consiguiente, el sistema cumple linealidad, por lo que hay una relación directamente proporcional entre la concentración del estándar y la respuesta.

2.5.2.2 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó por medio de una curva de calibración de matrices enriquecidas, es decir, matriz blanco (Azúcar blanca) con Ácido *trans*-Aconítico, con los mismos parámetros que en la linealidad del sistema, obteniendo los valores de la tabla 2.

Concentración teórica ATA (ppm)	Concentración real ATA ppm	Respuesta/ Áreas
20	20	1298598
20	20	1288258
20	20	1289056
60	60	3889135
60	60	3913801
60	60	3904560
100	100	6505566
100	100	6532170
100	100	6529616
150	150	9748941
150	150	9744644
150	150	9763265
200	200	12932147
200	200	12898730
200	200	12848094
SUMAS =	1574	98036744

Tabla 2: Datos obtenidos de concentración de Ácido trans-Aconítico vs áreas para la linealidad del método.



Gráfica 3: Linealidad del método. Área de estándar Ácido *trans*-Aconítico vs concentración de estándar Ácido *trans*-Aconítico

El coeficiente de correlación (r) hallado es de 0.99996 y el coeficiente de determinación (r^2) es de 0.99991, por lo que se puede concluir que hay un alto grado de relación entre la concentración y las áreas obtenidas como respuestas del sistema instrumental.

En el análisis de varianzas por medio del test de Cochran, donde se determinó el valor de G_{exp} con la ecuación 1 descrita en el punto 2.5.2.1, se obtuvo un valor de 0.421.

El G_{tablas} fue de 0.683 con un grado de significación de $\alpha=0,05$, $K=5$ (niveles de concentración) y $n=3$ (réplicas por cada nivel). Por lo tanto, se concluye que las varianzas de cada concentración son homogéneas y el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados. (Cuadrado & Forn, 2001).

De la misma forma que en la linealidad del sistema, se realizó el test de la pendiente por medio de la prueba t de Student con la ecuación 2 descrita en el punto 2.5.2.1. El valor obtenido del t_{exp} fue de 381.51 y el t_{tablas} que es el valor de distribución de student teórico, fue de 2.16. Este último, se determinó para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación $\alpha=0,05$. El criterio de aceptación es que el valor de t experimental es mayor al t de tablas. Por lo tanto, la pendiente es estadísticamente distinta de cero

Finalmente, el test de coeficiente de variación de factores de respuesta se determinó por medio de la ecuación 3 descrita en el punto 2.5.2.1. El valor hallado fue de 0.283, por lo que se puede decir que los factores de respuesta son semejantes entre sí.

En conclusión, el método analítico cumple el test de correlación, coeficiente de variación de factores de respuesta, test de la pendiente y homogeneidad de varianzas, por consiguiente, el método cumple linealidad, por lo que hay una relación directamente proporcional entre la concentración del estándar y la respuesta.

2.5.3 Precisión

2.5.3.1 Precisión del sistema

Se obtuvieron los siguientes resultados, para la evaluación de la repetibilidad del sistema instrumental.

Repetición	Área Estándar 1 Ácido <i>trans</i> - Aconítico	Área Estándar 2 Ácido <i>trans</i> - Aconítico
1	6704277	6689787
2	6688261	6678398
3	6626912	6666079
4	6620096	6667270
5	6619572	6681919
Promedio	6651824	6676691
Desviación estándar	41068	10038
Coefficiente de variación	0.62%	0.15%

Tabla 3: Datos obtenidos para la determinación de la precisión del sistema instrumental.

Se inyectaron en el equipo HPLC-PDA dos estándares de Ácido *trans*-Aconítico. Se pesaron de forma independiente y cada uno se inyectó 5 veces consecutivas obteniéndose los resultados observados en la tabla 3. Las áreas del estándar 1 y 2 tienen coeficientes de variación de 0.62% y 0.15% respectivamente. Esto quiere decir, que el sistema es repetible, dado que el criterio de aceptación para métodos cromatográficos de este parámetro es máximo 2.0%. (Bliesner, 2006). En otras

palabras, se puede asegurar que cuando el equipo HPLC-PDA realiza inyecciones consecutivas de un mismo estándar, lo hace con la precisión requerida, y que al cuantificar con el promedio de varias inyecciones, se están obteniendo resultados confiables.

2.5.3.2 Precisión del método

Estándar ATA			Muestra melaza					
Replica	Conc (ppm)	Área	Replica	Área	Peso (mg)	ATA (ppm)	% ATA	
1	19.8	1179545	1	5430750	51,7	87,26	1,688	
2	59.4	3739957	2	5482410	51,4	88,09	1,714	
3	99.0	6145576	3	5383350	51,1	86,51	1,693	
4	148.5	9248355	4	5457668	51.4	87,69	1,706	
5	198.0	12365482	5	5470768	52.3	87,90	1,681	
Intercepto -31473.0			6	5512802	51.9	88,58	1,707	
Pendiente 62593.7							Prom	1.698
r 0.99997							Desv std	0.01
							% CV	0.75

Tabla 4: Datos obtenidos para la determinación de la precisión del método (Analista 1-Día 1)

En la tabla 4, se encuentran los datos obtenidos de las inyecciones en el equipo HPLC-PDA, de la curva de calibración de estándares de Ácido-*trans* Aconítico y muestras de melaza preparadas de forma independiente. Los cálculos de concentración de estándar ATA (ppm), concentración de ATA en melaza en ppm y porcentaje se realizaron con las siguientes ecuaciones:

$$ppm \text{ std curva calibración ATA} = \left(\frac{W_{std}(mg)}{20 \text{ mL}} \times \frac{Alic \text{ std (mL)}}{10 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{P(\%)}{100} \right)$$

Ecuación 4

$$ATA \text{ en melaza (ppm)} = \frac{\text{área mta} - \text{intercepto curva std}}{\text{pendiente curva std}}$$

Ecuación 5

$$\% \text{ ATA en melaza} = ppm \text{ ATA en mta} \left(\frac{mg}{L} \right) \times \frac{0,010 L}{\text{Peso mta (mg)}} \times 100$$

Ecuación 6

La precisión del método se determinó por medio del coeficiente de variación de los datos obtenidos de porcentaje de Ácido *trans*-Aconítico en melaza que se observan en la tabla 4. Este parámetro fue evaluado por un analista que preparó la curva de calibración estándar y las 6 muestras, en un mismo día y en el equipo HPLC-PDA asignado para el análisis.

El criterio de aceptación que se debe cumplir para concluir que el método es preciso, es que el coeficiente de variación sea menor al 2.0% (Bliesner, 2006). Por esta razón, debido a que dicho valor es de 0.75%, se puede decir que el método es preciso, esto es, que cuando una misma persona prepara diferentes muestras de melaza, obtendrá resultados repetibles, con una mínima dispersión de los datos, lo que le brinda confiabilidad al método.

2.5.3.3 Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia, un analista diferente al que realizó la precisión de método, siguió la misma metodología descrita para dicho parámetro, en el mismo equipo HPLC-PDA asignado para el análisis, pero en un día diferente, con preparación de curva de calibración de estándares de Ácido *trans*-Aconítico y muestras de melaza diferentes al del analista 1. Los datos obtenidos por el analista 2, día 2 fueron los descritos en la tabla 5.

Estándar ATA			Muestra melaza				
Replica	Conc (ppm)	Área	Replica	Área	Peso (mg)	ATA (ppm)	% ATA
1	19.6	1276521	1	5918275	55.6	91.18	1.640
2	58.8	3771530	2	5809959	54.6	89.52	1.640
3	98.0	6335558	3	5972444	56.1	92.01	1.640
4	147.0	9582618	4	5602038	52.7	86.34	1.638

5	196.0	12775070	5	5835182	54.6	89.91	1.647	
Intercepto -31473.0			6	5618628	52.8	86.59	1.640	
Pendiente 62593.7							Prom	1.641
r 0.99997							Desv std	0.003
							% CV	0.18

Tabla 5: Datos obtenidos para la determinación de precisión intermedia (Analista 2-Día 2)

El coeficiente de variación de los datos de porcentaje de Ácido *trans*-Aconítico en melaza del analista 2, fue de 0.18%, el cual cumple con el criterio de aceptación mencionado en el punto 2.5.3.2 de precisión de método.

Además de esto, se analizó el coeficiente de variación final de los datos de los dos analistas en los dos días diferentes de análisis, con el fin de obtener la variación total entre la preparación de dos personas, en días diferentes. Dicho coeficiente de variación final debe ser menor a 2.0% (Bliesner, 2006). En la tabla 6 se relacionan los datos de los dos analistas.

Mta melaza Ana 1	% ATA en melaza	Mta melaza Ana 2	% ATA en melaza
1	1,688	7	1.640
2	1,714	8	1.640
3	1,693	9	1.640
4	1,706	10	1.638
5	1,681	11	1.647
6	1,707	12	1.640
Promedio		1.669	
Desv. Std		0.03	
% CV final		1.87	

Tabla 6: Datos de porcentaje de ATA en melaza. Analista 1 y 2.

El coeficiente de variación final fue de 1.87%, por lo tanto, cumple la precisión intermedia, es decir, que el método es repetible cuando es aplicado por diferentes personas y días de análisis distintos.

2.5.4 Exactitud

Los resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud, se relacionan en la tabla 7.

Conc teor ATA (ppm)	Rep	Área	ATA ppm	% ATA	% recuper	\bar{X}	%CV	Varianza (S ²)
80	1	5287819	80.30	1.606	100.4	100.4	0.03	0.0007
	2	5290584	80.34	1.607	100.4			
	3	5288627	80.31	1.606	100.4			
100	1	6540236	99.36	1.987	99.4	99.2	0.18	0.0333
	2	6531552	99.23	1.985	99.2			
	3	6516526	99,00	1.980	99.0			
120	1	7954920	120.89	2.418	100.7	100.9	0.13	0.0169
	2	7967807	121.08	2.422	100.9			
	3	7975152	121.19	2.424	101.0			
Promedio total					100.16			
Desv. std					0.76			
%CV					0.76			

Tabla 7: Datos obtenidos para la determinación de exactitud del método.

La exactitud del método analítico se determinó por medio del porcentaje de recuperación de Ácido *trans*-Aconítico en una matriz blanco, que en este caso es azúcar blanca. Dicho valor se calculó por medio del cociente entre la concentración (ppm) de Ácido *trans*-Aconítico en el azúcar, obtenida experimentalmente por el método y la concentración teórica de Ácido *trans*-Aconítico (ppm) con la que se enriqueció la matriz blanco, multiplicado por 100. En la tabla 7, se observan los promedios y valores de coeficiente de variación (%CV) para los porcentajes de recuperación de cada nivel de concentración.

El criterio de aceptación para el promedio de porcentaje de recuperación para cada concentración es de 95.0% a 105.0% (Bliesner, 2006), al igual que el promedio total, y los valores obtenidos fueron de 100.4%, 99.2% y 100.9% para 80, 100 y 120 ppm respectivamente. Por lo tanto, el criterio se cumplió. De la misma forma, el porcentaje de coeficiente de variación debe ser menor a 2.0% (Bliesner, 2006) para los mismos parámetros y los datos hallados fueron de 0.03%, 0.18% y 0.13% para 80, 100 y 120 ppm respectivamente, por lo que también se cumplió el criterio.

Además, se aplicó el test de Cochran para determinar si las varianzas de las concentraciones evaluadas son equivalentes. Esto se realizó por medio de la ecuación 1 descrita en el punto 2.5.2.1., con la diferencia que para la exactitud se utilizaron 3 niveles de concentración y por lo tanto el denominador es la suma de las tres varianzas. El valor de G_{exp} hallado fue de 0.654 y el G_{tablas} fue de 0.870 para un grado de significación de $\alpha=0,05$, $K=3$ (niveles de concentración) y $n=3$ (replicas por cada nivel). Dado que, el criterio de aceptación es que el G experimental es menor al G de tablas, se concluyó que las varianzas de cada concentración son equivalentes (Cuadrado & Forn, 2001).

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el método es exacto, puesto que expresa la proximidad entre el valor real del analito y el valor obtenido experimentalmente (Cuadrado & Forn, 2001).

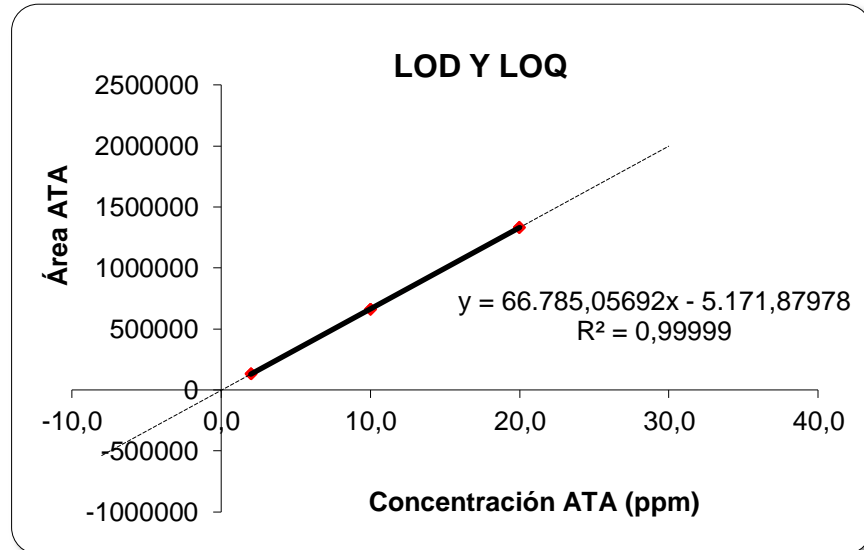
2.5.5 Límite de detección y cuantificación

Se realizó una curva de calibración con estándar de Ácido *trans*-Aconítico a las concentraciones que se mencionan en la tabla 8. Las respuestas obtenidas con los promedios y desviaciones estándar para cada nivel de concentración, también se observan en dicha tabla.

Concentración ATA ppm	Área			Promedio	Desv. std
	1	2	3		
1.9992	129626	129608	129058	129431	322.8
9.9960	661706	659497	660168	660457	1132.5
19.9920	1331754	1332641	1328196	1330864	2352.5

Tabla 8: Datos obtenidos para la determinación del límite de detección y cuantificación

En la gráfica 4, se encuentra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación, producto de la regresión lineal entre la concentración de Ácido *trans*-Aconítico y las áreas obtenidas experimentalmente de la tabla 8.



Gráfica 4: Límite de detección y cuantificación.

Se realizó una extrapolación a concentración cero, en la ecuación de la recta de la gráfica 4, con el propósito de encontrar el área perteneciente a la señal ruido del método. El valor hallado fue de 5171.9 para a_{blanco} .

Luego, se realizó una regresión lineal con los datos de concentración de Ácido *trans*-Aconítico (ppm) y la desviación estándar para cada nivel de concentración observados en la tabla 8. Esta regresión dio como resultado un valor de pendiente de la recta de 113.18 y el intercepto 62.51 con r^2 de 0.997. Al extrapolar en la ecuación de la recta a concentración cero, se obtuvo la desviación estándar de la señal producida por el ruido, S_{blanco} que tiene un valor de 62.51.

Con estos valores se hallan los límites de detección y cuantificación del método analítico por medio de las ecuaciones 7 y 8, donde b es la pendiente de la ecuación de la recta hallada con las concentraciones y áreas de Ácido *trans*-Aconítico ($b=66785.06$) y n es el número de réplicas por nivel ($n=3$).

$$\text{Límite Detección} = \frac{a_{\text{blanco}} + 3S_{\text{blanco}}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 7

$$\text{Límite Cuantificación} = \frac{a_{\text{blanco}} + 10S_{\text{blanco}}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 8

Finalmente, el valor hallado de límite de detección fue de 0.00093% de Ácido *trans*-Aconítico, lo que quiere decir, que el método logra detectar desde esta cantidad de analito en la melaza, y el valor hallado de límite de cuantificación fue de 0.0010% de Ácido *trans*-Aconítico, por lo que este es el valor mínimo que el método logra cuantificar inequívocamente.

2.5.6 Robustez

Los datos obtenidos de tiempo de retención de Ácido *trans*-Aconítico y los platos teóricos de la columna cromatográfica fueron los siguientes:

Variable	Parámetro	Tiempo retención (min)	Platos teóricos	Cumple/ No cumple
Temperatura Condición 1	23°C	2.59	6576	
	%Variación	103.2	3.5	Cumple
Temperatura Condición 2	27°C	2.45	6254	
	% Variación	97.6	1.6	Cumple
Fase móvil Condición 1	Agua 97:ACN 3	3.15	8239	
	%Variación	125.5	29.7	No cumple
Fase móvil Condición 1	Agua 93:ACN 7	2.15	3.15	
	%Variación	85.7	18.4	No cumple
pH Condición 1	2.0	2.65	7175	
	% Variación	105.6	12.9	Cumple
pH Condición 2	3.0	2.32	4540	

	%Variación	92.4	28.5	Cumple
Flujo Condición 1	0.7	2.87	7096	
	%Variación	114.3	11.7	No cumple
Flujo condición 2	0.9	2.25	5819	
	%Variación	89.6	8.4	No cumple

Tabla 9: Datos obtenidos para determinación de robustez

Los datos de la tabla 9 se compararon con los datos hallados de tiempo de retención y platos teóricos del estándar de Ácido *trans*-Aconítico bajo las condiciones cromatográficas sin variaciones. El tiempo de retención fue de 2.51 minutos y los platos teóricos de la columna cromatográfica fueron 6354. Por medio de estos datos, se calculó el porcentaje de variación de cada parámetro, realizando el cociente entre el dato hallado de cada variación de condición y el dato a condiciones cromatográficas sin variaciones y multiplicando por 100.

El criterio de aceptación para definir si el parámetro es robusto, es que el tiempo de retención de Ácido *trans*-Aconítico debe tener una variación entre 90% y 110%, y además, los platos teóricos deben tener una variación menor al 50%. Si no se cumplen estas dos condiciones, se define que el parámetro no cumple robustez.

En la tabla 9, se observa que las variaciones en fase móvil y flujo de la misma por la columna, no cumplen el criterio de aceptación. Esto quiere decir, que las variaciones en la preparación de la fase móvil son críticas en el método analítico, para obtener un tiempo de retención reproducible. Por lo tanto, se recomendará en el procedimiento analítico estándar (POE) que se debe tener especial cuidado en la preparación de la fase móvil y que se debe crear un método en el HPLC-PDA que permita que el mismo equipo realice la mezcla durante el análisis. Esto con el fin de disminuir errores sistemáticos al momento que el analista prepare la mezcla.

Los parámetros de temperatura y pH cumplen con los criterios de aceptación, por lo que no se consideran parámetros sensibles en el método analítico y se puede trabajar hasta estos valores sin que se vea afectada la reproducibilidad del método.

2.5.7 Estabilidad de la solución

Este parámetro se evaluó mediante las áreas obtenidas de Ácido *trans*-Aconítico en la solución estándar y solución muestra de melaza, durante 12 horas de

inyección en el equipo HPLC-PDA. En la tabla 10, se observan los valores al tiempo cero, 6 y 12 horas. Estas áreas de Ácido *trans*-Aconítico (A_t) se utilizaron para calcular un porcentaje de variación con respecto a la respuesta inicial en el tiempo cero (A_{t_0}) para cada solución, por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ variación} = \left(\frac{A_t}{A_{t_0}} \right) \times 100\%$$

Ecuación 9

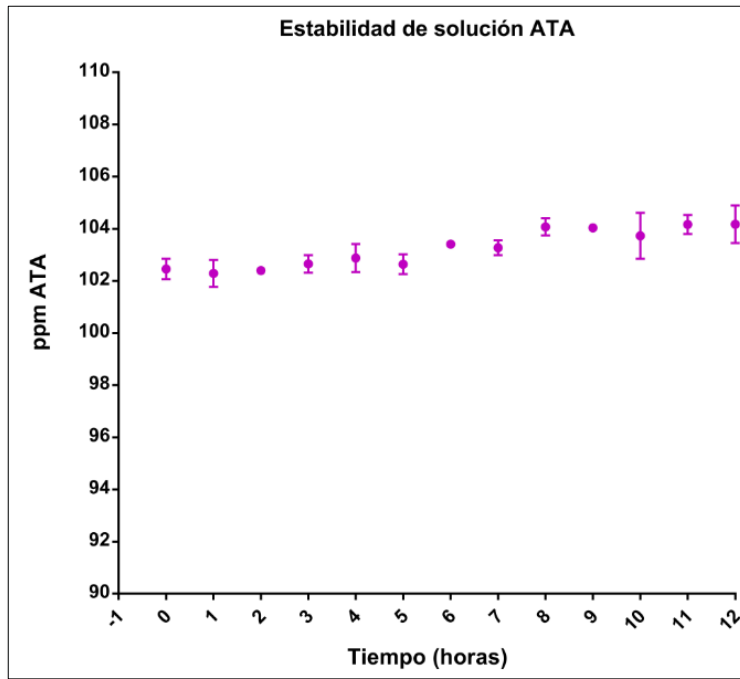
Estándar ATA			Muestra melaza		
Tiempo (horas)	Área ATA	% variación	Tiempo (horas)	Área ATA	% variación
0	6592680	100	0	5479484	100
6	6631729	101	6	5574275	102
12	6652845	101	12	5567684	102

Tabla 10: Datos obtenidos para la determinación de estabilidad de la solución.

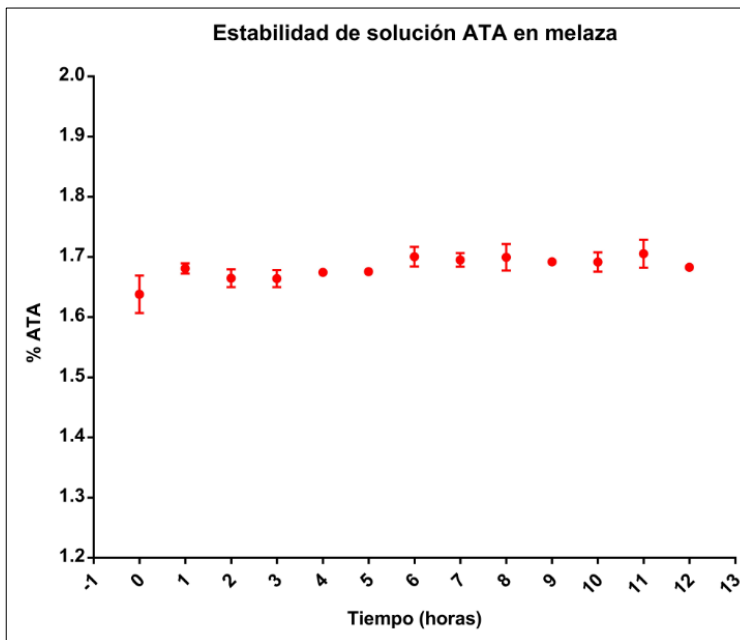
El criterio de aceptación para establecer si la solución es estable, es que el porcentaje de variación se encuentre entre 98 y 102%. Por lo tanto, se concluye que la solución de estándar de Ácido *trans*-Aconítico y la solución muestra de melaza, son estables por 12 horas por lo que cumplen con dicho criterio. Con este parámetro se aseguró que la solución es estable por este periodo de tiempo, una vez es preparada y analizada en el equipo HPLC-PDA.

En la gráfica 5A y 5B, se observa el comportamiento de la concentración de Ácido *trans*-Aconítico, en la solución estándar y muestra cada hora durante las 12 horas de análisis.

A)



B)



Gráfica 5: Estabilidad de la solución A) Solución estándar de Ácido *trans*-Aconítico B) Solución muestra de melaza

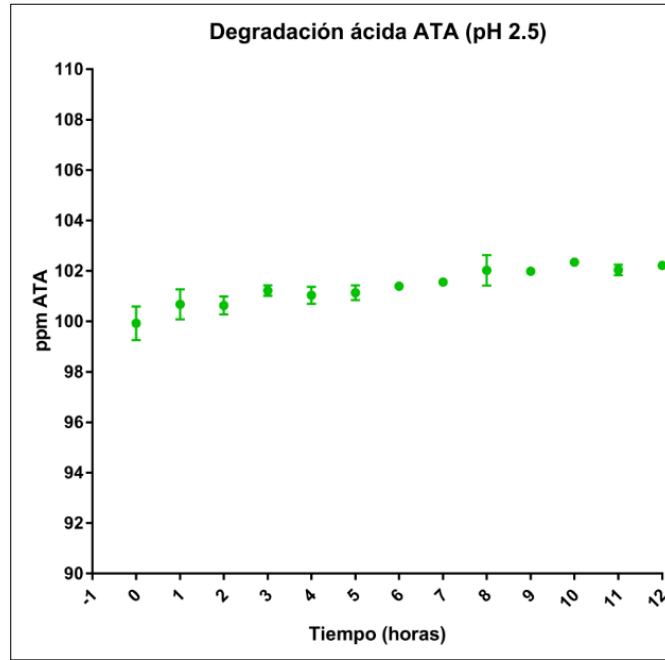
2.5.8 Degradación ácida

Se realizó una degradación ácida de Ácido *trans*-Aconítico en solución estándar y muestra, para evaluar la sensibilidad del analito en medio ácido (pH 2.5) en las dos soluciones, debido a que esta es una de las condiciones de extracción que se ensayan del Ácido *trans*-Aconítico en la melaza.

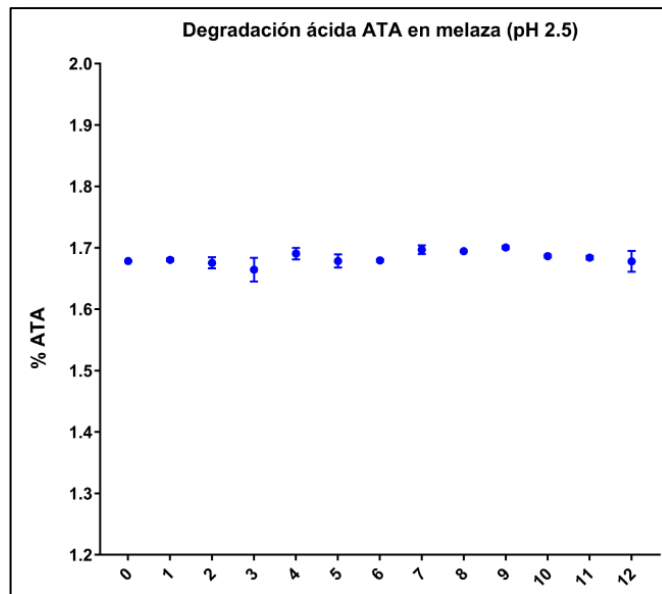
Se realizaron inyecciones cada hora por un periodo de tiempo de 12 horas y se evaluó la concentración del analito en las dos soluciones, esto con el fin de evaluar si hay una pérdida significativa de concentración debido a degradación del Ácido *trans*-Aconítico o a la formación de impurezas, principalmente en la melaza, puesto que tiene un alto contenido de diversos componentes.

Los resultados se observan en las gráfica 6A y 6B, donde se evidencia que no hay degradación ácida en ninguna de las dos soluciones, por lo que se concluye que se puede realizar la extracción del Ácido *trans*-Aconítico en melaza en presencia de medios ácidos hasta un pH de 2.5.

A)



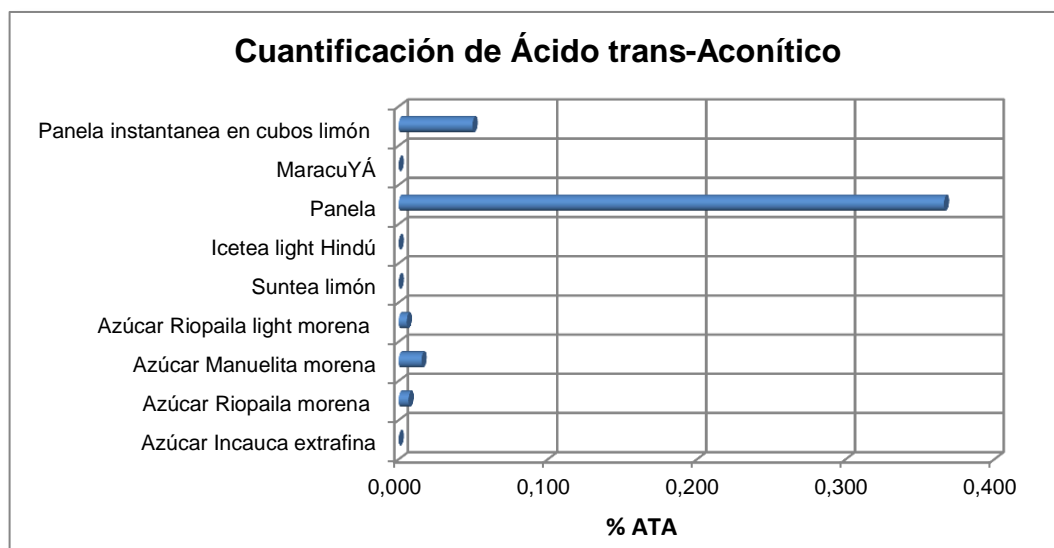
B)



Gráfica 6: Degradación ácida pH 2.5. A) Solución estándar de Ácido *trans*-Aconítico B) Solución muestra de melaza

Finalmente, se concluye que el método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar se encuentra validado para su utilización, puesto que es específico, lineal, exacto, preciso y robusto. Además, no se requirieron modificaciones al método analítico, por lo que se elaboró el POE para su utilización rutinaria.

Con el propósito de retar el método analítico, se cuantificó Ácido *trans*-Aconítico en diferentes matrices que se encuentran en el mercado, que posiblemente podrían contener o no dicho ácido. Los resultados se observan en la gráfica 7.



Gráfica 7: Resultados de cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en diversas matrices.

El azúcar *Incauca extrafina* no contiene Ácido *trans*-Aconítico, por lo que este desaparece en el proceso de blanqueamiento y refinamiento del azúcar. El *Suntea limón*, *Icetea light hindú*, *maracuYÁ* y *azúcar Riopaila light morena* no contienen ácido por lo que utilizan otros edulcorantes o utilizan azúcar blanca. El *azúcar Riopaila morena*, *azúcar Manuelita morena*, *panela* y *Panela instantánea en cubos limón* contienen Ácido *trans*-Aconítico por lo que sus componentes se basan en la *azúcar morena*. La mayor cantidad de Ácido *trans*-Aconítico se encontró en la *panela* con 0,37%, que comparada con la *melaza*, la cual contiene 1,7% aproximadamente, es muy bajo.

2.6 Conclusiones

Basado en los estudios realizados para la evaluación de los diferentes parámetros de validación establecidos en el protocolo, se encontró que el método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de *Ácido trans-Aconítico* presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar, cumplió con los criterios de aceptación definidos en la literatura para cada parámetro. Por lo tanto, se puede decir que el método es específico, lineal, exacto, preciso y robusto. Además, se encontró un límite de detección y cuantificación adecuado que permitirá cuantificar cantidades muy bajas del analito. Como consecuencia, el método de cuantificación de *Ácido trans-Aconítico* es idóneo, confiable y cumple la función con la que fue concebido inicialmente.

En virtud de lo mencionado, se puede decir que se encontró un método cromatográfico validado más económico, accesible y robusto de cuantificación del *Ácido trans-Aconítico* en la melaza proveniente de la caña de azúcar que está disponible en la Universidad Icesi y que puede ser utilizado de forma rutinaria.

Además, el método analítico de cuantificación benefició el desarrollo de otros proyectos de investigación, como en el caso de la extracción del *Ácido trans-Aconítico* de la melaza, que tiene como objetivo la obtención de biopolímeros importantes para aplicaciones industriales que provengan de fuentes naturales y evitar procesos químicos de síntesis que son más contaminantes para el medio ambiente.

También se elaboró un POE del método analítico que permitirá que cualquier persona que cuente con el equipo y los materiales necesarios para la ejecución del método, pueda cuantificar el *Ácido trans-Aconítico* en la melaza, ya sea en la industria o en investigación.

2.7 Recomendaciones

Se recomienda que para la utilización rutinaria del método analítico se tengan en cuenta los lineamientos observados en el POE; método validado bajo las condiciones descritas en este y que, como se indicó, no deben modificarse bajo ninguna circunstancia.

Además, se debe tener en cuenta que la preparación de la fase móvil es un parámetro importante para mantener un tiempo de retención reproducible, por lo tanto, se debe seguir la recomendación consignada en el POE, en la que se especifica que el equipo HPLC-PDA debe realizar la mezcla para evitar errores sistemáticos que pueden presentarse durante la preparación de la fase móvil por parte del analista.

Por otro lado, es importante proteger la columna cromatográfica con una pre-columna cada vez que se aplique el método analítico, puesto que la melaza tiene un alto contenido de componentes diversos que pueden dañar la columna con el elevado número de inyecciones. Para evitar esto, se debe lavar con abundante agua y Acetonitrilo después de cada análisis, para conservar la eficiencia de la columna.


3. REFERENCIAS

- Asocaña. (2015). Aspectos Generales del Sector Azucarero El dulce sabor del azúcar de Colombia es desarrollo sostenible. *Informe Anual 2014-2015*.
- Asocaña. (2016). Balance azucarero colombiano Asocaña 2000-2016. Retrieved from <http://www.asocana.com.co>
- Bliesner, D. M. (2006). *Validating Chromatographic Methods. A practical guide* (1st ed.). New Jersey: John Wiley & sons Inc.
- Castillo, E. F., & Forero, S. S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Cristóbal, M. S. S., Peña, E. M. D., Agualeles, B. A., Córdoba, C. V., & González, M. E. L. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil. *Reduca (Biología)*, 4(3), 1–32.
- Cuadrado, J. P., & Forn, M. P. (2001). *Validación de métodos analíticos AEFI*. Barcelona: Asociación española de farmacéuticos de la industria.
- FDA. (2015). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program*.
- Flores, F. O., Galicia, L. T., Lassmann, A. A., Osorio, R. T., & Sentíes, O. B. (2008). Disminución de pérdidas de sacarosa en la elaboración de meladura en un ingenio azucarero. *Revista de La Ingeniería Industrial*, (1), 1–24.
- Gil, N. (2007). *Aconitic Acid From Sugarcane: Production and Industrial Application. Dissertation*. Louisiana state university and agricultural and mechanical college. Retrieved from http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11132007-235550/unrestricted/Gil_Zapata_dis.pdf
- Gilfillan, W. N., & Doherty, W. O. S. (2016). Starch composites with aconitic acid. *Carbohydrate Polymers*, 141, 60–67.
- ICH. (2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*.
- Ingenio El Viejo. (2011). Etapas del proceso de producción. Retrieved from http://ingenioelviejo.com/ing_etapas.aspx

- Kanitkar, A., Aita, G., & Madsen, L. (2013). The recovery of polymerization grade aconitic acid from sugarcane molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(12), 2188–2192.
- Malmay, G. H., Monteil, E., & Molinier, J. R. (1995). Recovery of Aconitic Acid from Simulated Aqueous Effluents of the Sugar-Cane Industry through Liquid-Liquid Extraction. *Bioresourse Technology*, 52, 33–36.
- McPolin, O. (2009). *The Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis* (1st ed.). Northern Ireland: Mourne Training Services.
- Meyer, V. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography. Practical High-Performance Liquid Chromatography* (4th editio, Vol. 3). Switzerland: John Wiley & sons Ltd.
- Montoya, G., Londoño, J., Cortés, P., & Izquierdo, O. (2014). Quantitation of trans-Aconitic Acid in Different Stages of the Sugar-Manufacturing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 6–10.
- Pislor, E., Pontalier, P. Y., & Albet, J. (2009). Process for Recovering Carboxylic Acids From Sugar Cane Industry By-Products. *2nd International Congress on Green Process Engineering*, (1), 1–6.
- Swartz, M. (2010). Hplc Detectors: a Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130–1150. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2010.484356>
- Zossi, B. S., Cárdenas, G. J., Sorol, N., & Sastre, M. (2010). Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina): Parte 1: caña limpia y despuntada. *Revista Industrial Y Agrícola de Tucumán*, 87(1), 15–27.

4. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de validación del método analítico cromatográfico para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO <i>TRANS</i>-ACONÍTICO PRESENTE EN LA MELAZA PROVENIENTE DE LA CAÑA DE AZÚCAR	NÚMERO: LAF-001-02
		PÁGINAS: 55 de 78
		FECHA DE EMISIÓN: 07/JUL/2016

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
Nombre: Sandra Patricia Orozco Pabón	Nombre: Guillermo León Montoya	Nombre: Claudia Patricia Marín Espinosa
Firma:	Firma:	Firma:
Cargo: Estudiante de Química Farmacéutica	Cargo: Director de proyecto de grado	Cargo: Directora de proyecto de grado
Fecha: 29/JUL/2016	Fecha: 29/JUL/2016	Fecha: 29/JUL/2016

1 OBJETIVOS

1.1 Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico (ATA) presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

1.2 Describir las operaciones involucradas en el proceso de validación del método analítico de cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico (ATA) presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

2 ALCANCE

Este documento está dirigido a los profesores de Control Microbiológico y Fisicoquímico, Validación de Métodos Analíticos y profesores del Laboratorio de Productos Naturales.

3 ANTECEDENTES

La melaza está compuesta por diversas sustancias, entre las cuales se encuentra el Ácido trans-Aconítico que, además de su carácter orgánico tribásico insaturado, resulta muy útil en los procesos asociados al desarrollo de nuevos materiales poliméricos de gran importancia en la industria de empaques, alimentos y biomédica. Dependiendo del tipo de melaza, se puede encontrar entre 0.9% y 5.5% de Ácido trans-Aconítico (Kanitkar et al., 2013).

En la literatura se encuentran varios métodos para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico en diferentes matrices, sin embargo, se encuentran pocos métodos para la determinación del ácido en la melaza. Uno de ellos fue desarrollado y validado en la Universidad Icesi, donde se utilizó un cromatógrafo líquido UPLC con detector *light scattering* (Montoya et al., 2014).

4 RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

4.1 El estudiante encargado de la validación debe seguir paso a paso el procedimiento de acuerdo al parámetro de validación que esté aplicando.

4.2 El director del proyecto de grado encargado del laboratorio de productos naturales debe revisar que el protocolo de validación se esté realizando.

4.3 La directora del proyecto de grado encargada del laboratorio de control microbiológico y fisicoquímico y validaciones de métodos analíticos tiene la autoridad de verificar que este protocolo se cumpla.

5 DEFINICIONES

5.1 *Validación*: Evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad que un proceso específico producirá en forma consistente, un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

5.2 *Método Analítico*: Detalla los pasos necesarios para realizar un análisis de un método adecuado para el uso específico.

- 5.3 Calibración:** Comparar valores que indican un instrumento determinado con valores de referencia ya establecidos.
- 5.4 Equipo:** Todo material, dispositivo, aparato, patrón instrumento y material de referencia usado en la realización de las medidas necesarias para llevar un ensayo o calibración.
- 5.5 Instrumento:** Equipo destinado a la realización de medidas..
- 5.6 Intervalo:** Amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito.
- 5.7 Matriz blanco:** Sustancia que se asemeja a las muestras que se analizan con respecto a los componentes de la matriz.
- 5.8 Matriz enriquecida:** Muestra a la que se le ha adicionado una cantidad conocida de analito para su posterior estudio.
- 5.9 Selectividad o especificidad:** es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.
- 5.10 Exactitud:** Es la proximidad entre los resultados obtenidos con el procedimiento analítico establecido y el valor verdadero.
- 5.11 Precisión:** Expresa el grado de concordancia o dispersión entre una serie de medidas múltiples tomadas a partir de una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones prescritas.

5.12 *Linealidad*: Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados proporcionales entre la concentración del analito y su respuesta al aplicar el método.

5.13 *Criterio de Aceptación*: Límites específicos para las características de un producto, proceso o servicio definidos en los requisitos de un programa de calidad.

5.14 *Límite de detección*: Cantidad mínima de analito presente en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como un valor exacto, para un método analítico específico.

5.15 *Límite de cuantificación*: Cantidad mínima de analito presente en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas para un método analítico

5.16 *Robustez*: Medida de la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeñas variaciones deliberadas en diferentes parámetros de dicho método.

5.17 *HPLC*: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

5.18 *PDA*: Detector de arreglo de fotodiodos.

6 PARÁMETROS A EVALUAR DURANTE LA VALIDACIÓN

6.1 *Selectividad o especificidad*: Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

6.2 *Exactitud*: Proximidad entre los datos o resultados obtenidos experimentalmente y un valor verdadero o aceptado como valor de referencia.

- 6.3 *Precisión intermedia:*** Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (aparatos, reactivos, analistas y días de análisis).
- 6.4 *Linealidad:*** Capacidad del método analítico para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.
- 6.5 *Repetibilidad del sistema:*** se calcula a partir de mediciones repetidas realizadas a una muestra homogénea que ha pasado por todo el proceso de método, es decir, realizar mediciones a la misma muestra como tal y no réplicas de ella. El número de mediciones en este ensayo está condicionado por la cantidad de muestra que destruye el equipo en su determinación. Se recomienda de 5 a 10 veces.
- 6.6 *Repetibilidad del método:*** a diferencia del ensayo anterior, en este caso se parte de alícuotas de una misma muestra homogénea y se les realiza todo el procedimiento indicado de forma individual, se analizan de forma independiente como si fueran réplicas de una misma muestra y con un mismo analista.
- 6.7 *Límite de detección:*** Cantidad mínima de analito presente en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como un valor exacto, para un método analítico específico.
- 6.8 *Límite de cuantificación:*** Cantidad mínima de analito presente en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas para un método analítico.
- 6.9 *Robustez:*** Medida de la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeñas variaciones deliberadas en diferentes parámetros de dicho método. Este parámetro indica su confiabilidad durante la utilización rutinaria del método. Para métodos analíticos cromatográficos, las variaciones se realizan en las condiciones cromatográficas del sistema.

7 MATERIALES Y EQUIPOS

7.1 ELEMENTOS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PERSONAL

Utilizar los siguientes elementos de protección personal: Bata de laboratorio anti-fluido y por debajo de las rodillas, pantalón largo, guantes de nitrilo, gafas de seguridad y calzado adecuado (calzado cerrado con suela antideslizante).

7.2 MATERIALES

- 7.2.1** Balones volumétricos de 10, 20 y 50 mL.
- 7.2.2** Micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L.
- 7.2.3** Pipeta volumétrica de 1, 2, 3, 4, y 5 mL
- 7.2.4** Vasos de vidrio de 100 y 250 mL
- 7.2.5** Frascos Schott de 500 y 1000 mL.
- 7.2.6** Espátula de acero
- 7.2.7** Frasco lavador
- 7.2.8** Pesa sales
- 7.2.9** Gotero
- 7.2.10** Jeringas plásticas de 15 mL
- 7.2.11** Viales de inyección de vidrio para HPLC
- 7.2.12** Filtros plásticos desechables de 0.22 μ m.
- 7.2.13** Columna cromatográfica Kinetex C18 2.6 μ m 100mm x 4.60 mm. con precolumna.

7.3 REACTIVOS

- 7.3.1** Agua tipo I
- 7.3.2** Acetonitrilo tipo HPLC
- 7.3.3** Ácido Clorhídrico concentrado
- 7.3.4** Estándar de Ácido *trans*-Aconítico Sigma-Aldrich
- 7.3.5** Estándar de Ácido *cis*-Aconítico Sigma-Aldrich
- 7.3.6** Melaza (Ingenio Carmelita).
- 7.3.7** Azúcar blanca (Ingenio Carmelita)

7.4 EQUIPOS

7.4.1 Balanza analítica

7.4.2 Cromatógrafo líquido con detector PDA.

7.4.3 Campana de extracción

7.4.4 Medidor de pH

7.4.5 Plancha de agitación

8 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Por medio del presente procedimiento se evaluarán los siguientes parámetros: especificidad, exactitud, precisión del sistema y del método, linealidad del método y del sistema, rango, robustez, límite de cuantificación y detección, para llevar a cabo la validación del método analítico para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza. (FDA, 2015) Además se llevará a cabo degradación ácida y estabilidad de solución.

8.1 PROCEDIMIENTO MÉTODO ANALÍTICO

Condiciones cromatográficas:

- Equipo HPLC con detector PDA. Chrom Elite Merck)
- Columna: Kinetex C18 2.6 μm 100mm x 4.60 mm. (Utilizar pre-columna)
- Flujo: 0.8 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua pH 2.5 (Con HCl) : Acetonitrilo (95:5)
- Longitud de onda: 240 nm.
- Volumen de inyección: 10 μL
- Tiempo de retención aproximado: 2.5 minutos

Preparación curva de calibración de estándares de Ácido *trans*-Aconítico:

En un balón volumétrico de 20 mL, pesar 10 mg de estándar de Ácido *trans*-Aconítico, adicionar 10 mL de Agua tipo I y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I y agitar. (**Solución stock**).

En 5 balones volumétricos de 10 mL, adicionar alícuotas de 0.4, 1.2, 2, 3 y 4 mL de la solución stock a cada balón, completar a volumen con Agua tipo I cada uno de estos y agitar manualmente por 5 minutos. Rotular cada solución estándar como 20, 60, 100, 150 y 200 ppm respectivamente. Filtrar por membrana de 0.22 μm y llevar a un vial de inyección cada una de las soluciones estándar. **(Soluciones estándar de curva de calibración)**

Preparación de la muestra: En un balón volumétrico de 10 mL, pesar 50 mg de melaza, adicionar 5 mL de Agua tipo I y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I y agitar. La concentración de la muestra preparada será de 5 mg/mL. Filtrar por membrana de 0.22 μm y llevar a un vial de inyección **(Solución muestra de melaza)**.

Inyectar en el equipo HPLC-PDA las cinco soluciones estándar y la muestra a las condiciones cromatográficas especificadas.

8.2 ESPECIFICIDAD O SELECTIVIDAD (ICH, 2005)

8.2.1 Preparación de solución de matriz blanco (Azúcar blanca): En un balón volumétrico de 10 mL, pesar 50 mg de azúcar blanca, adicionar 5 mL de Agua tipo I y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I y agitar. Filtrar por membrana de 0.22 μm y llevar a un vial de inyección.

8.2.2 Preparación de solución estándar de Ácido trans-Aconítico 100 ppm: En un balón volumétrico de 10 mL, adicionar una alícuota de 2 mL de la solución stock preparada en el punto 8.1, completar a volumen con Agua tipo I y agitar manualmente por 5 minutos. Filtrar por membrana de 0.22 μm y llevar a un vial de inyección.

8.2.3 Preparación de solución estándar de Ácido cis-Aconítico 100 ppm: En un balón volumétrico de 50 mL, pesar 5 mg de estándar de Ácido cis-Aconítico, adicionar 20 mL de Agua tipo I y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I y agitar. . Filtrar por membrana de 0.22 μm y llevar a un vial de inyección.

A fin de evaluar posibles interferencias, se inyectará en el equipo HPLC-PDA a las condiciones cromatográficas especificadas en el punto 8.1 las siguientes preparaciones: diluyente (Agua tipo I), solución de matriz blanco (Azúcar blanca), solución estándar de Ácido *trans*-Aconítico 100 ppm, solución estándar de Ácido *cis*-Aconítico 100 ppm y solución muestra de melaza.

Se evaluarán los tiempos de retención de cada uno de los picos obtenidos, con el fin de evaluar posibles interferencias a la longitud de onda definida en el método cromatográfico y se determinará el parámetro de pureza de pico del Ácido *trans*-Aconítico, por medio del detector PDA utilizando el software del equipo, cuyo valor debe ser cercano a 1.0000 para confirmar que la señal es pura.

8.3 EXACTITUD(Cuadrado & Forn, 2001)

Se prepara una curva de calibración de estándares como en el punto 8.1 de Ácido *trans*-Aconítico entre 20 y 200 ppm y se inyecta cada uno ellos por triplicado en el equipo HPLC-PDA.

Se preparan matrices enriquecidas, es decir, soluciones de azúcar blanca a las que se adiciona estándar de Ácido *trans*-Aconítico al 80%, 100% y 120% que corresponden a concentraciones de 80, 100 y 120 ppm respectivamente por triplicado. Las soluciones de cada matriz enriquecida se inyectan en el equipo HPLC-PDA y por medio de la curva de calibración de estándares, se calcula el porcentaje de recuperación para cada repetición en cada uno de los niveles y el coeficiente de variación (%RSD) por nivel de concentración evaluado. Además, se realizará la prueba de Cochran donde se evaluará si las varianzas de las concentraciones son equivalentes por medio de la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

(Ecuación 1)

$$G_{exp} = \frac{s^2_{max}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3 + s^2_4 + s^2_5}$$

(Ecuación 2)

8.4 PRECISIÓN

8.4.1 PRECISION DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

Se preparan dos estándares de Ácido *trans*-Aconítico en una concentración de 100 ppm como se indica en el punto 8.2.2. Se inyectan en el equipo HPLC-PDA, cinco veces consecutivas cada uno de estos y se determina el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas en las cinco repeticiones de cada estándar.

8.4.2 PRECISION DEL MÉTODO(ICH, 2005)

Se preparan, por separado, 6 muestras de melaza al 100%, correspondiente a 5 mg/mL y se inyectan en el equipo HPLC-PDA cada una (*Analista 1*). Estas muestras se cuantifican con una curva de calibración de estándares (20-100 ppm) como se especifica en el punto 8.1. Se calcula el coeficiente de variación de las 6 determinaciones de acuerdo a la ecuación 1.

8.4.3 PRECISION INTERMEDIA(ICH, 2005)

Se realiza un día diferente y por parte de otro analista (*Día 2, analista 2*), el mismo procedimiento que en 8.4.2. para la precisión del método. Se calcula el coeficiente de variación de las 12 determinaciones, es decir; de los datos del analista 1 y 2 en los días diferentes de análisis, de acuerdo a la ecuación 1.

8.5 LINEALIDAD Y RANGO

8.5.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO (Cuadrado & Forn, 2001)

Se evaluará la linealidad del método a través de 5 concentraciones: 20, 60, 100, 150 y 200 ppm. Para tal fin se elaboran 5 matrices enriquecidas (Soluciones de azúcar blanca a las que se le adiciona la cantidad definida de estándar de Ácido *trans*-Aconítico), una por cada nivel de concentración. Se preparan por triplicado las soluciones de cada matriz y se inyectan en el equipo HPLC-PDA. La linealidad se establece por medio de la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta de los datos obtenidos a las diferentes concentraciones. Por medio de esta se halla el coeficiente de correlación (r), el intercepto (b), pendiente de la línea de regresión (m) y la suma de cuadrados residuales para determinar el test de homogeneidad de varianzas.

8.5.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA (Cuadrado & Forn, 2001)

Se evaluará la linealidad del método a través de 5 concentraciones: 20, 60, 100, 150 y 200 ppm. Para tal fin se preparan 5 soluciones estándares de Ácido *trans*-Aconítico para cada nivel de concentración. Estos se realizan por triplicado y se inyectan en el equipo HPLC-PDA. (Utilizar la preparación descrita en el punto 8.1 para la curva de calibración de estándares).

La linealidad se establece de la misma forma que en el punto 8.5.1 y el rango se establece por medio de la prueba de linealidad, puesto que es el intervalo de concentraciones de la curva de calibración estándar.

8.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (Cuadrado & Forn, 2001)

Estos límites se determinarán por medio del método basado en la realización de una curva de calibración. Para ello, se prepararán soluciones de estándar de Ácido *trans*-Aconítico con 3 concentraciones conocidas por triplicado cercanas a los límites de detección y cuantificación esperados (2, 10 y 20 ppm) y se inyecta cada una en el equipo HPLC-PDA. Se determinará la ecuación de la recta de la concentración del Ácido *trans*-Aconítico vs Área y seguidamente, se extrapola a concentración cero en dicha ecuación, con el fin de obtener la señal-ruido del equipo (*ablanco*). Luego, se grafica la desviación estándar de las áreas halladas anteriormente con respecto a las concentraciones evaluadas, con el fin de definir la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido (S_{blanco}).

De esta forma, se calculará el límite de cuantificación del método que es igual a la concentración del Ácido *trans*-Aconítico que proporciona una señal 10 veces mayor al ruido y el límite de detección proporciona una señal 3 veces mayor al ruido, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Límite Detección} = \frac{a_{\text{blanco}} + 3S_{\text{blanco}}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Límite Cuantificación} = \frac{a_{\text{blanco}} + 10S_{\text{blanco}}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

8.7 ROBUSTEZ (ICH, 2005)

Para evaluar este parámetro se preparará un estándar de Ácido *trans*- Aconítico a 100 ppm como en el punto 8.2.2. y se inyecta por duplicado al equipo HPLC-PDA a las condiciones cromatográficas especificadas en el punto 8.1. Luego se realizan variaciones a dichas condiciones y se realizan inyecciones igualmente por duplicado a cada una de las modificaciones, con el objetivo de determinar los tiempos de retención del pico de Ácido *trans*- Aconítico y los platos teóricos de la columna cromatográfica.

Las variaciones a las condiciones cromatográficas del método analítico son:

- *Composición de la fase móvil ($\pm 2\%$):*
Condición 1: Acetonitrilo : Agua pH 2.5 (3: 97) y Condición 2: Acetonitrilo : Agua pH 2.5 (7: 93).
- *Temperatura de la columna cromatográfica ($\pm 2^\circ\text{C}$)*
Condición 1: 23°C y Condición 2: 27°C .
- *Tasa de flujo ($\pm 0.1 \text{ mL/min}$):*
Condición 1: 0.7 mL/min y Condición 2: 0.9 mL/min
- *pH de la fase móvil (± 5 unidades de pH):*
Condición 1: 2.0 y Condición 2: 3.0

Se determina el porcentaje de variación de los tiempos de retención dividiendo el valor obtenido con cada condición sobre el valor a las condiciones cromatográficas normales del método por 100. De la misma forma se calcula el porcentaje de variación de los platos teóricos de la columna cromatográfica.

8.8 DEGRADACIÓN ÁCIDA

Se preparará estándar de Ácido *trans*-Aconítico a una concentración de 100 ppm como se menciona en el punto 8.2.2 y solución muestra de melaza como en el punto 8.1 reemplazando el Agua tipo I por Agua a pH 2.5 con Ácido Clorhídrico. Estas dos soluciones se inyectarán en el equipo HPLC-PDA cada hora por un periodo de tiempo de 12 horas, con el fin de cuantificar la cantidad de Ácido *trans*-Aconítico en cada tiempo y observar si hay posible degradación del analito en medio ácido.

8.9 ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN

La estabilidad de la solución se realizará preparando estándar de Ácido *trans*-Aconítico a una concentración de 100 ppm como se menciona en el punto 8.2.2 y solución muestra de melaza como en el punto 8.1. Estas soluciones se inyectarán en el equipo HPLC-PDA cada hora por un periodo de 12 horas, para cuantificar la cantidad de Ácido *trans*-Aconítico en cada tiempo y así observar el tiempo máximo que las soluciones pueden permanecer preparadas sin alterar su concentración con respecto al tiempo de inicio.

9 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante los ensayos realizados, se tiene en cuenta los siguientes criterios de aceptación: (Bliesner, 2006) (Cuadrado & Forn, 2001)

PARÁMETRO EVALUADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	
ESPECIFICIDAD	Pureza de pico: Cercano a 1.0000	
	ACEPTA SÍ: Los resultados de los criterios de aceptación son selectivos, entonces el método ensayado es selectivo para la cuantificación exacta y precisa de producto mostrando capacidad de discriminación suficiente del producto con respecto a interferencias que pudiesen aparecer en la matriz o por consecuencia de degradación de este principio activo.	
	RECHAZA SÍ: los resultados no son selectivos entonces, el método no es selectivo y no garantiza la cuantificación exacta y precisa del analito mostrando incapacidad de discriminación del analito respecto a interferencias que pudiesen estar en la matriz o generarse durante el almacenamiento o la vida útil del producto	
PRECISIÓN	PRECISIÓN DEL SISTEMA	Se acepta como preciso el instrumento si el CV es menor a 2.0%. $CV_{\text{metodo}} = \sqrt{2CV_{\text{instrumento}}}$
	PRECISIÓN DEL METODO	El %RSD de las 6 determinaciones de la muestra 100% no es mayor a 2.0%.
	PRECISIÓN INTERMEDIA	El %RSD de las 12 determinaciones de la muestra 100% y para cada analista no es mayor a 2.0%.

EXACTITUD	El Promedio de porcentajes de recuperación a cada nivel no son menores a 95% y no mayores a 105%. Coeficiente de variación de las recuperaciones a cada nivel no es mayor a 2.0%. Las varianzas son equivalentes si $G_{exp} < G_{tablas}$.
LINEALIDAD	<p>Los resultados se evalúan mediante un análisis de regresión lineal, además de aplicar la prueba t de Student para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.</p> <p>PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS (Test de Cochran) H_0: % de valoración y área no se relacionan linealmente. H_1: % de valoración y área se relacionan linealmente. Si $G_{calculado} < G_{tabulado}$, se rechaza H_0 y existe relación lineal entre las variables.</p> <p>INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE $H_0: b=0$ $H_1: b$ diferente de cero. Si $t_{calculado} > t_{tabulado}$, se rechaza H_0 entonces la pendiente no toma valores de cero y el método responde a los cambios de concentración.</p> <p>TEST DE COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE RESPUESTA El coeficiente de variación de respuesta $< 2\%$.</p> <p>COEFICIENTE DE CORRELACIÓN $(r) > 0.999$</p>
LÍMITE DE DETECCIÓN	No aplica.
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	No aplica.
ROBUSTEZ	Número de platos teóricos $< 50.0\%$ Variación de Tiempo de retención : $90\% < TR < 110\%$

10 OBSERVACIONES

Registrar los datos primarios en el cuaderno de laboratorio

11 RECOMENDACIONES

Para la realización de la presente validación es necesario tener en cuenta:

- Utilizar Acetonitrilo grado HPLC y Agua tipo I. No utilizar otro tipo de solventes dado que se presentarán interferencias en el análisis.
- Verificar que las balanzas se encuentren calibradas y que el equipo HPLC-PDA se encuentra calificado para no influir en la precisión y exactitud de los datos obtenidos.
- El material volumétrico utilizado debe encontrarse debidamente limpio y seco.
- Tener en cuenta el grado de pureza, vencimiento de los reactivos y estándar.

12 REFERENCIAS

Bliesner, D. M. (2006). *Validating Chromatographic Methods. A practical guide* (1st ed.). New Jersey: John Wiley & sons Inc.

Cuadrado, J. P., & Forn, M. P. (2001). *Validación de métodos analíticos AEFI*. Barcelona: Asociación española de farmacéuticos de la industria.

FDA. (2015). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program*.

ICH. (2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*.

Kanitkar, A., Aita, G., & Madsen, L. (2013). The recovery of polymerization grade aconitic acid from sugarcane molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(12), 2188–2192.

Montoya, G., Londoño, J., Cortés, P., & Izquierdo, O. (2014). Quantitation of trans-Aconitic Acid in Different Stages of the Sugar-Manufacturing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 6–10.

13 RESULTADOS

13.1 Especificidad

Descripción	Tiempo retención (min)	Pureza de pico	Observaciones
Estándar ATA	2.56	1.000000	La resolución entre ATA y Ácido cis-Aconítico es de 5.1
Estándar Acido <i>cis</i> -Aconítico	1.95	1.000000	
Muestra melaza (ATA)	2.56	0.996422	No hay ningún tipo de interferencias que afecten el valor del área de ATA determinada por el método.
Blanco (Agua tipo 1)	N/D	N/A	No se detecta ATA que pueda producir interferencias en la medición del analito.
Matriz blanco (Azúcar)	N/D	N/A	No se detecta ATA que pueda producir interferencias en la medición del analito.

N/D: No detecta N/A: No aplica ATA: Ácido *trans*-Aconítico

13.2 Linealidad

Linealidad del sistema		Linealidad del método	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación	0.99997	Coefficiente de correlación	0.99996
Test de la pendiente	Cumple	Test de la pendiente	Cumple
Coefficiente de variación de respuesta	0.326%	Coefficiente de variación de respuesta	0.283%
Homogeneidad de varianzas	Cumple	Homogeneidad de varianzas	Cumple

CV: Coeficiente de variación

13.3 Precisión

Precisión del sistema		Precisión del método		Precisión intermedia	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
CV estándar 1	0.62%	Promedio 6 muestras analista 1	1.698 % ATA	Promedio 12 muestras analista 1 y 2	1.669 % ATA
CV estándar 2	0.15%	CV 6 muestras analista 1	0.75%	CV 12 muestras analista 1 y 2.	1.87 % ATA

CV: Coeficiente de variación ATA: Ácido *trans*-Aconítico

13.4 Exactitud

Concentración Std ATA	Promedio % recuperación ATA	% CV
80 ppm	100.4	0.03
100 ppm	99.2	0.18
120 ppm	100.9	0.13
%Promedio recuperación total	100.16%	
%CV total	0.76	
Homogeneidad de varianzas	Cumple	

13.5 Límite de detección y cuantificación

Parámetro	Valor
Límite de detección	0.00093%
Límite de cuantificación	0.0010%

13.6 Robustez

Los parámetros de temperatura y pH cumplen con los criterios de aceptación, por lo que no se consideran parámetros sensibles en el método analítico y se puede trabajar hasta estos valores, sin que se vea afectada la reproducibilidad del método.

Sin embargo, se observa que las variaciones en fase móvil y flujo de la misma por la columna, no cumplen el criterio de aceptación. Esto quiere decir que las variaciones en la preparación de la fase móvil son críticas en el método analítico, para obtener un tiempo de retención reproducible.


13.7 Estabilidad de la solución

La solución de estándar de Ácido *trans*-Aconítico y la solución muestra de melaza, son estables por 12 horas.

13.8 Degradación ácida

No se observa degradación ácida en ninguna de las soluciones estándar de Ácido *trans*-Aconítico y la solución muestra de melaza.

Anexo 2: Procedimiento operativo estándar (POE) de la utilización del método analítico cromatográfico para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA LA UTILIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO <i>TRANS</i>- ACONÍTICO PRESENTE EN LA MELAZA PROVENIENTE DE LA CAÑA DE AZÚCAR	NÚMERO: POE-016-02
		PÁGINAS: 73 de 78
		FECHA DE EMISIÓN: 03/OCT/2016

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
Nombre: Sandra Patricia Orozco Pabón	Nombre: Guillermo León Montoya	Nombre: Claudia Patricia Marín Espinosa
Firma:	Firma:	Firma:
Cargo: Estudiante de Química Farmacéutica	Cargo: Director de proyecto de grado	Cargo: Directora de proyecto de grado
Fecha: 17/OCT/2016	Fecha: 17/OCT/2016	Fecha: 17/OCT/2016

1. OBJETIVO

Describir los pasos para llevar a cabo el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico (ATA) presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido al personal del grupo de productos naturales de la Universidad Icesi.

3. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

3.1 El analista debe seguir paso a paso las instrucciones detalladas en el procedimiento, con el propósito de emitir un resultado final confiable.

3.2 El jefe del laboratorio de productos naturales debe verificar que el procedimiento se esté llevando a cabo.

4. DEFINICIONES

4.1 *Método Analítico:* Detalla los pasos necesarios para realizar un análisis de un método adecuado para el uso específico.

4.2 *Equipo:* Todo material, dispositivo, aparato, patrón instrumento y material de referencia usado en la realización de las medidas necesarias para llevar un ensayo o calibración.

4.3 *HPLC:* Cromatografía líquida de alta eficiencia.

4.4 *PDA:* Detector de arreglo de fotodiodos.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 ELEMENTOS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PERSONAL

Utilizar los siguientes elementos de protección personal: Bata de laboratorio anti-fluido y por debajo de las rodillas, pantalón largo, guantes de nitrilo, gafas de seguridad y calzado adecuado (calzado cerrado con suela antideslizante).

5.2 MATERIALES

- 5.2.1 Balones volumétricos de 10 y 20 mL.
- 5.2.2 Micropipetas de 200 y 1000 μ L.
- 5.2.3 Pipeta volumétrica de 2, 3 y 4 mL.
- 5.2.4 Vasos de vidrio de 100 y 250 mL
- 5.2.5 Frascos Schott de 500 y 1000 mL.
- 5.2.6 Espátula de acero
- 5.2.7 Frasco lavador
- 5.2.8 Pesa sales
- 5.2.9 Gotero
- 5.2.10 Jeringas plásticas de 15 mL
- 5.2.11 Viales de inyección de vidrio para HPLC
- 5.2.12 Filtros plásticos desechables de 0.22 μ m.
- 5.2.13 Columna cromatográfica Kinetex C18 2.6 μ m 100mm x 4.60 mm. con precolumna.

5.3 REACTIVOS

- 5.3.1 Agua tipo I
- 5.3.2 Acetonitrilo tipo HPLC
- 5.3.3 Ácido Clorhídrico concentrado
- 5.3.4 Estándar de Ácido *trans*-Aconítico Sigma-Aldrich
- 5.3.5 Melaza

5.4 EQUIPOS

- 5.4.1 Balanza analítica
- 5.4.2 Cromatógrafo líquido con detector PDA.
- 5.4.3 Campana de extracción
- 5.4.4 Medidor de pH
- 5.4.5 Plancha de agitación

6. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

6.1 CONSIDERACIONES GENERALES

- 6.1.1 Se deben utilizar los implementos de seguridad durante el análisis.

6.1.2 Los datos primarios tales como, pesos, volúmenes y cálculos aritméticos se deben registrar en el cuaderno de datos primarios.

6.2 PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICACIÓN DE ACIDO TRANS-ACONÍTICO EN MELAZA

6.2.1 Preparación de fase móvil: Solución A: Solución B (95:5)

Solución A: Tomar 500 mL de Agua tipo I en un beaker de plástico y ajustar a pH de 2.5 con Ácido clorhídrico concentrado lentamente. Filtrar con membrana de 0.45 µm por medio del equipo de filtración y desgasificar con ultrasonido.

Solución B: Tomar 500 mL de Acetonitrilo grado HPLC y Filtrar con membrana de 0.45 µm por medio del equipo de filtración y desgasificar con ultrasonido.

Llevar estas dos soluciones al equipo HPLC-PDA y colocar cada una de ellas en una línea del equipo. Programar el método instrumental para que realice la mezcla isocrática.

Nota: No realizar la mezcla manualmente, ya que el método es sensible a las variaciones en las proporciones de la fase móvil y se pueden generar cambios en el tiempo de retención.

6.2.2 Programar el método instrumental en el equipo HPLC-PDA con las siguientes condiciones y utilizar la columna descrita.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo HPLC con detector PDA. Chrom Elite Merck)
- Columna: Kinetex C18 2.6 µm 100mm x 4.60 mm. (Utilizar pre-columna)
- Flujo: 0.8 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua pH 2.5 (Con HCl) : Acetonitrilo (95:5)
- Longitud de onda: 240 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL
- Tiempo de retención aproximado: 2.5 minutos

Nota 1: Utilizar siempre pre-columna para prolongar la vida de la columna cromatográfica, debido a la complejidad de la muestra.

Nota 2: Equilibrar la columna con fase móvil 30 minutos.

6.2.3 Preparar los estándares de Ácido *trans*-Aconítico para realizar una curva de calibración de la siguiente forma:

*Preparación curva de calibración de estándares de Ácido *trans*-Aconítico:*

En un balón volumétrico de 20 mL, pesar 10 mg de estándar de Ácido *trans*-Aconítico, adicionar 10 mL de Agua tipo I, tapar y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I, tapar y agitar manualmente. **(Solución stock).**

En 5 balones volumétricos de 10 mL, adicionar alícuotas de 0.4, 1.2, 2, 3 y 4 mL de la solución stock a cada balón, completar a volumen con Agua tipo I cada uno de estos, tapar y agitar manualmente por 5 minutos. Rotular cada solución estándar como 20, 60, 100, 150 y 200 ppm respectivamente. Filtrar por membrana de 0.22 μm por medio de una jeringa plástica y llevar a un vial de inyección cada una de las soluciones estándar. **(Soluciones estándar de curva de calibración)**

6.2.4 Inyectar la curva de calibración de los estándares de Ácido *trans*-Aconítico en el equipo HPLC-PDA. Cada nivel de concentración de estándar se inyecta por triplicado a las condiciones cromatográficas descritas en el punto 6.2.2.

6.2.5 Verificar que el tiempo de retención se encuentra $\pm 10\%$ del tiempo de retención descrito en el punto 6.2.2.

6.2.6 Preparar la solución muestra de melaza de la siguiente forma:

Preparación de la muestra: En un balón volumétrico de 10 mL, pesar 50 mg de melaza, adicionar 5 mL de Agua tipo I, tapar y agitar manualmente por 5 minutos. Completar a volumen con Agua tipo I, tapar y agitar. La concentración de la muestra preparada será de 5 mg/mL. Filtrar por membrana de 0.22 μm por medio de una jeringa plástica y llevar a un vial de inyección **(Solución muestra de melaza).**

6.2.7 La solución muestra de melaza se debe preparar por triplicado y se inyecta una vez por muestra en el equipo HPLC-PDA a las condiciones cromatográficas descritas en el punto 6.2.2.

6.2.8 Una vez inyectadas las soluciones estándar de Ácido *trans*-Aconítico y las soluciones muestras de melaza, se procesan los datos en el equipo HPLC-PDA y se calcula el porcentaje de Ácido *trans*-Aconítico en melaza por medio de las siguientes ecuaciones:

$$ppm \text{ std curva calibración ATA} = \left(\frac{W_{std}(mg)}{20 \text{ mL}} \times \frac{Alic \text{ std (mL)}}{10 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{P(\%)}{100} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$ATA \text{ en melaza (ppm)} = \frac{\text{área mta} - \text{intercepto curva std}}{\text{pendiente curva std}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ ATA en melaza} = ppm \text{ ATA en mta} \left(\frac{mg}{L} \right) \times \frac{0,010 \text{ L}}{\text{Peso mta (mg)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

7. DISTRIBUCIÓN

El presente documento se distribuye según los responsables definidos.

8. REFERENCIAS

LAF-001-02. Protocolo de validación del método analítico cromatográfico para la cuantificación de Ácido *trans*-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar.

PR-015-01 Procedimiento de análisis de acetaminofén tabletas 500 mg. Formato guía. Claudia Patricia Marín.

9. HISTORIAL DE CAMBIOS

Versión 00. Procedimiento nuevo.