

DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN LECHE FLUIDA POR ELECTROFORESIS CAPILAR CON ESTÁNDAR INTERNO

Miguel Giraud*, Juan Kulharwiuk, Sergio Fomicz, Irene Markowski, Héctor Sánchez y Juan Menéndez

Laboratorio Físicoquímico. Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional de Lanús. 29 de Setiembre 3901, Lanús, Provincia Buenos Aires, Argentina.

E-mail: mgiraud@unla.edu.ar

RESUMEN

El método de estándar externo, empleado frecuentemente en análisis, carece de exactitud ya que por sus características nunca se ponen en contacto los analitos a determinar con la matriz. Se propone la aplicación del método de estándar interno al análisis de lactosa en leches fluidas, utilizando fructosa como estándar interno y electroforesis capilar de zona con detección UV indirecta.

Palabras clave: lactosa, fructosa, estándar interno, electroforesis capilar de zona, leche fluida.

ABSTRACT

Lactose assay in fluid milk by capillary zone electrophoresis using internal standard method

The external standard method, used frequently in analysis, lacks accuracy since because of its characteristics the analytes to be determined never come into contact with the matrix. What is proposed in this work is the application of the internal standard method using fructose and capillary zone electrophoresis with indirect UV detection of the analysis of lactose in fluid milks.

Key words: lactose, fructose, internal standard, capillary zone electrophoresis, fluid milk.

INTRODUCCIÓN

Los azúcares son unos de los constituyentes principales de los alimentos junto con las proteínas y los lípidos. Su análisis es importante tanto para el control de calidad, el monitoreo de los rotulados y estudios de adulteraciones (1,2). Por presentar inexactitudes debidas a que en ningún momento el analito a determinar está en contacto con la matriz en cuestión, el método del estándar externo utilizado frecuentemente en los laboratorios de análisis debe controlarse con otros métodos que corrijan las inexactitudes descritas. Este consiste en agregar cantidades exactamente medidas del estándar, tanto a la

*Miguel Ángel Giraud: Especialista en Tecnología de Alimentos (Universidad Tecnológica Nacional, 2002). Bioquímico (Universidad Católica de Córdoba, 1967). Profesor Asociado Concursado de Química Analítica (Universidad Nacional de Lanús desde 1999). Director de la Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Universidad Nacional de Lanús desde 1997). Su principal línea de trabajo es la ciencia de los alimentos.

muestra como a los estándares de calibración. El estándar interno a utilizar debe cumplir con las siguientes condiciones: no estar presente en la muestra, ser lo más parecido posible al analito a investigar, responder al detector de manera similar al analito, ser estable e inerte químicamente y cromatográficamente, así como deberá separarse del analito con resolución mayor a la unidad. Con este método se pueden compensar entonces los errores de inyección, dilución, extracción, derivatización (3,4,9). Algunos autores desaconsejan su uso, pero es solo desde un punto de vista teórico (8,15); operativamente, la mayoría lo considera una opción excelente para corregir las inexactitudes que presenta el método del estándar externo. Existen sustancias que son estándares internos generales como las alquilfenonas (16). Hay en la literatura científica métodos colorimétricos, GC, TLC, HPLC y enzimáticos para determinar lactosa (10-14).

En el presente trabajo se propuso un método nuevo y sencillo de electroforesis capilar de zona con detección UV indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los siguientes reactivos analíticos: fructosa P.A., lactosa P.A., ácido acético glacial grado HPLC y agua grado HPLC (Interchemistry, Buenos Aires).

El instrumento de Electroforesis Capilar de Zona fue un modelo Agilent Technologies HPG 1600 AX (Analytical Technologies S.A., Buenos Aires). Los filtros para jeringa fueron de la marca Millex SLCR13NS de Millipore (Biopore S.A, Buenos Aires) y el análisis de los datos obtenidos fue realizado con una computadora personal y un programa específico, ChemStation 32 (Analytical Technologies, S.A., Buenos Aires).

Se preparó una solución del estándar para uso diario a 5 % (m/m) de lactosa. La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones: 0,1; 0,5; 1; 5; 10 y 20 % (m/m). Se preparó el estándar interno de fructosa a una concentración a 1 % (m/m). La preparación del estándar de lactosa con estándar interno para la obtención del factor de respuesta fue la siguiente: en un tubo cónico se mezclan 6 partes de estándar de lactosa con 1 parte de estándar interno y 0,1 parte de ácido acético glacial.

Las muestras se prepararon por mezclado, en un tubo cónico, de 6 partes de la leche a analizar con 1 parte de estándar interno (fructosa) y con 0,1 parte de ácido acético glacial. Se agitó vigorosamente por 1 min. Se centrifugó a 3000 rev/min durante 5 min para eliminar las proteínas lácteas insolubilizadas por el medio ácido. Se filtró y el filtrado estuvo listo para la inyección al instrumento. Las condiciones para la determinación (5,6) fueron: un capilar de sílice desnudo de 50 μ m de diámetro interno y 80 cm. El potencial aplicado fue de 25 kV (polaridad negativa), por lo cual los azúcares migraron al cátodo. El valor de pH del tampón fue de 12,3 necesario para mantener la fuerza electroosmótica alta y una generación de calor baja. La composición del tampón, de baja conductividad, fue la siguiente: 1,6 mL de colorante PDC (ácido piridin-dicarboxílico); 0,25 mL CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio); 0,65 mL H₂O y 100 μ L NaOH 1 N. La presión de inyección fue fijada en 5 kPa. El detector utilizado es del tipo arreglo de diodos, con la longitud de onda fijada en 450,8 nm y la longitud de onda de referencia en 210,16 nm (UV indirecta). Las Fig. 1 y 2 muestran los electroferogramas obtenidos. Los tiempos de retención identifican los analitos. Ellos fueron 11,5 min para fructosa y 12,5 min para lactosa.

El factor respuesta se calculó según la expresión:

$$\text{Factor respuesta (Rf)} = \frac{\text{mg de Lactosa}}{\text{mg de Fructosa}} \times \frac{\text{Área de Fructosa}}{\text{Área de Lactosa}}$$

La concentración de lactosa en la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Área lactosa}}{\text{Área fructosa}} \times \frac{\text{mg Fructosa en la muestra}}{\text{mg muestra pesada}} \times \text{Rf} \times 100 = \% \text{ Lactosa}$$

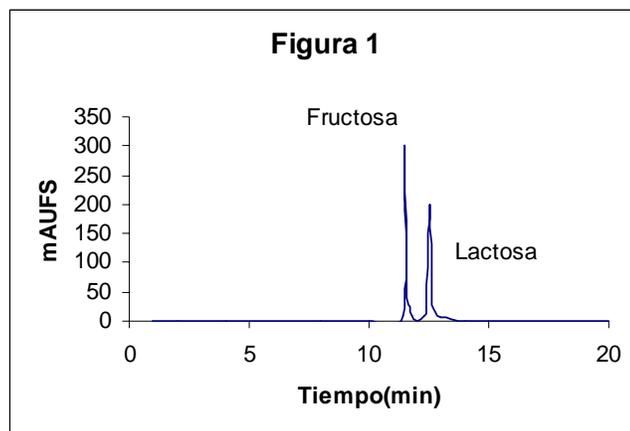


Fig. 1. Electroferograma de un estándar diario de lactosa (5 % m/m) con adición de estándar interno.

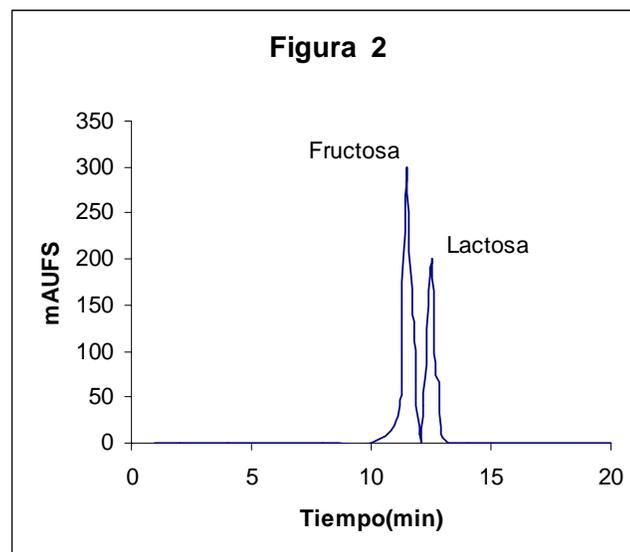


Fig. 2. Electroferograma de una muestra de leche fluida con adición de estándar interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos las leches fluidas enteras analizadas cumplieron con la especificación del Código Alimentario Argentino (3 a 6 % m/m de lactosa) mientras que las leches deslactosadas también cumplieron con la misma especificación (0,2 a 0,8 % m/m de lactosa). La resolución de los picos fue óptima, logrando un valor mayor de la unidad.

El método desarrollado puede trasladarse fácilmente a otras tecnologías separativas como HPLC y TLC. El método puede aplicarse a otros alimentos lácteos como yogures no frutados, quesos, leche en polvo, etc. En todos ellos se deberá tener en cuenta que el producto lácteo no contenga fructosa y ello se realiza efectuando una corrida electroforética sin el agregado de fructosa y observando que en el tiempo de retención no aparezca el pico en cuestión.

La validación del método (7, 8) consistió en calcular los siguientes parámetros:

Estudio de la recuperabilidad para el estándar a 5 % (m/m) de lactosa: 92,5 % y para una concentración a 1 % m/m de fructosa: 94,7 %. La determinación de la linealidad del método: desde 0,1 hasta por lo menos 20 % (m/m) de lactosa, se obtuvo un coeficiente de regresión lineal $r = 0,99$; El límite de detección obtenido fue de 0,025 % (m/m) de lactosa, siendo el coeficiente de variación porcentual de 15,7. El límite de cuantificación obtenido fue de 0,1 % m/m de lactosa con un coeficiente de variación porcentual de 4,1. El coeficiente de variación porcentual intradía para cinco determinaciones conteniendo 5 % (m/m) de lactosa fue de 0,9. La reproducibilidad interna porcentual durante cinco días, para una concentración de lactosa de 5 % (m/m) fue de 2,2.

REFERENCIAS

1. Committee of Food Chemicals Codex. 5th ed National Academic Press, Washington DC. Lactose assay, Appendix X: General Test and Assays, 952-953, 2005.
2. AOAC International Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed Washington DC, USDA. Cap. 33, 2002, pp. 16-18.
3. Quatrocchi, O.; Abelairas, S. y Laba, R. Introducción a la HPLC: Aplicación y Prácticas, ed. del autor, Buenos Aires, Cap. 10, 1992, p. 263.
4. Katz, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P. y Miller, N. Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques, Marcel Dekker, New York, Cap.3, 1998, p. 86.
5. Altria, K. Capillary Electroforesis, Ed. Humana Press, New York, 1990.
6. Dabrio, M. Cromatografía y electroforesis en columna, Springer-Verlag-Ibérica, Barcelona, Cap. 4, 2000, p.91.
7. Snyder, L.; Glajch, J. y Kirkland, J. Practical HPLC Method Development, John Wiley and Sons, New York, 1988.
8. Snyder, L. y Kirkland, J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2da. ed., John Wiley and Sons, New York, 1979.
9. Schram, S. Basic Book on Liquid Chromatography, LDC, Boca Ratón, Florida, Cap. 9, 1980 p. 108.
10. Alais, Ch. Ciencia de la Leche, Ed. Reverte, Barcelona, 2da. Parte, Cap. 4, 1985, p.32.
11. Luquet, F.; Keilling, J. y de Wilde, R., Leche y Productos Lácteos, Vol. I, Acribia, Zaragoza, Cap.1, 1991, p.11.
12. Barberis, S. Bromatología de la Leche, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap.5.3, 2002, p.51-52.
13. Amato, J. Ciencia y Tecnología de la Leche, Acribia, Zaragoza, Cap.1, 1991, p. 33.
14. Keating, P. Introducción a la Lactología, Limusa, México DF. Cap. 1, 1999, p. 24.
15. Haefelfinger, P. J. Chromatogr. 218, 73-75, 1981.
16. Kitka, E. y Stange, A. J. Chromatogr. 138, 41-45, 1977

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación del método del estándar interno lleva a una mejora fundamental en la cuantificación sobre el tradicional método de estándar externo.

La tecnología de electroforesis capilar de zona/UV indirecta supera ampliamente al tradicional método para determinar azúcares en alimentos, que es HPLC/índice de refracción, la cual utiliza columnas muy específicas y costosas y que además tiene otra limitante central que es el estricto control de la temperatura.

Si el factor respuesta varía en ± 5 % respecto del valor inicial, las soluciones de lactosa y fructosa deberán prepararse nuevamente. Por lo tanto, se recomienda preparación extemporánea y no utilizarlas después de los cinco días de preparadas. La linealidad del método está dentro de los valores esperados en las muestras analizadas.