Métodos analíticos por polarimetría y HPLC: correlaciones en una mezcla de fructo-oligosacáridos con 55 % de pureza

Odalys Capote-Peña[1]*, Mauricio Ribas-García[1], Roxana Arango-Winograd[1], Juana M. Chanfón-Curbelo[1], Enrique R. Pérez-Cruz[2], Dunieski Martínez-Garcia[2] y Alina Sobrino-Legon[2]

1 Dirección de Ingeniería. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca # 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba. *odalys.capote@icidca.azcuba.cu

2 Departamento de Investigación-Desarrollo. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spíritus (CIGBSS), Circunvalante Norte S/N, Olivos 3. Sancti Spíritus, Cuba.

RESUMEN

Se sintetizaron 3 lotes de jarabes de fructo-oligosacáridos con un 55 % de pureza, se empleó la enzima 1-SST desarrollada por el CIGB SS y, como sustrato, el azúcar refino. Se midieron los contenidos de 1-kestosa, nistosa, sacarosa, glucosa y fructuosa por HPLC a cada muestra, en intervalos de media hora, entre el tiempo 0 y las 5 horas de reacción. Se determinó el contenido de glucosa, por método polarimétrico, a cada una de las muestras medidas por HPLC, en los mismos intervalos de tiempo y se demostró que la determinación de glucosa por método polarimétrico es válida para predecir el contenido de glucosa en una mezcla de FOS. El trabajo permitió obtener 2 correlaciones con alto nivel de precisión, que predicen adecuadamente la concentración de FOS y glucosa, durante la reacción, a partir de las mediciones de glucosa por polarimetría.
Palabras clave: glucosa, polarimetría, HPLC, fructo-oligosacáridos.

ABSTRACT

Three batches of Fructo-oligosaccharide syrups with 55 % of purity were obtained using the 1-SST enzyme developed by CIGB SS and refined sugar as substrate. The contents of 1-kestose, nistose, sucrose, glucose and fructose were measured by HPLC for each sample at half-hour intervals between time 0 and 5 hours of reaction. The Glucose content was determined by polarimetric method to each of the samples measured by HPLC in the same time intervals and it is demonstrated that the determination of glucose by polarimetric method is valid to predict the glucose content in a mixture of FOS. Two correlations were obtained with a high level of accuracy that adequately predict the concentration of FOS and glucose during the reaction from the glucose measurements by polarimetry.
Key words: glucose, polarimetry, HPLC, fructo-oligosaccharides.

INTRODUCCIÓN

La determinación del contenido de carbohidratos presente en un jarabe de fructo-oligosacáridos (FOS) se efectúa por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (1, 2); sin embargo, en las condiciones económicas actuales, las plantas piloto y de producción no cuentan, en su mayoría, con equipos de tan alta definición, por ello es preciso buscar otras técnicas más sencillas pero eficaces, que permitan cuantificar los componentes de la mezcla. El objetivo del presente trabajo es demostrar que la determinación de glucosa, por el método polarimétrico, es válida para predecir su contenido en una mezcla de FOS y determinar correlaciones entre los métodos polarimétrico y

HPLC, que permitan estimar, con precisión, los contenidos de glucosa y FOS totales en una mezcla con 55 % de pureza.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Método por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):** Los carbohidratos en las mezclas de reacción fueron analizados por HPLC, se utilizó una columna Aminex HPX-42C (0.78 × 30) cm (Bio-Rad, CA, EEUU.) equipada con un detector de índice refractivo. La temperatura de la columna se mantuvo en 85 ºC. Se usó agua como fase móvil, a un flujo de 0.5 ml/min. Las muestras (20 µL) se diluyeron apropiadamente antes de la inyección. Soluciones con cantidades definidas de fructosa, glucosa, sacarosa, 1-kestosa, nistosa y fructosilnistosa se usaron como estándares. Los paquetes del programa BioCrom versión 3.0, desarrollado en CIGB (La Habana, Cuba) fueron utilizados para la cuantificación de azúcares (3, 4).
- **Método polarimétrico:** Se elaboró una curva de calibración que determinó la lectura polarimétrica a 20 ºC, de soluciones con diferentes relaciones de glucosa y fructosa, desde un componente puro hasta el otro y se ajustó la concentración de sólidos disueltos a 5 ºBx a 20 ºC.
- **Reactivos:** Glucosa, fructosa e hidróxido de amonio.
- **Aparatos, utensilios y medios de medición:** Sacarímetro o polarímetro azucarero graduado en la escala internacional, ºZ, tubos de polarizar de 200 mm y placas de cuarzo verificadas.

Para garantizar reproducibilidad en los resultados, se efectuaron 3 reacciones de síntesis de FOS, bajo los mismos parámetros de operación y se midieron por HPLC cada media hora, los contenidos de: glucosa (G), sacarosa (S), fructosa (F), 1-kestosa y nistosa. Luego se tomaron las mismas muestras anteriores y se les determinó el contenido de glucosa con el método polarimétrico (5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 3 reacciones de síntesis de fructo-oligosacáridos se trabajaron bajo las condiciones:

- Concentración de sacarosa en el medio: 600 g/L
- Concentración de enzima 1-SST en el medio: 5 U/g de sacarosa
- Temperatura: 45 ºC
- pH: 5.5
- Solución Tampón: Acetato de Sodio 0.1 M

Se tomaron muestras cada media hora, se comenzó por la hora 0 y se concluyó a la hora 5 de la reacción. Se leyeron por HPLC los contenidos de cada compuesto en la mezcla y se calculó el contenido de fructo-oligosacáridos total (FOS), como la suma de 1-kestosa y nistosa. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 1.

Según los resultados de las mediciones por HPLC, se puede verificar que la máxima producción de FOS ocurrió a las 4 horas en las tres reacciones por igual. El comportamiento promedio de las reacciones se observa en la figura 1. Los contenidos de 1-kestosa y nistosa van creciendo en el tiempo y el contenido de sacarosa va disminuyendo, como resultado de la hidrólisis de esta.

A las mismas muestras se les determinó el contenido de glucosa, por el método polarimétrico y se leyeron los valores de ºZ. Se realizaron 2 mediciones de cada punto para una mayor repetitividad. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2 donde se muestran también los obtenidos por el método HPLC.

Tabla 1. Composición del jarabe FOS para los tres lotes

Tiempo (h)	Concentración (g/L)											
	Lote1				Lote 2				Lote 3			
	G	F	S	FOS	G	F	S	FOS	G	F	S	FOS
0	0.0	0.0	600.0	0.0	0.0	0.0	600.0	0.0	0.0	0.0	600.0	0.0
0.5	40.9	0.0	408.1	151.1	22.8	0.0	424.9	152.2	5.4	0.0	489.9	104.7
1	51.6	5.1	331.3	212.1	54.9	5.3	339.7	200.1	43.5	5.4	358	193.2
1.5	70.0	5.3	256.6	268.1	-			-	68.2	5.4	279.8	246.6
2	104.7	4.8	187.5	303	81.5	5.0	267.6	245.9	85.6	5.1	217.5	291.9
2.5	103.5	5.0	163.7	327.7	83.8	5.1	212.8	298.3	96.9	11.6	175.5	316.1
3	116.3	9.0	138.2	336.5	129.8	14.0	124.9	331.2	108.4	12.7	150.2	328.7
3.5	124.9	12.1	120.6	342.4	124.9	12.1	120.6	342.4	112.1	10.8	129.5	347.7
4	125.3	11.4	110.9	**352.4**	129.5	13.7	106.4	**350.5**	120.0	12.6	118.9	**348.4**

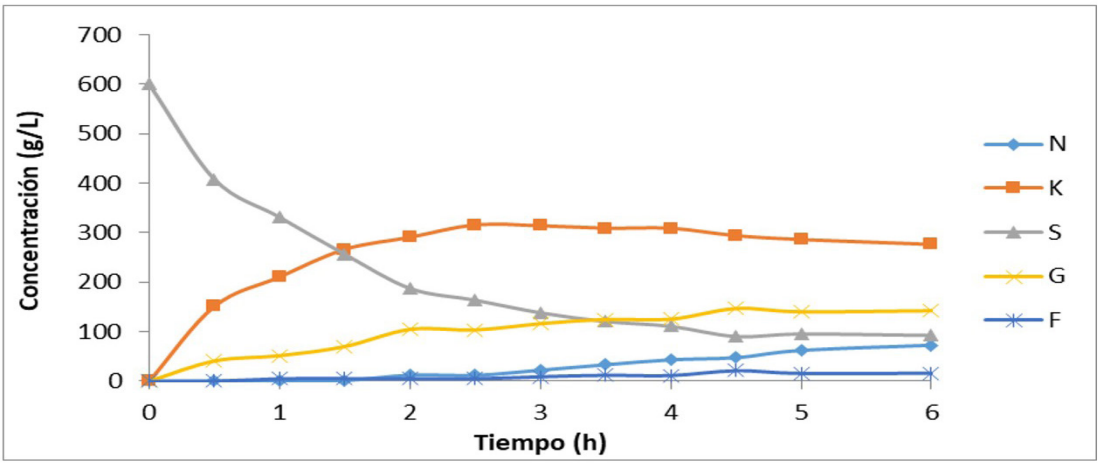

Figura 1. Comportamiento promedio de las reacciones.

Tabla 2. Resultados de las mediciones del contenido de glucosa por ambos métodos

Tiempo (h)	Contenido de glucosa por HPLC (%)				Contenido de glucosa por polarimetría (%)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
0	0.00	0.00	0.00	**0.00**	0.00	4.01	-0.16	**1.28**
0.5	6.82	3.80	0.90	**3.84**	6.65	9.12	11.53	**9.10**
1	8.60	9.15	7.30	**8.35**	7.65	10.42	11.18	**9.75**
1.5	11.67	-	11.44	**11.55**	12.35	-	12.25	**12.30**
2	17.45	13.58	14.34	**15.12**	16.48	14.95	13.34	**14.92**
2.5	17.25	13.97	16.40	**15.87**	18.21	15.31	17.00	**16.84**
3	19.38	21.64	18.36	**19.79**	23.30	21.16	18.95	**21.14**
3.5	20.82	20.82	18.91	**20.18**	23.97	21.78	15.72	**20.49**
4	**20.88**	**21.58**	**20.29**	**20.92**	**22.16**	**20.23**	**19.97**	**20.79**
4.5	24.47	-	-	**24.47**	23.09	32.44	-	**27.76**
5	23.39	-	-	**23.39**	19.23	21.82	-	**20.52**

En la tabla anterior puede observarse que a las 4 horas (punto en que el porciento de FOS fue máximo, según tabla 1), los valores de glucosa se movieron entre 20.29 y 22.16 % por ambos métodos, para un valor promedio de 20.86 %.

Modelos de predicción

Para determinar la correlación de la glucosa, por el método polarimétrico y por HPLC, se empleó el software Statgraphics Centurión versión 16.0 (6) y se emplearon los valores promedio de las tres variables de interés, porcentaje de glucosa por polarimetría, porcentaje de glucosa por HPLC y FOS totales en g/L determinado por HPLC. La tabla 3 muestra los valores utilizados para el análisis y la correlación entre las tres variables, se muestra en la figura 2

Tabla 3. Valor promedio de contenido de glucosa, por ambos métodos, y contenido de FOS por HPLC

Hora	G (%) HPLC	G (%) polar	FOS (g/L)
0.0	0.00	0.00	0.00
0.5	4.84	9.10	151.65
1.0	8.35	9.75	201.80
1.5	11.56	12.43	257.35
2.0	15.12	14.92	280.27
2.5	15.87	16.84	314.03
3.0	19.79	20.49	344.17
3.5	20.18	20.52	348.60
4.0	20.92	20.79	350.43
4.5	24.47	21.14	332.13
5.0	23.39	23.09	341.70

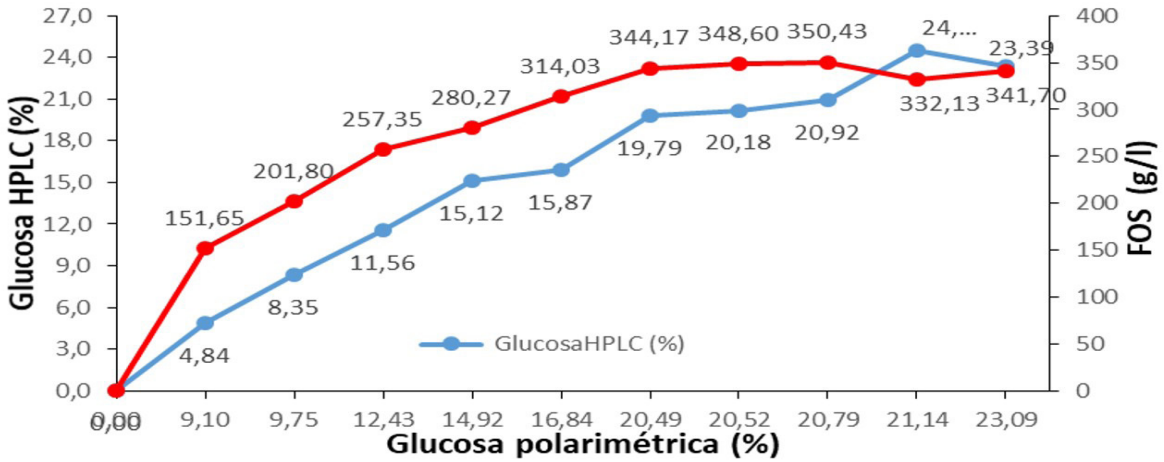

Figura 2. Relación entre el porcentaje de glucosa por HPLC y el contenido de FOS (g/L) por HPLC, con el porcentaje de glucosa por el método analítico.

Modelo para la predicción del porcentaje de glucosa determinado por HPLC

La ecuación 1 representa el modelo obtenido para la predicción de la glucosa determinada por HPLC, a partir de la obtenida por polarimetría. Este es un modelo que explica alrededor del 98.4 % de la variabilidad de la glucosa por HPLC y tiene un error estándar de las estimaciones de solo 0.81. Se considera que este nivel de precisión de las estimaciones del modelo es adecuado para el problema que se estudia. La figura 3 muestra los valores predichos por el modelo (ecuación 1), en relación con los valores experimentales. La prueba de Durbin-Watson no fue significativa (p-value > 0.05), por lo que se concluye que no existe autocorrelación entre los residuos.

$$G_{HPLC=}\left(-111,97328 + 15,02749 \cdot G_{pol}\right)^{0,56748} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:
Porcentaje de glucosa por HPLC y $G_{pol:}$ Porcentaje de glucosa por polarimetría.
R-cuadrada = 98.3923 %
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98.1244 %
Error estándar del estimado = 0.81073
Error absoluto medio = 0.626393
Estadístico Durbin-Watson = 1.69791 (P=0.1592)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.0234591

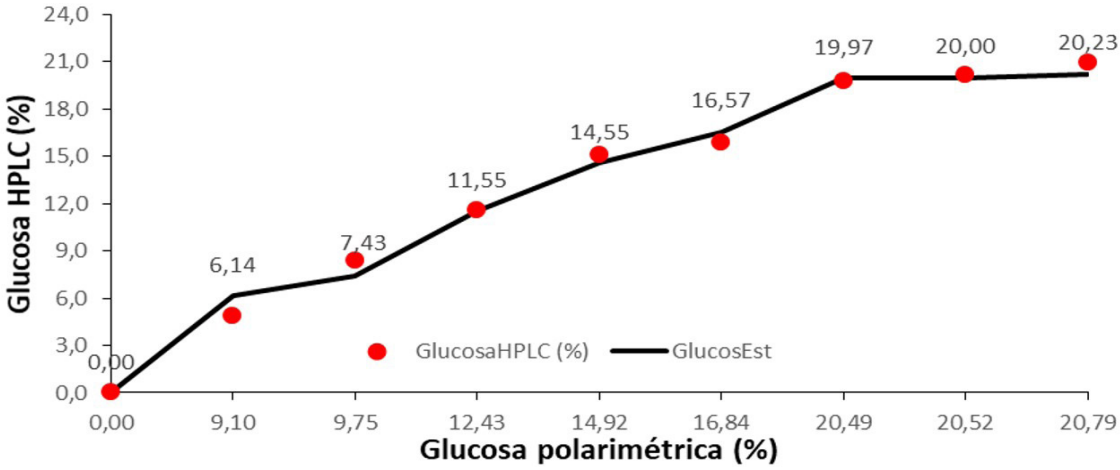

Figura 3. Modelo para la predicción de glucosa por HPLC, a partir de la glucosa por polarimetría.

Modelo para la predicción de la concentración de FOS

El modelo para predecir la concentración de FOS (ecuación 2) explica el 99.95 % de la variabilidad de la concentración de FOS con un error estándar de las estimaciones de 6.83 unidades de porciento por lo que el nivel de precisión de las predicciones del modelo se considera adecuado. La prueba de Durbin-Watson no fue significativa, por lo que los residuos del modelo son independientes entre sí.

$$FOS_{HPLC} = 21,1271 \cdot G_{pol} - 0,0005137 \cdot (G_{pol})^4 \qquad \text{Ec. 2}$$

Donde:
Concentración de FOS (g/l) y G_{pol}: Porcentaje de glucosa por polarimetría.

Parámetro	*Estimación*	*Error Estándar*	*Estad. T*	*Valor-P*
Glucosa MA (%)	21.1271	0.344146	61.3899	0.0000
Glucosa MA (%)^4	-0.000513662	0.0000395642	-12.983	0.0000

Análisis de Varianza

Fuente	*Suma Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	873590.	2	436795	9351.47	0.0000
Residuo	373.67	8	46.7087		
Total	873964.	10			

R-cuadrada = 99.9572 %
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9519 %
Error estándar del estimado. = 6.83438
Error absoluto medio = 4.45349
Estadístico Durbin-Watson = 2.47423
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.237134

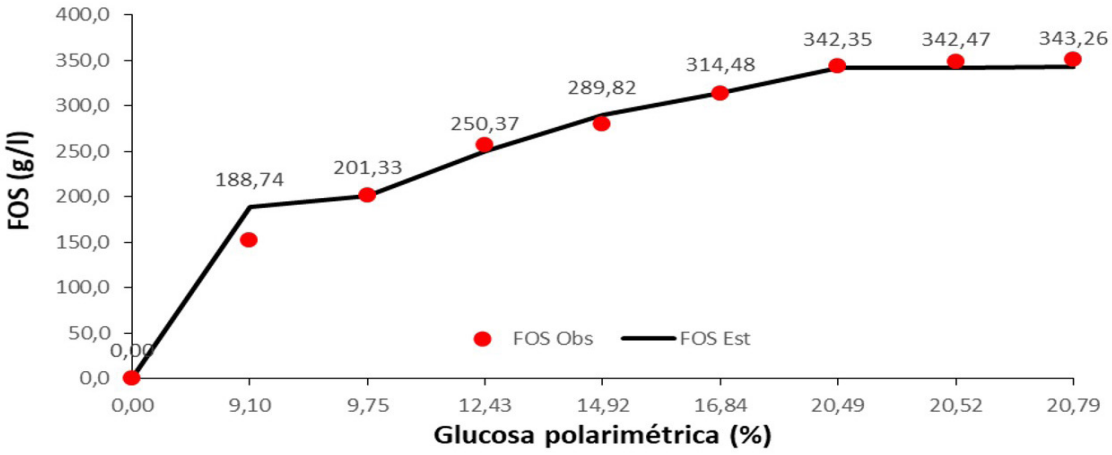

Figura 4. Modelo para la predicción del contenido de FOS (g/L) por HPLC, a partir de la glucosa por polarimetría.

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió demostrar que la determinación de glucosa por el método polarimétrico es válida para predecir su contenido en la mezcla de FOS y que los modelos obtenidos predicen adecuadamente la concentración de FOS y de glucosa, durante la reacción, a partir de las mediciones de glucosa por polarimetría.

Se obtuvo una correlación que relaciona la glucosa por método polarimétrico y por HPLC con un coeficiente de determinación de 98.4 % de la variabilidad y un error estándar de las estimaciones de solo 0.81. Asimismo, se obtuvo una correlación que relaciona la glucosa por el método polarimétrico y el contenido de FOS por HPLC, que explica el 99.95 % de la variabilidad de la concentración de FOS, con un error estándar de las estimaciones de 6.83 unidades de porciento, por lo que el nivel de precisión de las predicciones del modelo se considera adecuado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manual de técnicas analíticas para azucares blancos, 2006.
2. Manual de Usuario HPLC Bio-Rad, CA, EEUU.
3. Statgraphics Centurion, versión 16.0.
4. Diez, A Oscar., Díaz, F Hector; Determinación de Sacarosa Fructosa y Glucosa por Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC). Revista Industrial y agrícola de Tucumán. Vol. 69. No. 2 (1992). P 87-92.
5. INTERNATIONAL COMMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALISIS. The Determination of Sucrose, Glucosa and Fructosa by HPLC in Cane Molasses. Germany: ICUMSA 2005 (GS7/4/8-23/2002). ISBN 3870405517.

6. INTERNATIONAL COMMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALISIS. The Determination of total reducing sugars in Refined Sirups and Cane Molasses after Hidrólisis by a Double Polarisation Method. Germany: ICUMSA 2005 (GS4/7-1(1994)). ISBN 3870405517.
7. HERRERA ZAMBRANO; Ana C. Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio Pichichí S.A. 2011.