

## Un método cromatográfico para la determinación de sacarosa en bebidas comerciales con azúcar añadida

A chromatographic method for the determination of sucrose in commercial beverages with added sugar

Esteban Pérez López<sup>1</sup>

Universidad de Costa Rica, San Ramón, Costa Rica

esteban.perezlopez@ucr.ac.cr

<https://orcid.org/0000-0002-6379-7139>

Fecha de recibido: 23-2-21

Fecha de aceptación: 19-5-23

### Resumen

Derivado del excesivo consumo de azúcar en la sociedad costarricense y la problemática derivada, en gran parte, por el consumo de bebidas comerciales con contenido alto de sacarosa, y su consecuente efecto sobre la salud pública. En el presente artículo, se evidencia el desarrollo y validación de una metodología analítica libre de interferencias por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-IR), para la cuantificación de sacarosa en bebidas comerciales con azúcar añadida. Se lograron determinar las condiciones cromatográficas más adecuadas para la cuantificación de sacarosa en el Laboratorio de Química del Recinto de Grecia de la Universidad de Costa Rica, donde sobresale el empleo de una columna cromatográfica Phenyl de 250 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m de partícula, empleando agua ultrapura como fase móvil. Además, la validación de los parámetros de desempeño analítico: linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, veracidad, especificidad, los cuales cumplieron a cabalidad con los estándares previstos para cada parámetro analítico evaluado. De esta forma, se establece y valida un nuevo método para cuantificar sacarosa en bebidas comerciales con azúcar añadido, asegurando eficiencia y eficacia en la cuantificación bajo las condiciones validadas.

**Palabras clave:** sacarosa, cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC, índice de refracción, validación.

### Abstract

Derived from the excessive consumption of sugar in Costa Rican society and the problems derived largely from the consumption of commercial beverages with high sucrose content, and its consequent effect on public health. This article shows the development and validation of an analytical methodology free of interference by high-performance liquid chromatography coupled to a refractive index detector (HPLC-IR), for the quantification of sucrose in commercial beverages with added sugar. The most suitable chromatographic conditions for the quantification of sucrose were determined in the Chemical Laboratory of the Greece Campus of the University of Costa Rica; where the use of a Phenyl chromatographic column of 250 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m particle stands out, using ultrapure water as the mobile phase. In addition, the validation of the analytical performance parameters: linearity, repeatability, intermediate precision, truthfulness, specificity, which fully complied with the standards provided for each analytical parameter evaluated. In this way, a new method is established and validated to quantify sucrose in commercial beverages with added sugar, ensuring efficiency and effectiveness in quantification under validated conditions.

**Keywords:** sucrose, high performance liquid chromatography, HPLC, refractive index, validation.

<sup>1</sup> Máster en Sistemas Modernos de Manufactura y Bach. en Laboratorista Químico. Académico en Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente - Recinto Grecia, Costa Rica.

## I. Introducción

Según comenta Olivares (2018), en un estudio de la Universidad de Costa Rica, el 75% del consumo de azúcar en Costa Rica proviene de bebidas procesadas, tales como refrescos envasados, gaseosas, jugos de caja, refrescos caseros, entre otros. En este contexto, y partiendo de las implicaciones a nivel salud del alto consumo de sacarosa en la sociedad costarricense, se permite dimensionar adecuadamente la relevancia de estudios relacionados con el contenido y consumo de azúcar en bebidas comerciales, lo cual obliga a garantizar metodologías analíticas de laboratorio, libres de interferencias, con buena precisión y exactitud.

En relación con lo anterior, Velasco (2015) menciona que, entre las formas más comunes de cuantificar sacarosa en la industria alimenticia, se encuentra la técnica de refractometría. La simplicidad de esta técnica, la baja cantidad de muestra que requiere, entre otras; son características que hacen de la refractometría una técnica accesible. Sin embargo, esta presenta limitaciones tal como su falta de selectividad, dado que la técnica se basa en el cambio de la trayectoria de la luz en función de la densidad o concentración del medio que atraviese. La técnica indistintamente cuantifica todos los componentes de una muestra que contribuyan a esta característica.

No obstante, la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) posee la particularidad de que permite una separación de los componentes de matrices complejas. A partir de esto, es capaz de generar resultados en tiempos cortos, con una alta sensibilidad dadas las condiciones apropiadas, entre otros beneficios, como describen Voet & Voet (2006).

En este sentido, según estudios realizados a nivel internacional, en Venezuela, los investigadores Arenas de Moreno *et al* (1995) realizaron un estudio enfocado en la variación del contenido de ribosa, xilosa, fructosa, glucosa, sacarosa y azúcares totales en frutos de guayaba por HPLC con refractómetro diferencial. Las muestras provinieron de una

plantación comercial del Municipio Mara del estado Zulia. Estos fueron analizados durante varias de las etapas de su maduración y, según el mes de cosecha, determinando cualitativa y cuantitativamente los azúcares presentes y su concentración. Concluyeron con base en los resultados, que la concentración de sacarosa aumenta proporcionalmente al grado de maduración de la muestra; en tempranas etapas de maduración predomina una mayor concentración de fructosa. Con base al análisis estadístico, comprobaron que la interacción de los factores “mes de cosecha” y “grado de madurez” de la muestra afectaron las variables estudiadas exceptuando el contenido de xilosa.

Los investigadores Rubio-Huacuz *et al* (2004), de la Universidad Autónoma de México, realizaron un proyecto donde ensayaron diferentes técnicas para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa por HPLC en jugo de caña de azúcar. Concretamente, realizaron clarificaciones químicas y enzimáticas de las muestras para obtener de un jarabe fructosado al 42% (p/v); evaluando en cada etapa de los procesos aplicados la cantidad de glucosa, sacarosa y fructosa por medio de HPLC. Se implementó un detector de índice de refracción, una columna Termo “Hypersil” (250 x 4,6 mm), Sílice amino-ligada, una fase móvil compuesta por acetonitrilo - agua (80:20) con un flujo de 1 ml/min y una inyección de 20 µl. Establecieron que el proceso de hidrólisis enzimática es más adecuado para el tratamiento de la muestra, ya que con este se logró obtener una mayor concentración de los azúcares en estudio.

En la Universidad Politécnica de Madrid, en España, González *et al* (2009) realizaron un estudio comparativo del contenido de azúcares (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) de la harina de soya según su procedencia. En dicho estudio, se examinaron 36 muestras de harina de soya, provenientes de Argentina, Estados Unidos y Brasil, por medio de un método propio validado por HPLC. Para el sistema cromatográfico se implementó columna Sugar-Pak I (300 mm x 6,5 mm I.D.), con una fase móvil compuesta por una solución de 20 mg/L de

acetato de calcio y 50 mg/L de EDTA con un flujo de 0,5 ml/min, con un control de temperatura a 90°C. Los resultados de las 36 muestras mostraron una concentración dentro de los rangos aceptables de los analitos en estudio para las harinas de soya altas en proteína.

En un estudio realizado por Herrera (2011), de la Universidad Tecnológica de Pereira, fueron comparados los métodos analíticos de polarimetría, refractometría y el método de Lane y Eynon en comparación a HPLC en la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña. Dicho estudio demostró mediante resultados experimentales y por medio de análisis estadístico (pruebas de t pareada y despareada), que respecto a las técnicas de HPLC y polarimetría para la determinación de sacarosa, no existe evidencia significativa en los resultados obtenidos. Por otro lado, la comparación del método refractométrico indicó que este posee una baja correlación respecto al método por HPLC; la alta variación de los resultados por refractometría fueron atribuidos a alteraciones de la muestra diluida, como la inversión de la sacarosa. Finalmente, respecto al método de Lane y Eynon para la determinación de azúcares reductores, se concluyó que es un método de precisión intermedia respecto al método por HPLC.

En Chile, la investigadora Foitzich (2013) presentó un proyecto de desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas por HPLC-IR; más puntualmente, el proyecto se centró en la determinación de glucosa, fructuosa y sacarosa en muestras de miel, pan de abeja, complementos alimenticios para abeja y sus materias primas, bajo el marco del proyecto del Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola CAPI\_ID0904. Fue implementada una columna cromatográfica Merck Purospher STAR-NH2 (250 x 4,6 mm x 5µm) con precolumna y una mezcla compuesta por acetonitrilo-agua (83:17) como fase móvil. De estos parámetros, se comprobó un adecuado tiempo de retención y separación de los picos, lográndose validar adecuadamente

los parámetros de desempeño analíticos, con su respectivo análisis estadístico.

En la Universidad Agrícola de Shandong, en China, los investigadores Ma et al (2014), miembros de la facultad de Química y Ciencias de los Materiales, desarrollaron un método para la separación y detección simultánea de fructosa, sorbitol, glucosa y sacarosa, siendo el objeto de estudio, la cantidad de dichos analitos en muestras de durazno, manzana, sandía y cereza. Este método fue desarrollado en HPLC con un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Para dicho análisis, se implementó el uso de una columna Phenomenex Luna 5u NH2 100A (250 mm x 4.60 mm, 5 µm). Una fase móvil de flujo isocrático compuesta por acetonitrilo - agua (82,5:17,5). Los resultados fueron satisfactorios, analizados bajo los criterios estadísticos correspondientes, para afirmar que los parámetros de desempeño analíticos fueron adecuados para la validación del método. Del mismo modo, concluyeron que la presencia de los azúcares variaba según la muestra, mientras que la glucosa y fructosa fue encontrada constante en todas las frutas; el sorbitol solo fue encontrado en las muestras de durazno, manzana y cereza; por su parte, la sacarosa fue detectada únicamente para las muestras de manzana, durazno y sandía.

En Cuba, un equipo de investigadores de la Universidad de los Andes compuesto por Brunetto de Gallignani *et al* (2014) desarrollaron un método analítico, para la determinación de glucosa, fructuosa y sacarosa en muestras de cacao criollo venezolanos. Se analizaron 90 muestras de variedades diferentes tomadas antes, durante y después del proceso de fermentación y tostado. Para dicho análisis, se optimizó y validó un método por cromatografía de gases acoplada a un sistema de detección de espectrofotometría de masas. A partir del polvo del cacao desgrasado y molido con agua (70°C) y sonificado durante 15 minutos, se sometió a un proceso de derivatización con N-metil-trimetilsilil-trifluoacetamida (MSTFA), utilizando radiación de microondas a una potencia de 630 W

durante 60 s. En las condiciones óptimas, el método refleja una recuperación entre el 98 - 108% con un CV < 3,68% para un n=5 y una precisión con un CV < 3,31% para un n=5; concluyendo que el método estudiado constituye una buena alternativa para analizar selectivamente los azúcares mencionados en muestras de cacao.

También, en Colombia los investigadores Duarte-Delgado *et al* (2015), de la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad McGill de Canadá, desarrollaron y validaron un método por HPLC para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructuosa en tubérculos de *Solanum tuberosum* del grupo Phureja (patata criolla). Esta metodología implementó una columna AMINEX HPX 87H, con control de temperatura a 18°C, junto con un detector de índice de refracción con un control de temperatura a 35°C; la fase móvil consistió en una solución 0.01 M de ácido sulfúrico; el método de extracción más efectivo fue una doble extracción con una solución de metanol 50% (v/v), para un porcentaje de recuperación de 94,14 a 99,77%. El método fue validado exitosamente evaluando los parámetros de desempeño analíticos: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

En Rumania, en la Universidad de Babeş-Bolyai, los investigadores Filip *et al* (2016) optimizaron un método para la determinación simultánea de glucosa, fructuosa, sacarosa y sorbitol en hojas y cáscara de distintas variedades de manzana por HPLC-IR. El cromatógrafo se equipó con una columna Carbosep Coregel 87H3 (300 × 7.8 mm) y una fase móvil compuesta por una solución 0,005 M de ácido sulfúrico. Un flujo de 0,3 ml/min, junto con un control de temperatura para la columna a 35°C. Los parámetros de desempeño analíticos de linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y recuperación, fueron validados satisfactoriamente y concluyeron que el método desarrollado posee una adecuada sensibilidad y reproducibilidad, al evaluar el contenido de las siete variedades de *M. domestica* Borkh provenientes de colecciones de

germoplasma. A partir de esto, reconocen la utilidad del método para estudiar y mejorar los métodos de almacenamiento, a través de evaluaciones comparativas.

Igualmente, en Colombia, en la Universidad industrial de Santander, el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, compuesto por Murillo *et al* (2017), implementaron un método analítico por HPLC para evaluar la calidad de mieles provenientes del nororiente colombiano. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la idoneidad de los parámetros analíticos (linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación) para la adecuada cuantificación de sacarosa, glucosa, fructosa e hidroximetilfurfural en las muestras de miel atendiendo, de este modo, la necesidad de adecuar de un método cromatográfico para dar seguimiento a investigaciones de adulteración. Los investigadores concluyeron que los parámetros analíticos, posterior al análisis estadístico respectivo, cumplieron con los valores aceptables y, respecto a las muestras, determinaron que la relación fructosa/glucosa presentaba valores adecuados. Por su parte, la hidroximetilfurfural presente en las muestras se encontró en concentraciones menores a la permitida.

Unido a lo anterior, en Costa Rica, el investigador Vargas (1999), de la Universidad de Costa Rica, presentó su proyecto de graduación enfocado en recomendaciones para el establecimiento de un reglamento técnico en la caracterización de los jugos de naranja. Este proyecto determinó los parámetros de calidad más importantes como: acidez (titulable e iónica), sólidos solubles y totales, cenizas, colorantes, azúcares reductores, azúcares no reductores y vitamina C. Estos dos últimos fueron cuantificados por HPLC con un método optimizado a las condiciones experimentales. Dichos parámetros fueron aplicados a 15 muestras comerciales de jugo; para el análisis de los azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa), fue implementada una columna cromatográfica Econosphaera NH2 (250 x 4.6 mm x 5 µm) marca Alltech, una fase móvil compuesta por acetonitrilo - agua (80:20), a un flujo de 2,0 ml/min

y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. Con respecto a la determinación de los azúcares por HPLC, se llegó a la conclusión de que el método es selectivo y que podría implementarse perfectamente para la cuantificación independiente de glucosa, fructosa o sacarosa, aún en pequeñas cantidades en las muestras. Del mismo modo, fue reconocido que la metodología posee la ventaja de que las muestras no necesitan ningún tratamiento especial, además de que es requerida poca muestra para el análisis y el tiempo de corrida es relativamente corto.

Del mismo modo, en Costa Rica, Rivera-Rodríguez et al (2005), de la Escuela de Química y Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica, efectuaron una caracterización fisicoquímica de los siropes comerciales preparados a base de sacarosa. El proyecto contempló la evaluación de 25 marcas de sirope y las muestras fueron sometidas a análisis de sólidos totales, pH, determinación cuantitativa de colorantes, sacarosa, glucosa y fructosa. Para el análisis cuantitativo de los azúcares se empleó la técnica de HPLC con detector de índice de refracción, fue utilizada una columna Bio-Rad (300x7,8 mm 9  $\mu$ m); la fase móvil consistió en agua destilada, desionizada y filtrada de un sistema Milli Pore. De la determinación cuantitativa de los azúcares, concluyeron que la mayoría de los siropes analizados cumplen con los valores sugeridos por la normativa internacional, además, menos del 30% de los siropes analizados son adulterados con agentes espesantes (polisacáridos) para aumentar la viscosidad, aunque con un menor efecto edulcorante.

Más recientemente, dentro del ámbito costarricense, cabe mencionar el trabajo de Figueroa et al (2013), miembros del Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria, quienes ejecutaron la validación de un método de determinación de fructuosa, glucosa y sacarosa en muestras de miel multifloral por HPLC-IR. En la validación de esta metodología, basada en la Norma IRAM 15946, se estudiaron los parámetros de selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez e incertidumbre para los

tres azúcares. Adicionalmente, se evaluó el límite de detección y el límite de cuantificación de la sacarosa. Para dicho proyecto adecuaron los parámetros cromatográficos a una fase móvil compuesta por acetonitrilo-agua (80:20), un volumen de inyección de 20  $\mu$ L, temperatura de horno de 30°C y una columna Thermo Scientific APS-2 Hypersil, 250 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m. Dichos parámetros, junto con el análisis estadístico correspondiente para cada uno, confirmaron que el método propuesto es adecuado para la cuantificación de los azúcares mencionados.

Bajo este panorama, en la presente investigación se plantea el desarrollo y la validación de una nueva metodología analítica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción para la cuantificación de sacarosa en bebidas comerciales, con las condiciones disponibles en el laboratorio de química del Recinto de Grecia de la Universidad de Costa Rica, como una de las etapas contempladas en el proyecto de investigación 540-C0-126 Diagnóstico del consumo de sacarosa proveniente de bebidas comunes de venta libre en Costa Rica y su relación con la dosis diaria máxima recomendada. De esta forma, se buscó garantizar que no existieran interferencias en la resolución de los picos cromatográficos, asegurando la separación de los componentes de la matriz de los refrescos en el proceso de análisis.

## II. Metodología

Mediante la indagación de artículos científicos de investigaciones que contemplaron la sacarosa como analito en común, se determinaron parámetros analíticos de prueba que permitieran definir una metodología analítica adecuada a las condiciones instrumentales imperantes en el laboratorio utilizado y las columnas analíticas disponibles para el fin previsto.

Todas las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Química del Recinto de Grecia, de la Universidad de Costa Rica, para lo cual se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

marca Thermo, con detector de índice de refracción (HPLC-IR) y bomba cuaternaria. Esto, como parte del trabajo demandado por el proyecto de investigación 540-C0-126, *Diagnóstico del consumo de sacarosa proveniente de bebidas comunes de venta libre en Costa Rica y su relación con la dosis diaria máxima recomendada*.

Primeramente, se probó con la implementación de una columna Sigma-Aldrich Waters Spherisorb Amino, de dimensiones similares a 250 x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  junto con una fase móvil compuesta por acetonitrilo - agua (83:17) con un flujo de 1.1 ml/min. Un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y un control de temperatura a 30°C para la columna.

Posteriormente, se evaluó el desempeño de una columna de carbohidratos (Thermo Scientific™ HyperREZ™ XP Carbohydrate Ca2+) de 300 x 7,7 mm con un tamaño de partícula de 8  $\mu\text{m}$ . Usando agua tipo 1 como fase móvil a un flujo de 0,6 ml/min. Un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y un control de temperatura a 80°C para la columna.

También, sin haber encontrado respaldo en investigaciones anteriores, pero empleando criterio del investigador, se dispuso probar la columna Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$  de partícula, con una fase móvil compuesta por agua-acetonitrilo (80:20), con un control de temperatura de la columna a 25°C y flujo de 1.0 ml/min.

En cada caso se analizaron patrones de sacarosa a concentraciones y volúmenes de inyección variados (entre 100 y 20000 mg/L como pruebas preliminares) para evaluar la intensidad de la señal resultante y si esta es adecuada. Del mismo modo, según fue necesario se realizaron pruebas adicionales en donde se modificó la composición de la fase móvil, flujo, temperatura de la columna, entre otros parámetros.

Se evaluó el desempeño de la metodología desarrollada analizando distintas muestras de

bebidas comerciales con contenido de azúcar, haciendo uso de la bebida gaseosa principal de la marca Coca Cola, por estar entre las más representativas para efectos de la investigación, así como, otras bebidas categorizadas como jugos, específicamente el HiC de manzana, HiC de uva, el Tampico y el Té frío de melocotón. Esto para exponer los posibles factores que puedan afectar en el desarrollo del análisis, tales como interferencias que requieran tratamientos adicionales a los previstos. En primera instancia, los refrescos fueron tratados para eliminar impurezas de la matriz con carbón activado, con ayuda de agitación mecánica constante, que a la vez elimina el gas de las bebidas gasificadas y, posteriormente, fueron diluidas con agua destilada a una concentración cercana al punto medio de la curva de calibración, cuyo rango de concentraciones se planteó entre 100 y 600 mg/L de sacarosa, como el rango de concentraciones que brindó un comportamiento lineal con una señal adecuada, que implicara la menor carga posible de la columna analítica con el analito de interés.

Para la evaluación de parámetros de desempeño del método, se siguieron pautas definidas en guías para la validación de métodos como la guía de Eurachem (2016) y la guía del Ministerio de Salud (s.f). De lo definido como pertinente para el propósito particular, se asumió la validación de un método no normalizado o desarrollado por el laboratorio, para la cuantificación del componente principal en la matriz de refrescos, para lo cual, se evaluaron los parámetros de desempeño analítico: linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, veracidad, selectividad-especificidad.

Los criterios estadísticos empleados, para el análisis de los datos, fueron los pertinentes para cada parámetro evaluado. Específicamente, la linealidad se evaluó con el coeficiente de determinación, el análisis de residuos y la prueba de Levene para determinar la homocedasticidad del método. La repetibilidad y la precisión del método se evaluó con desviación estándar relativa, y la veracidad por medio de los porcentajes de recuperación del analito.

### III. Resultados

A continuación, en el Cuadro 1 se presentan los principales resultados obtenidos para la elección y definición de un método cromatográfico adecuado para la determinación de sacarosa en bebidas comerciales.

**Cuadro 1.**

*Resultados cualitativos de las principales pruebas con diferentes métodos cromatográficos aplicados para la determinación de sacarosa.*

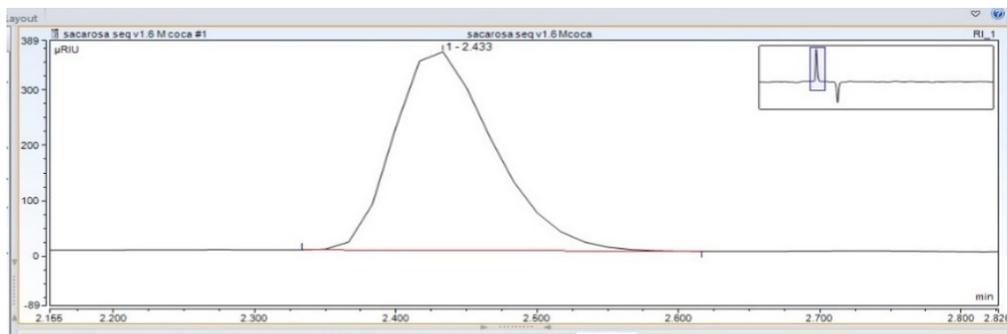
Métodos HPLC con detección por índice de refracción	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
Columna	Sigma-Aldrich Waters Spherisorb Amino 250 x 4,6 mm x $\mu\text{m}$	Carbohidratos Thermo Scientific™ HyperREZ™ XP Carbohydrate Ca <sup>2+</sup> de 300 x 7,7 mm x 8 $\mu\text{m}$ . 80°C	Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4,6 mm x 5 $\mu\text{m}$ . 25°C	Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4,6 mm x 5 $\mu\text{m}$ . 25°C
Fase móvil	Agua-acetonitrilo (87:13)	Agua tipo 1	Agua-acetonitrilo (80:20)	Agua tipo 1
Inyección	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Flujo	1,2 ml/min	0,6 ml/min	1,0 ml/min	1,0 ml/min
Fuente del método	Adaptado de Foitzich Molina (2013)	Adaptado de Filip, et al (2016)	Propio de la investigación	Propio de la investigación
Resultados obtenidos				
Estabilidad de línea base	Inestable con deriva	Inestable con deriva	Inestable con señal negativa	Estable sin señal negativa
Simetría de pico	Regular	Mala	Buena	Excelente
Falso positivo con el blanco	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Concentración de trabajo	No menor a 10000 mg/L	No menor a 10000 mg/L	No menor a 10000 mg/L	No menor a 100 mg/L

En vista de que lo obtenido para los denominados métodos 1 y 2 no fue favorable con estándares de sacarosa según se incluye en el Cuadro 1; como respaldo de lo correspondiente al método 3, se realizó la lectura de una muestra de la marca Coca Cola, tras someterla a una dilución de 1/10, y se obtuvo la señal mostrada en el cromatograma de la Figura 1. En este se aprecia un tiempo de retención

que coincide con el obtenido para los patrones de sacarosa, pero se mantiene la señal negativa posterior al pico de la sacarosa como se ve en el recuadro. Al integrarse el pico de interés se registró un área de 29,5320 para una concentración estimada de aproximadamente 11000 mg/L de sacarosa.

**Figura 1.**

*Cromatograma de muestra de "Coca-Cola" con columna Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4.6 mm x 5 μm de partícula, fase móvil agua-acetonitrilo (80:20), temperatura de columna 25°C y flujo de 1,0 ml/min.*

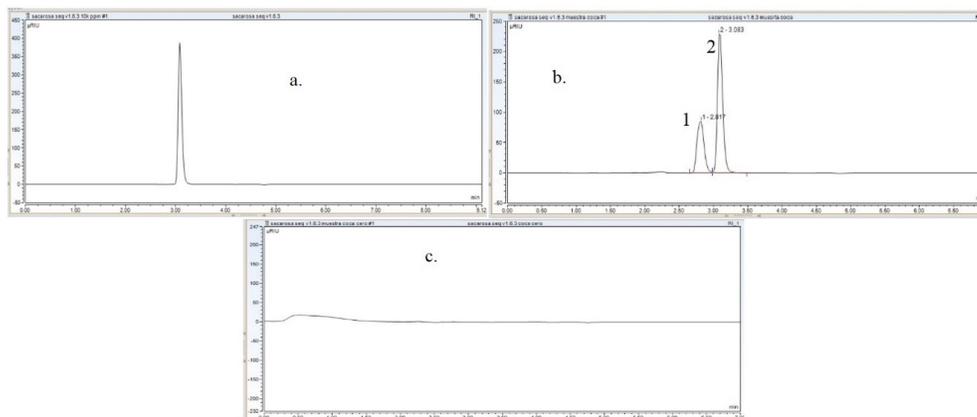


Como síntesis, al observar los resultados generados por la columna Agilent ZORBAX SB-Phenyl, se procedió a realizar más pruebas para evaluar el comportamiento de la señal a medida que se disminuía la proporción de acetonitrilo en la fase móvil (método 3). En el cromatograma "a." de la Figura 2 se puede observar la señal resultante para un patrón de sacarosa, de una concentración aproximada a 10 000 mg/L, al usar únicamente agua como fase móvil (método 4). Este presenta una señal con un ligero incremento en el tiempo de retención (muy cercano a los 3 minutos) y no se presenta ninguna deriva de señal.

Al evaluar la señal generada por una muestra de Coca Cola, para una muestra diluida con un factor de 1/10 para este nuevo sistema cromatográfico, se observa la señal mostrada en el cromatograma "b." (Figura 2). Este presenta la particularidad de tener una nueva señal de menor intensidad, señalada como "1", previa a la señal esperada como producto de la sacarosa, señalada como "2". Por último, se inyectó una muestra de Coca-Cola Zero para evaluar la selectividad del método, del cual, se obtuvo la señal mostrada en el cromatograma "c." en donde se aprecia únicamente una leve variación de la señal base en el primer minuto de la corrida y ninguna señal al tiempo de retención de la sacarosa.

**Figura 2.**

*Cromatogramas de patrón de sacarosa (a.), muestra de Coca-Cola (b.) y muestra de Coca Cola Zero (c.), con columna Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4.6 mm x 5 μm de partícula, fase móvil agua, temperatura de columna 25°C y flujo de 1.0 ml/min.*

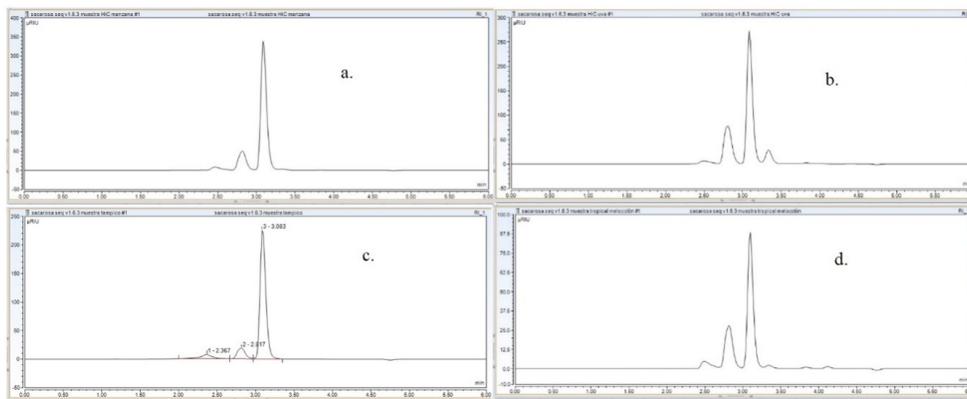


También, se realizaron pruebas con otras muestras de bebidas de origen comercial como se muestra los cromatogramas de la Figura 3. Estos comparten la similitud de poseer una señal de mayor intensidad coincidente a un tiempo de retención de aproximadamente 3 minutos (sacarosa). De igual

forma, se presentan señales de menor intensidad de forma similar a la muestra de Coca Cola presentada en cromatograma “b.” de la Figura 2; los cuales no generan interferencia alguna y pueden corresponder a otros azúcares presentes en la bebida.

**Figura 3.**

*Cromatogramas de muestra de HiC manzana (a.), HiC uva (“b.”), Tampico (“c.”) y Té frío melocotón (“d.”), con columna Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4.6 mm x 5 µm, fase móvil agua, temperatura de columna 25°C y flujo de 1.0 ml/min.*



Por último, las condiciones quedan establecidas según el Cuadro 2, con las cuales se pudo proceder a la validación del método analítico.

**Cuadro 2.**

*Condiciones cromatográficas óptimas alcanzadas*

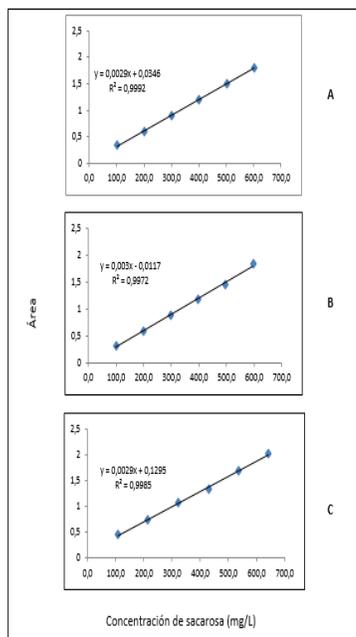
Columna cromatográfica	Agilent ZORBAX SB-Phenyl 250 x 4.6 mm x 5 µm de partícula
Temperatura de columna	25 °C
Fase móvil	100% Agua tipo 1
Flujo	1,0 mL / min
Presión	> 120 bar
Tiempo de corrida	6 - 7 minutos (TR: 3,2 min)
Detector	Índice de refracción
Temperatura del detector	37 °C
Volumen de inyección	20 µL

#### IV. Validación del método

En la Figura 4, se observan las tres curvas de calibración en un rango de 100 mg/L a 600 mg/L con ajuste lineal para determinar la linealidad. Se obtuvo un coeficiente de correlación al cuadrado ( $R^2$ ) de 0,9989 y la ecuación de  $y = 0,0029x + 0,0508$ , por la superposición de las tres curvas de calibración.

**Figura 4.**

*Curvas de calibración relacionada a la linealidad. A, B y C son tres curvas de calibración con ajuste lineal.*



A continuación, en el Cuadro 3 se muestran los valores y el promedio de las tres concentraciones (baja, media y alta) para precisión por repetibilidad, también la desviación estándar relativa (DRS%), la relación de Horwitz y los criterios de aceptación para DSR% (Ministerio de Salud, s.f) y para HorRaT (U.S. Food and Drug Administration [FDA], 2019).

**Cuadro 3.**

*Resultado de la precisión por repetibilidad del método de sacarosa.*

Repetición	Cn obtenida (mg/L)	Cn obtenida Promedio (mg/L)	DRS%	Criterio de aceptación DSR%	Relación d de Horwitz (HorRat)	Criterio de aceptación HorRat
1	116,19	116,19	1,71	≤ 2%	0,22	≤ 2
2	120,26					
3	117,68					
4	116,74					
5	116,97					
6	116,10					
7	116,06					
8	114,65					
9	113,39					
10	113,84					

Repetición	Cn obtenida (mg/L)	Cn obtenida Promedio (mg/L)	DSR%	Criterio de aceptación DSR%	Relación d de Horwitz (HorRat)	Criterio de aceptación HorRat
1	308,71	309,24	0,23	≤ 2%	0,03	≤ 2
2	309,71					
3	308,71					
4	310,87					
5	308,23					
6	309,03					
7	309,58					
8	309,39					
9	309,16					
10	308,97					
1	503,68	505,35	0,23	≤ 2%	0,04	≤ 2
2	506,90					
3	503,90					
4	505,71					
5	505,87					
6	507,00					
7	504,10					
8	504,84					
9	505,97					
10	505,48					

Para la precisión intermedia, se realizaron las mediciones en dos días diferentes y se mantiene constante el analista, equipo y laboratorio. En el Cuadro 4 se muestran los valores y el promedio

de las tres concentraciones (baja, media y alta), la desviación estándar relativa, la relación de Horwitz y los criterios de aceptación para DSR% (Ministerio de Salud, s.f) y para HorRaT de ≤ 2 (FDA, 2019).

**Cuadro 4.**  
*Resultado de la precisión intermedia del método de sacarosa.*

Repetición	Día 1 Cn obtenida (mg/L)	Día 2 Cn obtenida (mg/L)	Cn obtenida (mg/L) Promedio	DSR%	Criterio de aceptación DSR%	Relación d de Horwitz (HorRat)	Criterio de aceptación para HorRat
1	116,97	112,00	113,33	1,92	≤ 2%	0,24	≤ 2
2	116,10	111,73					
3	116,06	110,80					
4	114,65	111,80					
5	113,39	111,60					
6	113,84	111,00					
1	308,23	303,39	306,24	0,97	≤ 2%	0,14	≤ 2
2	309,03	303,45					
3	309,58	303,71					
4	309,39	303,26					
5	309,16	302,90					
6	308,97	303,77					
1	505,87	504,74	505,80	0,18	≤ 2%	0,03	≤ 2
2	507,00	505,52					
3	504,10	505,94					
4	504,84	506,32					
5	505,97	507,29					
6	505,48	506,52					

En relación con la veracidad, en el Cuadro 5, se puede observar la concentración teórica, la recuperada y el % de recuperación, se estableció que el criterio

de aceptación para % de recuperación debe de encontrarse entre 90%-107% (FDA, 2019).

**Cuadro 5.**  
*Resultado para la veracidad del método de sacarosa.*

Muestra	Cn teórica (mg/L)	Cn Recuperada (mg/L)	Cn Recuperada promedio (mg/L)	% Recuperación	% Recuperación Promedio	Criterio de aceptación %Recuperación
1	100,61	97,14	96,68	96,54	96,09	90%-107%
2		96,17		95,58		
3		96,74		96,15		
1	201,23	195,50	192,47	97,15	95,65	
2		193,84		96,33		
3		188,07		93,46		
1	301,84	288,97	292,91	95,74	97,04	
2		292,70		96,97		
3		297,07		98,42		

## V. Discusión

En lo que respecta al denominado método 1 en el Cuadro 1, la simetría de los picos cromatográficos no fue la deseada, y al realizar la inyección de blancos (sin analito) se obtuvo una señal que aparecía al mismo tiempo de retención de la sacarosa, por lo cual el método no es adecuado para la determinación de sacarosa, bajo las condiciones sometidas a prueba.

Al implementar método 2, se obtuvieron resultados consistentes y atribuibles a la presencia de sacarosa, luego de realizar lecturas de blancos se confirmó que la señal generada corresponde y se comporta de manera proporcional a la concentración de sacarosa inyectada. Sin embargo, el pico generado muestra una considerable asimetría por una cola que se extiende durante varios minutos, constituyendo un inconveniente a la hora de intentar determinar con exactitud el área de la señal generada.

Por su parte, las pruebas realizadas con método 3 mostraron un tiempo de retención y simetría de área satisfactoria para los patrones de sacarosa. Del mismo modo, se realizaron lecturas de blanco para confirmar la identidad de la señal generada y

poder atribuir esta a la presencia de sacarosa. Sin embargo, la estabilidad de la señal no era la deseada a fin de tener un método en óptimas condiciones analíticas y se obtenía una señal negativa posterior a la sacarosa; por lo cual se siguieron realizando ajustes, en esta ocasión se redujo el acetonitrilo, en la fase móvil hasta probar y dejar 100% agua.

Ya en el denominado método 4 en este estudio, las condiciones fueron óptimas para el fin que se busca, teniendo buena simetría de pico (coeficiente de simetría cercano a 1), estabilidad en la línea base, ausencia de señal negativa pos-sacarosa, muy buen tiempo de retención e inclusive mayor sensibilidad para el análisis de sacarosa logrando establecer el ámbito dinámico lineal de 100 a 600 mg/L.

Así las cosas, las condiciones de la metodología analítica quedan establecidas, según la información incluida en el Cuadro 2, y se procedió a validar dicha metodología sin mayores cambios aparentes.

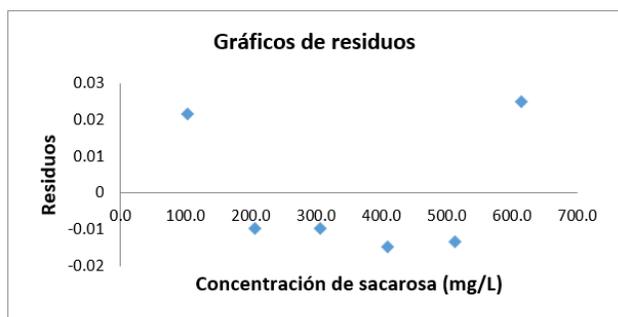
Con respecto a la validación del método y en particular el parámetro de linealidad, primero se analiza el valor del coeficiente de correlación al cuadrado ( $R^2$ ) de 0,9989 de la superposición de las

tres curvas de calibración (ver Figura 4), este valor es mayor 0,995 esto concuerda con el criterio de aceptación de la guía del Ministerio de Salud que menciona que  $R^2$  debe ser mayor 0,995 (Ministerio de Salud, s.f), por consiguiente, la línea de regresión puede explicar el 99,89 % de la variación en el área (Rodríguez et al., 2014) y existe una correlación significativa.

Además, en la Figura 5 se muestra el análisis de residuos de regresión con ajuste lineal y se puede observar que los residuos tienden a disminuir y después a aumentar. Sin embargo, no se presenta tendencia sistemática en los residuos por lo cual el comportamiento se determina aleatorio como se espera en esta prueba.

**Figura 5.**

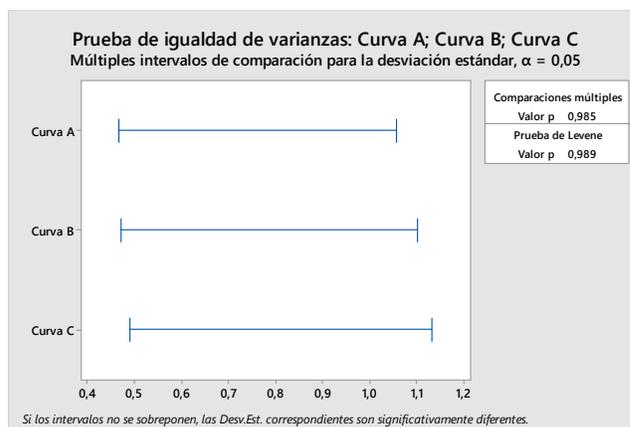
*Gráfico de distribución de residuos para la linealidad.*



También, se realiza un análisis de homocedasticidad entre las curvas de calibración para analizar la varianza de las curvas, por medio de la prueba Levene en Minitab, y se obtuvo un  $p = 0,989$ . Este valor es mayor que 0,05 (para un nivel de confianza de 95%), lo cual representa que no hay diferencia significativa entre las varianzas de las tres curvas de calibración o son estadísticamente iguales (Bernal-Morell, 2014). Esto cumple con el criterio de aceptación de varianza constante de la guía del Ministerio de Salud (s.f). Además, en la Figura 6, se puede observar que los intervalos se superponen, lo cual confirma la homogeneidad de las varianzas entre las curvas de calibración.

**Figura 6.**

*Análisis de homocedasticidad por medio de la prueba Levene.*



Por lo anterior, la regresión del ajuste lineal para linealidad del método muestra que es adecuado para la determinación de sacarosa.

Para el parámetro de precisión evaluado por repetibilidad (ver Cuadro 3), se determinó que las desviaciones estándares relativas de las tres concentraciones son menores 2% (Ministerio de Salud, s.f), además, la relación de Horwitz (HorRat) de las tres concentraciones son menores a 2 (FDA, 2019), lo cual cumple con el criterio de aceptación de DSR% para repetibilidad y de la relación de Horwitz (HorRat), evidenciando que la repetibilidad es adecuada.

Con respecto a la presión intermedia (ver Cuadro 4), se obtuvo que las desviaciones estándares relativas de las tres concentraciones son menores al 2% (Ministerio de Salud, s.f), cumpliendo con el criterio de aceptabilidad de DSR%, también, la relación de Horwitz (HorRat) de las tres concentraciones son menores a 2 (FDA, 2019), por lo tanto, la precisión intermedia del método es adecuada, aunque se realice el análisis en diferentes días y se mantengan las otras variables sin alteración.

En relación con la veracidad, en el Cuadro 5 se puede observar que el porcentaje de recuperación de las tres concentraciones se encuentra entre 90% y 107% (FDA, 2019), lo cual cumple con el criterio de aceptación. Esto significa que los resultados obtenidos son cercanos de forma estadística al valor teórico. Por lo anterior, al ser el método veraz y preciso, demuestra que el método es exacto (Duffau et al, 2010).

## VI. Conclusiones

Las metodologías HPLC probadas con la columna Amino y la columna Carbohydrate  $\text{Ca}^{2+}$  no mostraron resultados adecuados para la cuantificación de sacarosa con las condiciones implementadas en el Laboratorio específico.

La columna Phenyl junto con una fase móvil compuesta por agua tipo 1 constituyen las condiciones cromatográficas más favorables alcanzadas durante el desarrollo del método, para la cuantificación de sacarosa por HPLC con detección de índice de refracción.

La validación del método analítico respalda las condiciones obtenidas para la linealidad, repetibilidad, precisión intermedia y la exactitud del método por medio de la veracidad; por lo cual, es apto para implementarlo en el análisis confiable de sacarosa en bebidas comerciales bajo las condiciones validadas en esta investigación.

## VII. Referencias bibliográficas

- Arenas de Moreno, L., Marín, M., Castro de Rincón, C., & Sandoval, L. (2012). *Determinación por HPLC de los azúcares en los frutos de guayaba (Psidium guajava L.) de una plantación comercial del Municipio Mara*. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, 12(4), 467-483. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26042>
- Figuerola, L., Hernaez, L. & Bello, M. (2013). *Validación de un método de determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por cromatografía líquida de alta performance*. SNS. Publicación Periódica Científico-Tecnológica. Vol. 1 & 2, 27-35. <https://recursos.analitek.com/hubfs/53-210-1-PB.pdf>
- Bernal, E. (2014). *Bioestadística Básica para Investigadores con SPSS*. Bubok Publishing. <https://bit.ly/2TBHIri>
- Brunetto-de-Galignani, M., Orozco-Contreras, W.; Delgado, Y., Clavijo-, S., Galignani-de-Bernardi, M., Ayala C., & Zambrano, A. (2014). Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacaoos criollos venezolanos. Revista Cubana de Química. Vol. 26. Núm. 3. pp. 181-201 Universidad de Oriente Santiago de Cuba, Cuba. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212014000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212014000300003)
- Duarte, D., Narváez, C., Restrepo, L., Kushalappa, A., & Mosquera, T. (2015). Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of Solanum tuberosum Group Phureja. Journal of Chromatography B, 975, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.039>
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., & Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Instituto de Salud Pública, Chile. <https://bit.ly/3oxhtAi>

- Eurolab, P., Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- Filip, M., Vlassa, M., Coman, V., & Halmagyi, A. (2016). Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. *Food Chemistry*, 199, 653-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.060>
- Foitzich, A. (2013). *Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR*. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/faf659d/doc/faf659d.pdf>
- González, M., Hermida, M., Sueiro, S., Serrano, M., & Mateos, G.. (2009). Estudio comparativo del contenido en azúcares (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) de la harina de soja según procedencia. *Información Técnica Económica Agraria*. [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2009/comunicaciones/2009\\_NyA\\_01.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2009/comunicaciones/2009_NyA_01.pdf)
- Herrera, A. (2011). Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio Pichichí S.A. Universidad Tecnológica de Pereira. <https://core.ac.uk/download/pdf/71396367.pdf>
- Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L., & Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*, 145, 784-788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.135>
- Ministerio de Salud. (s.f). *GUIA DE VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS*. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php#>
- Murillo, C., Villamizar, A., Pico, S., Jaime, J., & López, L. (2017). *Implementación de un método analítico por cromatografía líquida para evaluar la calidad en mieles del nororiente colombiano*. Universidad Industrial de Santander. 25 (40), 32-42. <https://www.semanticscholar.org/paper/Implementaci%C3%B3n-de-un-m%C3%A9todo-anal%C3%ADtico-por-l%C3%ADquida-Murillo-Villamizar/688e6b048d223e80cc76a6f93424139892e9f3cd>
- Olivares, K. (2018, octubre 25). 75% del consumo de azúcar proviene de bebidas procesadas. *aDiarioCR*. <https://adiariocr.com/salud/75-del-consumo-de-azucar-proviene-de-bebidas-procesadas/>
- Rivera, M., Herrera, C., & Barquero, M. (2005). Caracterización fisicoquímica de los siropes comerciales preparados a base de sacarosa. *Revista Tecnología En Marcha*, 18(4), pág. 48. [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/11](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/11)
- Rubio, M., Bernal, M., Ramírez, L., García, R., & Durán-de-Bazúa, C. (2004). Montaje de técnicas analíticas para medir glucosa, fructosa y sacarosa por cromatografía de líquidos en jugos de caña de azúcar [Informe Final de Proyecto]. Universidad Autónoma de México. [http://cmas.siu.buap.mx/portal\\_pprd/work/sites/redica/resources/LocalContent/127/2/Informe%20Final%20de%20Proyecto%20MRH.pdf](http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/redica/resources/LocalContent/127/2/Informe%20Final%20de%20Proyecto%20MRH.pdf)
- U.S. Food and Drug Administration [FDA]. (2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program* (3a ed.). <https://www.fda.gov/media/81810/download>

Vargas, A. (1999). Recomendación de los métodos analíticos para el establecimiento de un reglamento técnico en la caracterización de los juegos de naranja (Proyecto de graduación). Universidad de Costa Rica; San José, Costa Rica. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/15772>

Velasco, F. (2015) *Analizadores de proceso en línea: Introducción a sus técnicas analíticas*. Ediciones Díaz de Santos. [https://books.google.co.cr/books?id=skluDwAAQBAJ&printsec=front-cover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=skluDwAAQBAJ&printsec=front-cover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Voet, D. & Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. [https://books.google.co.cr/books?id=r5bedH\\_aST0C&pg=PA152&d-q=ventajas+HPLC&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi7zrashN7kAhURrVkkHRSJB-JkQ6AEIjzAA#v=onepage&q=ventajas%20](https://books.google.co.cr/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA152&d-q=ventajas+HPLC&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi7zrashN7kAhURrVkkHRSJB-JkQ6AEIjzAA#v=onepage&q=ventajas%20)