

ANÁLISIS DE LA ROBUSTEZ EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA EN LECHE DE CABRA

Schettino Beatriz*, J. Pérez*, R. Gutiérrez*, S. Vega y León*, R. Faure**, A. Escobar**

*Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco (UAM-X) Laboratorio de Análisis Instrumental.
Correo electrónico: svega@correo.xoc.uam.mx; **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Departamento de Química-Farmacología.

RESUMEN: La determinación de los perfiles de ácidos grasos en muestra de leche por cromatografía gaseosa incluye diversos pasos como son: extracción, esterificación, separación, identificación y cuantificación, cada uno de ellos deben ser optimizados para alcanzar resultados exactos y precisos. La robustez es uno de los parámetros que se exigen durante el desarrollo del protocolo de validación e indica la susceptibilidad del método analítico a variaciones menores razonables y brinda una indicación de su confiabilidad. Se evaluó el efecto de siete variables en ocho experimentos acorde con lo establecido en el manual estadístico de la AOAC. Los factores seleccionados fueron: vol. del metóxido de sodio ($100 \pm 10 \mu\text{L}$); cloruro de calcio ($0.2 \pm 0.5\text{g}$) y tiempo de reacción ($60 \pm 20\text{min}$) en la etapa de derivatización; en las condiciones instrumentales y operacionales se consideraron: la temperatura inicial del horno ($50 \pm 2^\circ\text{C}$), la del inyector ($250 \pm 5^\circ\text{C}$) y la del detector ($260 \pm 5^\circ\text{C}$); y dos operarios. Los resultados del análisis sobre los ácidos grasos de cadena corta, media, larga, C16:0 y C18:1 de la leche de cabra permitieron determinar la influencia de cada parámetro. Los efectos sobre la media mostraron que ninguno de los cambios realizados sobre las siete variables estudiados afectó los resultados al ser éstos inferiores al límite de aceptación exigido ($\sqrt{2} \times \text{DE}$), por lo que se puede afirmar que el método resultó robusto ante los cambios operacionales efectuados (Palabras claves: robustez; ácidos grasos; leche de cabra)

ANALYSIS OF ROBUSTNESS IN THE DETERMINATION OF FATTY ACIDS BY GAS CHROMATOGRAPHY ON GOAT MILK

ABSTRACT: The determination of fatty acid profiles in milk sample by gas chromatography includes various steps such as: extraction, esterification, separation, identification and quantification, each one must be optimized to achieve accurate and precise results. Robustness is one of the parameters that are required for the development of the validation protocol and indicates the sensitivity of the analytical method to minor variations and provides a reasonable indication of their reliability. The effect of seven variables in eight experiments were evaluated in accordance with the provisions Statistical Manual of the AOAC, the selected factors were: Volume of sodium methoxide ($100 \pm 10 \text{mL}$); calcium chloride ($0.2 \pm 0.5\text{g}$) and time ($60 \pm 20 \text{min}$) in the derivatization procedure; injector temperature ($250 \pm 5^\circ\text{C}$); detector temperature ($260 \pm 5^\circ\text{C}$); temperature initial in the oven ($50 \pm 2^\circ\text{C}$) and two operators. The results of the analysis on short-chain fatty acids, medium, long, C16:0 and C18:1 in goat milk allowed to determine the influence of each parameter. The effects on the means showed that none of the changes made on the seven parameters studied to affected the results to be below those required acceptance limit ($\sqrt{2} \times \text{SD}$), so we can say that the method was robust to changes made operational.

(Key words: robustness; fatty acid; goat milk)

INTRODUCCIÓN

La leche de cabra ha sido identificada como una alternativa para aquellas personas que muestran sensibilidad o alergia a la leche bovina. La calidad nutricional de la leche de cabra, radica en su alto contenido de ácidos grasos C6 a C10, a la carencia de aglutinina y al alto porcentaje de ácidos grasos esterificados de cadena corta y media sobre el carbono 3 del esqueleto de la glicerina (5).

La determinación de los perfiles de ácidos grasos en muestra de leche por cromatografía gaseosa incluye diversos pasos como son: extracción, esterificación, separación, identificación y cuantificación, cada uno de ellos deben ser optimizados para alcanzar resultados exactos y precisos. Para lograr estos fines, diferentes organizaciones internacionales como la FDA, ICH, AOAC y la Unión Europea establecen guías generales que abordan los criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos analíticos (2, 4, 8). La robustez es uno de los parámetros que se exigen durante el desarrollo del protocolo de validación e indica la susceptibilidad del método analítico a variaciones menores razonables y brinda una indicación de su confiabilidad.

La determinación de los perfiles de ácidos grasos en la muestra de leche se puede expresar en masa o porcentaje. Cuando se expresa en masa se requiere de un estándar interno para la determinación de los factores de corrección, mientras la expresión en porcentaje se fundamenta en el cálculo a través de las áreas normalizándola en función del peso. Independiente del método de cálculo la determinación de ácidos grasos en muestra de leche presenta una alta variabilidad debido a múltiples factores (7, 16), donde el coeficiente de variación puede oscilar entre un 25 al 60%(15) de aquí la importancia de poder contar con métodos previamente validados.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la robustez del procedimiento en la determinación de los perfiles de ácido grasos en muestra de leche empleando la cromatografía gaseosa con detección de llama y columna capilar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y purificación de grasa:

Se colocó 250mL de una muestra de leche en un matraz volumétrico de 500mL y se adicionó 250mL de una solución detergente (50g de hexametáfosfato de sodio y 24mL de Tritón X-100 disueltos en un litro de agua). El matraz se agitó vigorosamente y se colocó

en un baño de maría a 90°C invirtiendo cada 10 minutos el matraz, hasta lograr una clara separación de la materia grasa.

La grasa recuperada de las muestras de leche cruda se filtró a 50°C a través de papel filtro en presencia de sulfato de sodio anhidro. Las muestras se conservaron en tubos de vidrio almacenados a -20°C hasta el inicio del análisis.

Análisis de ácidos grasos:

Se pesan 50mg de grasa en frascos de 2mL con tapa hermética y se disuelven en 0.90mL de éter de petróleo. Posteriormente se agregó 0.10mL de una solución de metóxido de sodio/metanol 0.5N y 250 mg de cloruro de calcio, se tapo inmediatamente y se agitó en un vortex durante 5 segundos. Se dejó en reposo por 60 minutos se tomó 0.8 µL de la parte superior clara para aplicar al cromatógrafo gas-liquido.

Análisis cromatográfico para ácidos grasos:

Los ésteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo de gases, Perkin Elmer Autosystem 9000 con detector de ionización de flama (FID) empleando el software TOTALCHROM para la integración de los cromatogramas (versión 6.2). Se utilizó una columna polar RESTEK Stabilwax (PEG) de 30m x 0,53 mm (d.i.) x 0.5 µm de espesor de película. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del detector e inyector 260°C y 250°C respectivamente, con el siguiente programa de temperaturas 50°C (11 min.) a 10°C/min. hasta 110°C (10 min.) a 4°C/min, hasta 215°C (3 min.) 8°C/min hasta 240 (10 min). El gas acarreador fue helio a presión de 4 psi y el volumen inyección fue de 0.8µL. Los porcentajes de las área de los picos de los ácidos grasos se normalizaron a porcentaje en peso.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos metilados se realizó a través de un patrón comercial de la Supelco (No47885-U) que contiene 37 ácidos grasos determinando la suma total del área de todos los compuestos identificado en la muestra de leche y posteriormente se calculó el porcentaje individual de cada componente identificado.

Análisis de precisión y robustez:

La precisión

Se realizó a partir del análisis de 10 repeticiones de una muestra de grasa obtenida de un pool de leche de cabra procedente de la granja Apaseo el Grande, Guanajuato, México

La robustez

Se procedió según el procedimiento de Youden y Steiner (13) evaluando el efecto de siete variables en

TABLA 1. Factores y condiciones investigada durante el estudio de robustez./ *Factors and conditions investigated during the robustness study*

No de variable	letra	Descripción	valor nominal	Valor de la letra mayúscula	Valor de la letra minúscula
1	A/a	Vol del metóxido de sodio en la derivatización	100 uL	110 uL	90 uL
2	B/b	Cloruro de calcio en la derivatización	0.2g	0,25 g	0,15 g
3	C/c	Tiempo en la derivatización min	60 min	40 min	80 min
4	D/d	Temperatura de inyector °C	T=250°C	255 °C	245 °C
5	E/e	Temperatura del Detector °C	T=260°C	265 °C	255 °C
6	F/f	Temperatura del horno °C	T= 50°C	52 °C	48°C
7	G/g	Operario		A	B

TABLA 2. Diseño experimental para 7 variables./ *Experimental design for 7 variables*

No. de variable	No. Experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	A	A	A	A	a	a	a	a
2	B	B	b	b	B	B	b	b
3	C	c	C	c	C	c	C	c
4	D	D	d	d	d	d	D	D
5	E	e	E	e	e	E	e	E
6	F	f	f	F	F	f	f	F
7	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

ocho experimentos, los factores seleccionados y los niveles evaluados se muestran en la Tabla 1 y el diseño empleado en la Tabla 2.

A partir de los resultados se calculó la diferencia de la media para cada parámetro de forma individual, que contienen la variable en su valor más alto (mayúsculas) y aquellas que corresponden con el valor más bajo (minúsculas) y se comparó con el producto de la desviación estándar del estudio de precisión y la raíz de 2. Si la diferencia de la media es menor que el valor del producto no hay diferencia significativa siendo robusto la variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el perfil cromatográfico de ácidos grasos de la leche de cabra donde predominan los ácidos grasos de C4 a C22. En la Tabla 3 y 4 se muestran los porcentajes de los diferentes ácidos grasos y un resumen de la sumatoria de los ácidos grasos (cadena corta, media y larga conjuntamente con los ácidos palmítico, oléico, cáprico y mirístico)

respectivamente. Estos resultados evidencian cierta correspondencia con los reportados en España durante la validación de un método de extracción de ácidos grasos en muestra de leche de cabra donde los ácidos palmítico y oleico son los mayoritarios con un porcentaje de 25.5 y 20.2 respectivamente, no ocurriendo así con los ácidos grasos de cadena media y larga donde se observan variaciones por encima del 10% (10). En el estado de Paraná en Brasil, en leche de vaca también se reportó que los ácidos palmítico, esteárico y mirístico aparecen con los mayores porcentajes (14), estas diferencias se debe principalmente a las condiciones de explotación y clima a que estaban sometidas los animales, ya que se ha corroborado que ambos factores son los de mayor influencia en la variación de la composición de los ácidos grasos en la leche (6,7).

En el estudio de precisión se empleó la variante de seis determinaciones al 100% de la concentración (3) y se observó un coeficiente de variación inferior al 10% cuando analizamos la sumatorias de los ácidos grasos de cadena corta media y larga, no así cuando se ana-

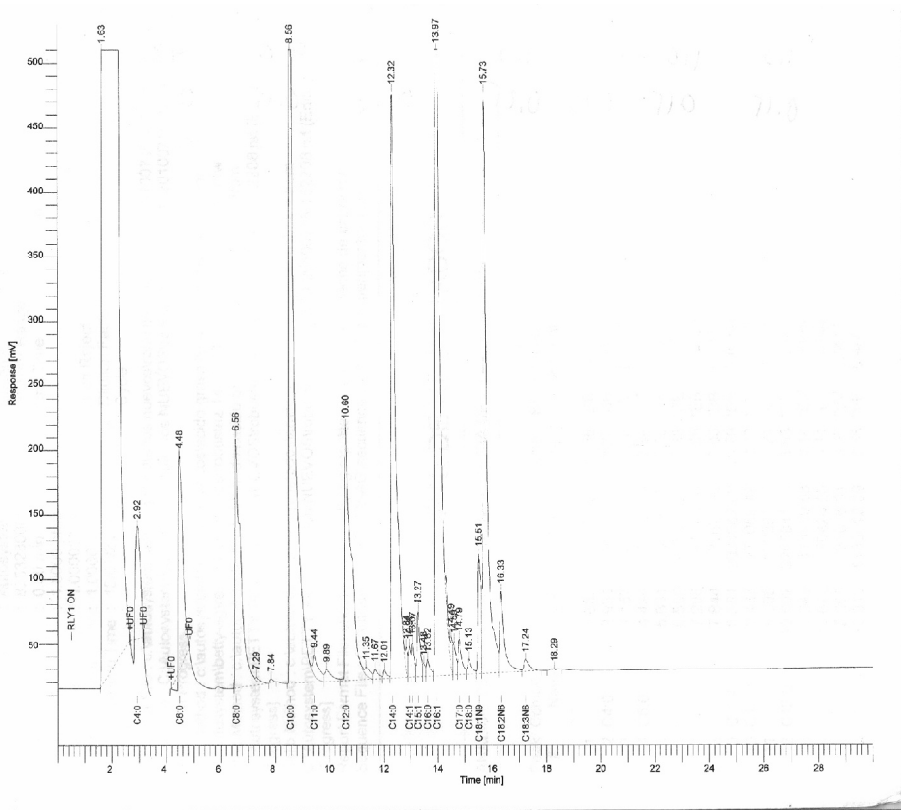


FIGURA 1. Perfil cromatográfico de ácidos grasos de la leche de cabra/ *Chromatographic profile of fatty acids of goat milk.*

TABLA 3. Valores medios y desviación estándar del porcentaje de los ácidos grasos presente en muestra de leche de cabra determinado por cromatografía gaseosa./ *Mean and standard deviation of percentage of fatty acids present in goat milk sample determined by gas chromatography*

	PROMEDIO	DS	CV %
C4	2.260853	0.29956	13.24985
C6	3.304419	0.325679	9.855874
C8	3.620639	0.275846	7.618714
C10	13.58412	1.004437	7.394198
C11	0.228976	0.034543	15.08569
C12	5.13516	0.98817	19.24322
C14	13.09435	0.579071	4.422296
C14:1	0.451059	0.044132	9.784045
C15	0.867766	0.112009	12.90777
C16	29.1734	1.001334	3.432354
C16:1	0.697841	0.040707	5.833326
C18	6.041478	0.265771	4.39911
C18:1N9C	18.43194	0.966887	5.245713
C18:2N6c	2.531737	0.265665	10.4934
C18:3N3	0.37511	0.05458	14.5504

lizan de manera individual donde la variación puede ser hasta del 20%. Un estudio en muestra de leche bovino reportó una precisión hasta del 10% para cada uno de los ácidos grasos (14); durante la validación de un

TABLA 4. Resumen de la sumatoria de los ácidos grasos de cadena corta, media, larga y compuestos mayoritarios presente en la muestra de leche de cabra./ *Summary of the sum of short-chain fatty acids, medium, long, main compounds present in the sample of goat milk*

	Promedio	DS	CV %
AGCC	22.38716	1.417679	6.332552
AGCM	49.64855	1.363547	2.746399
AGCL	27.38026	1.463121	5.343706
C16	29.1734	1.001334	3.432354
C18:1	18.43194	0.966887	5.245713
C10	13.58412	1.004437	7.394198
C14	13.09435	0.579071	4.422296

Nota: AGCC Acido grasso de cadena corta (C4-C10);
AGCM Acido grasso de cadena media (C11-C16);
AGCL Acido grassa de cadena larga (C17-18:3n3)

método de extracción de ácidos grasos en leche de cabra se reportó una repetibilidad inferior al 3%, teniendo la mayor variabilidad en los ácidos grasos de cadena corta (C4:0, C6:0, C8:0) (10) otro estudio donde se evalúa la presencia de grasa láctea en produc-

TABLA 5. Análisis estadístico del efecto en cada indicador del perfil de ácido graso de la leche de cabra./ *Statistical analysis of the effect on each indicator in the fatty acid profile of goat milk*

No exp	Variable	AGCC	AGCM	AGCL	C16	C18.1
Exp1	Vol del metóxido de sodio en la derivatización	0,22	0,57	0,51	0,04	0,73
Exp2	Cloruro de calcio en la derivatización	0,87	0,29	1,52	0,53	1,51
Exp3	Tiempo en la derivatización min	0,25	0,41	0,14	0,58	0,22
Exp4	Temperatura de inyector °C	1,22	1,00	1,70	1,19	1,22
Exp5	Temperatura del detector °C	0,50	0,18	0,68	0,13	0,31
Exp6	Temperatura del horno °C	0,48	0,07	0,74	0,13	0,44
Exp7	Operario	0,13	0,31	0,03	0,33	0,14
	t crítico al 95%	3.182446				
	Tcal < T crit	efecto NS	efecto NS	efecto NS	efecto NS	efecto NS

NS: no significativo

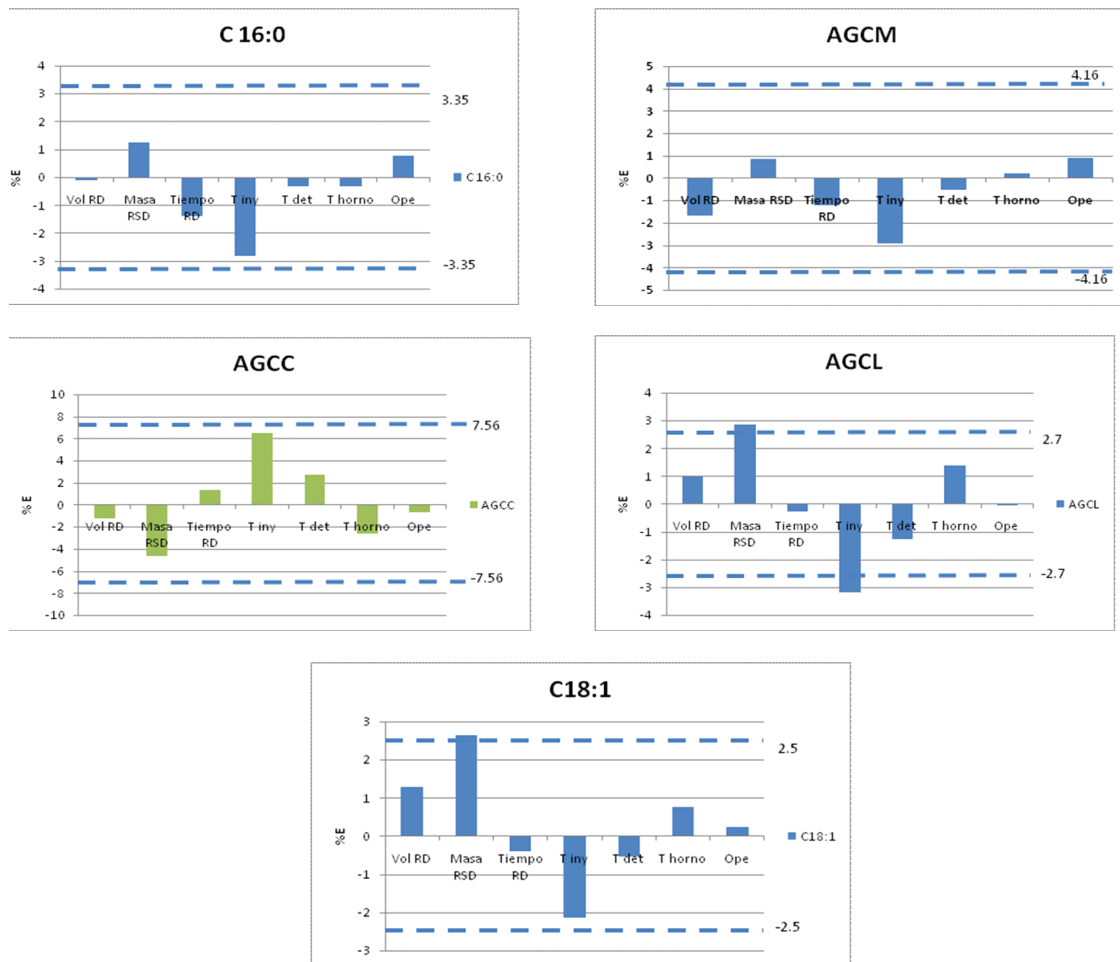


FIGURA 2. Variación del porcentaje de error de cada variable en correspondencia con el indicador del perfil de ácido graso evaluado./ *Variation of the error in each variable in correspondence with the indicator of fatty acid profile assessed.*

tos alimenticios reportan una variabilidad para C4:0 hasta del 10%, asumiendo la propia variabilidad natural de C4:0 en la grasa láctea que oscila entre 3.07-3.75g/100g de grasa (11). La alta variabilidad encontrada en los ácidos grasos de cadena corta puede ser atribuida a la gran volatilidad de los mismos donde pueden existir pérdidas durante el proceso de esterificación y estas pérdidas son calculadas alrededor del 20% (9). En nuestro caso la precisión está entre los límites establecidos por otros autores.

La evaluación de la robustez es un parámetro de obligatorio cumplimiento durante la validación para cualquiera de los métodos de ensayos (identidad; determinación de impurezas; contenido y actividad biológica o potencia) (3). La robustez puede medirse durante la validación o previa a la misma midiendo un factor o varios factores, en el último caso varios parámetros se introduce a la vez para garantizar la estimación del efecto global de cada uno, en el que el método más empleado es de la matriz establecido por de Youden y Steiner (13). Un estudio realizado para la determinación de los ácidos grasos alifáticos (C24:0 a C36:0) presente en un producto farmacéutico (D003) se evaluaron los diferentes parámetros: temperatura del inyector y detector; velocidad de flujo; temperatura inicial y final del horno; programa de temperatura y volumen de inyección todos relacionado con el instrumento (1). En nuestro caso se incluyeron además otros parámetros que pueden constituir una fuente de variación crítica como es lo relativo al procesamiento de derivatización de la muestra (Tabla 1), que han sido analizados de forma puntual en la determinación de ácidos grasos en muestra de leche y formulas para infantes (12,14).

En la Tabla 5 se muestra la variación del efecto en cada experimento donde la *t* calculada fue menor que la *T* crítica al 95% en todos los indicadores analizados del perfil de ácidos grasos, no presentándose efectos significativos que denotara alguna variable como crítica.

En la Figura 2 se muestran los porcentajes de error en la variación para cada uno de los experimentos con los diferentes indicadores evaluados, observándose que las variables de Temperatura del inyector y la masa de reactivo secante durante la derivatización constituyeron los parámetros de mayor variabilidad a pesar del método ser robusto en su integralidad, por ser el error de la diferencia de la concentración con respecto a la media menor que el error de la reproducibilidad en cada indicador.

REFERENCIAS

1. Antolín E, Marrero Delange D, González Canavaciolo V, Tejeda Díaz Y, Sierra Pérez R, Cora Medina M. Validation of a gas chromatographic method for determining fatty acids that compose D003 in 10 mg film-coated tablets. *II Farmaco*. 2004;59(7):543-547.
2. AOAC. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002.
3. CECMED. Validación de Metodos Analíticos. REGULACIÓN No 41-2007 CUBA.
4. CEE. Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002;2002/657/CE.
5. Chilliard Y, Rouel J, Ferlay A, Bernard L, Gaborit P, Raynal-Ljutovac K, et al. Optimising goat's milk and cheese fatty acid composition. en: *Improving the Fat Content of Foods* C Williams, and J Buttriss, ed Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK. 2006:123-145.
6. Collomb M, Bisig W, Butikofer U, Sieber R, Bregy M, Etter L. Seasonal variation in the fatty acid composition of milk supplied to dairies in the mountain regions of Switzerland. *Dairy Sci & Technol*. 2008;88(6):631-647.
7. de la Fuente LF, Barbosa E, Carriedo JA, Gonzalo C, Arenas R, Fresno JM, et al. Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *J. Dairy Sci*. 2009;92(8):3791-3799.
8. EMEA. Note for guidance on Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology (CPMP/ICH/381/95). fuente: <http://www.emea.eu.int>. 2006.
9. Feng S, Lock AL, Garnsworthy PC. Technical note: a rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci*. 2004;87(11):3785-3788.
10. Luna P, Juárez M, De la Fuente M. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J Dairy Sci*. 2005;88(10):3377.

11. Molquentin J, Precht D. Validation of a gas-chromatographic method for the determination of milk fat contents in mixed fats by butyric acid analysis. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2000;102(3):194-201.
12. Oveisi M, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Jannat B, Sobhani A. Quantitative determination of fatty acids in infant formula by gas chromatography without derivatization. *Acta Medica Iranica*. 2006;44(4).
13. Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Cap 12: Validación de métodos. Introducción a la HPLC Aplicación y práctica Edit. Artes Gráficas Farro S.A., Argentina, 1992. p. 301-29.
14. Simionato J, Garcia J, Santos G, Oliveira C, Visentainer J, Souza N. Validation of the determination of fatty acids in milk by gas chromatography. *J Braz Chem Soc*. 2010;21:520-524.
15. Soyeurt H, McParland S, Berry DP, Wall E, Gengler N, Dehareng F, et al. Improvement and validation of milk fatty acid predictions using mid-infrared spectrometry. Proc British Society of Animal Science Annual Conference, Belfast, United Kingdom. 2010; fuente <http://www.robustmilk.eu/Publication/2010-BSAS-Soyeurt1b.pdf>.
16. Talpur FN, Bhangar MI, Khooharo AA, Memon GZ. Seasonal variation in fatty acid composition of milk from ruminants reared under the traditional feeding system of Sindh, Pakistan. *Livestock Sci*. . 2008;118(1/2):166-172.

(Recibido 30-12-10; Aceptado 20-04-11)