



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

Validation of the analytical methodology to determine the quantification of tannins in the avocado (*Persea americana* Miller var. Hass) pit for liquid chromatography of high

Víctor Augusto Castro Zavaleta <sup>a,\*</sup>; Noé Idelfonso Costilla Sánchez <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional del Santa. Chimbote – Perú.

<sup>b</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.

\* Autor para correspondencia: [torvik44@hotmail.com](mailto:torvik44@hotmail.com) (V. Castro).

Recibido 3 Febrero 2015; Aceptado 9 abril 2015

### RESUMEN

En el presente trabajo de investigación intitulado "Validación de una metodología analítica para determinar Taninos (Catequina) en pepa de palta (*Persea americana* Miller var. Hass) por cromatografía líquida de alta resolución" (HPLC), tiene por objetivo validar una metodología por HPLC para determinar la concentración de estos analitos, haciendo uso de un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético glacial al 0.1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min, se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 35 °C. Encontrándose que los parámetros evaluados: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión del método y exactitud, están dentro de los valores aceptados para una validación.

**Palabras clave:** Validación, Taninos (Catequina), HPLC.

### ABSTRACT

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

**Keywords:** Validation, Tannins (Catechin), HPLC.

### 1. Introducción

En las últimas décadas los fitofármacos han ido ganando terreno dentro del arsenal terapéutico mundial, fundamen-

talmente por su escasa toxicidad, bajos costos y por utilizar tecnologías de bajos niveles de inversión e insumos. Lo cual a su vez ha incidido podero-

samente en la expansión, desarrollo y consolidación de la producción de dichos medicamentos. Se dice que el 80 % de la población mundial utiliza plantas para el tratamiento de las enfermedades y en los países industrializados el 35 % de los medicamentos prescritos contienen principios activos de origen natural. Todo lo anterior da una medida de la importancia de los fitofármacos para los países del tercer mundo.

En Cuba se le ha dado una importancia estratégica a la palta y se ha ido desarrollando todo un sistema que abarca desde la agrotecnia de la especie vegetal (palta), hasta la confección del producto terminado y su registro. La parte activa de dicho producto es el extracto acuoso de la pepa (*Persea Americana* Millar Var. Hass) (García-Fajardo, 1999).

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

## 2. Materiales y métodos

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

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

Reactivos: ácido acético glacial, agua destilada, agua ultra pura, catequina y metanol grado HPLC (Griffith y Collison, 2001).

Equipos: balanza Analítica Sartorius 2942, Sensibilidad 0,0001g, cromatógrafo Agilent 1100 series, filtro de vacío SANILAB, micropipeta 100-

1000 uL, micropipeta 20-200 uL y sistema de purificación para obtener agua ultra pura: Modelo: EASY PURE, marca: Barnsted.

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

Se preparó una solución madre de Catequina de 1 mg/mL, de la cual se tomó 10, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu$ L y se les adicionó a cada una de ellas en fioles de 10 mL, llevándose a su respectivo aforo con agua ultrapura. De la cual se obtuvieron soluciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu$ g/mL respectivamente. Se pesó 0,5 g de polvo de tegumento de la pepa de palta y se le colocó en un tubo de ensayo, se le agregó 4 mL de agua ultra pura y se llevó al ultrasonido por 15 minutos, luego se centrifugó a 3500 rpm por un lapso de 10 minutos, se tomó 2 mL del sobrenadante y se filtró haciendo uso de filtros jeringa de celulosa regenerada de 25 mm de diámetro y 0,2  $\mu$ m de poro; colocándose en viales ámbar de 1,5 mL.

Para determinar la linealidad del método, se evaluaron 6 soluciones estándares comprendidas entre 1 y 25  $\mu$ g/mL de Catequina empleándose un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético glacial al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B (Hutabarat *et al.*, 1998); leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10  $\mu$ L, a una temperatura de 35 °C.

Se prepararon soluciones estándares de Catequina menores a 1  $\mu$ g/mL, hasta encontrar la concentración, a la cual en el cromatograma aparezca un pico en el

tiempo de retención característico del analito (Cala *et al.*, 2011), pero que no sea cuantificable por el equipo, usando:  $L.C. = (10/3) L.D.$

Dónde L.C.: Limite de cuantificación; L.D.: Limite de detección.

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

La exactitud del método se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se añadieron cantidades conocidas de Catequina a la muestra problema analizada previamente para obtener concentraciones finales de 10  $\mu\text{g/mL}$ , 12  $\mu\text{g/mL}$  y 14  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior.

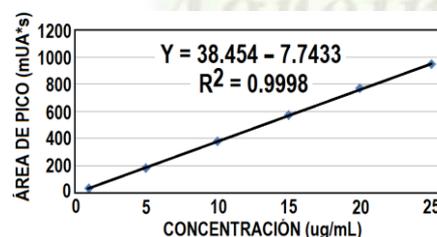
Como fase móvil se empleó una solución A (metanol) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 15 minutos, en una gradiente isocrática de 15% de A y 85% de B; leyéndose a una longitud de onda de 210 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10  $\mu\text{L}$ , a una temperatura de 35 °C.

### 3. Resultados y discusión

En la Tabla 1 y Figura 1 se presentan los resultados de la linealidad de Taninos (Catequina), empleando concentraciones de 1; 5; 10; 15; 20; 25;  $\mu\text{g/mL}$ , obteniéndose áreas de pico que van desde 32,13851 a 947,67609; obteniéndose una pendiente de 38.454 y un coeficiente de correlación de 0,9998; lo cual nos indica la sensibilidad del método aplicado por HPLC (Franke, 1994), así como de una excelente linealidad entre la concentración de los estándares y el área de los picos (Klejdus, 1999).

**Tabla 1.** Linealidad de las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  de taninos (Catequina)

Nivel	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Área Pico (mUA*s)
1	1	32,13851
2	5	180,08177
3	10	375,92230
4	15	572,80670
5	20	767,45276
6	25	947,67609



**Figura 1.** Curva de calibración de Taninos (Catequina).

En la tabla 2 se presenta el límite de detección de Taninos (Catequina), encontrándose que el límite de concentración es 0,21  $\mu\text{g/mL}$ . El límite de detección puede ser establecido de diferentes maneras dependiendo del tipo de método: no instrumentales o instrumentales, y dentro de los instrumentales el de comparación del comportamiento de blanco con blanco enriquecido a diferentes concentraciones. Se preparan soluciones independientes de blanco y de blanco enriquecido a diferentes niveles de concentración bajos, cercanos al límite de detección esperado.

El comportamiento lineal de un método, debe ser demostrado dentro del intervalo en el cual es probable que se trabaje, este intervalo varía dependiendo del tipo de determinación a realizar, en esta investigación el intervalo debe estar entre 33,3% y 166,6% de la concentración de trabajo y el coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0,98 y 1,00; el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0,995; en nuestro caso la correlación para Taninos (Catequina), es de 0,9998.

**Tabla 2.** Límite de detección de taninos (Catequina)

Analito	Concentración (µg/ml)	Área pico (mUA*s)
Catequina	0,21	0,33204

En la tabla 3 se presenta el límite de cuantificación de Taninos (Catequina), obteniéndose que el analito se pueda cuantificar a partir de la concentración de 0,7 µg/mL. La IUPAC (1995) lo designa por  $L_Q$  y lo define como el valor verdadero de la señal de la concentración del analito que conducirá a estimaciones (o medidas) con una desviación estándar relativa especificada; puede realizarse por métodos no instrumentales e instrumentales, y den-

tro de estos últimos la comparación de señal/ruido es de 10:3.

**Tabla 3.** Límite de cuantificación de taninos (Catequina)

Analito	Concentración (µg/ML)	Área Pico (mUA*S)
Catequina	0,7	30,71070

En la tabla 4 se presenta la evaluación de la precisión del método en la determinación de Taninos (Catequina), en donde se analizaron tres concentraciones: 8 µg/mL (80%), 10 µg/mL (100%) y 12 µg/mL (120%); obteniéndose valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, lo cual nos afirma que la precisión de la metodología aplicada.

Existen diferentes formas de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad. En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa (Miller y Miller, 1993).

Se recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento.

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

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

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

Ensayo	Concentración (µg/mL)	Área Pico (mUA*s)	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa (%) (2,0%)
1	10	377.7282	10.02	100.24	99.55	0.66	0.66
		372.6649	9.89	98.92			
		374.8385	9.94	99.49			
2	12	460.7505	12.18	101.52	100.78	0.66	0.65
		454.8950	12.03	100.25			
		456.2718	12.06	100.55			
3	14	538.6695	14.20	101.49	101.07	0.76	0.75
		531.64719	14.02	100,19			
		538.81268	14.21	101.52			
Promedio (%)				100.46			
Desviación Estándar				0.92			
Desviación Estándar Relativa (%) (2.0%)				0.91			

Para ello se trabajaron tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120 %), con tres muestras independientes de cada nivel. Datos con los que se cuenta si al evaluar la exactitud, se llevó a cabo por el método de Adición estándar

En la tabla 5 Se presenta la evaluación de la exactitud del método en la determinación de Taninos (Catequina), en donde se analizaron tres concentraciones: 10 µg/mL, 12 µg/mL y 14 µg/mL; obteniéndose valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, lo cual nos afirma que la exactitud de la metodología aplicada (Careri *et al.*, 2001).

La exactitud es uno de los parámetros de calidad básicos que desde un punto de vista metrológico, depende de la trazabilidad de las medidas (Sánchez *et al.*; 2010). Mongay-Fernández (2011) define la exactitud como “el grado de concordancia entre el resultado de un medida y el valor real del mesurando”, en una nota asociada a esta definición añade que se trata de un concepto cualitativo utilizado para describir el error asociado a un resultado. Efectivamente se suele decir que un valor es muy exacto o poco exacto; sin embargo, hace falta un parámetro que permita medir cuantitativamente la exactitud; este parámetro es el error que

se define como “la diferencia entre el resultado de la medida y el valor real del mesurando”. Se determina la concentración de una muestra por triplicado. Luego conocida su concentración promedio, se le enriquece con estándar de analitos a tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método. ICH (International Conference Harmonization), recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración q.

#### 4. Conclusiones

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

## Referencias

- Cala, M.; Vásquez, A.; Garcia, A.; Martinez, J.R.; Stashenko, E. 2011. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev Acad Colomb Cienc.* 136(35): 371-379.
- Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A. 2001. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of isoflavonoids in soybeans. Study of extraction procedure by experimental design. *Chromatographia* 54: 45-50.
- Franke, A.A.; Custer, L.J.; Cerna, C.M.; Narala, K.K. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 9: 1905-1913.
- García-Fajardo, J. A.; M. del R. Ramos-Godínez; J. Mora-Galindo. 1999. Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 123-128. 3-4.
- Griffith, A.P.; Collison, M.W. 2001. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 913: 397-413.
- Hutabarat, L.S.; Mulholland, M.; Greendfield, H. 1998. Development and validation of an isocratic high - performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 795: 377-382.
- IUPAC. 1995. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities. *Pure & Appl. Chem.* 67: 1699-1723.
- Klejdus, B.; Vitamvášová, D.; Kubáň, V. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. *J Chromatogr A*; 839: 261-263.
- Miller, J.C.; Miller, J.N. 1993. *Estadística para Química Analítica*. 20 ed. Edición Addison - Wisley Iberoamericana. Delaware (E.U.A.). pp. 42-52.
- Mongay-Fernández, C. 2011. *Quimiometría*. En: B. Lopez, Ed. Universidad de Valencia. Servicio de Publicaciones. pp. 27.
- Sánchez, L.M.; Mancebo, B.; Faure, R.; Travieso, M.C. 2010. Validación de la técnica para la determinación de catequina en tabletas de *Rhizophora mangle* L. por CLAR. *Revista Cubana de Farmacia* 45(1): 58-70.

