

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINAR
LA CUANTIFICACIÓN DE TANINOS EN LA PEPA DE PALTA (*Persea
americana* Miller var. *hass*) POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN”**

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTOR EN INGENIERIA QUIMICA**

AUTOR : VÍCTOR AUGUSTO CASTRO ZVALETA
Maestro en Química

ASESOR: Dr. NOÉ ILDEFONSO COSTILLA SÁNCHEZ

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2014

DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme en cada paso
que he dado en mi vida.*

*A mis padres especialmente a
mi madre, que desde el cielo
siempre me ha cuidado y quiso
lo mejor para mí.*

*A mi esposa y mis hijas por
apoyarme en cada momento de
mi vida.*

Víctor Augusto Castro Zavaleta

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Trujillo por abrirme las puertas y brindarme el apoyo incondicional en la realización del presente trabajo.

A mi asesor Dr. Noé Ildelfonso Costilla Sánchez, jefe de laboratorio de métodos instrumentales de la Facultad de Ingeniería Química, por darme su apoyo y brindarme la información pertinente para el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Manuel Vera Herrera, Decano de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo por el apoyo brindado.

Mi gratitud y reconocimiento por siempre.

El Autor

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 CLAVES: 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.

WORDS KEYS: Validation, Tannins (Catechin), HPLC.

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN..... | I |
| ABSTRACT..... | II |
| CAPITULO I: INTRODUCCIÓN | 01 |
| CAPITULO II. MARCO TEORICO..... | 10 |
| CAPITULO III. METODOLOGIA EMPLEADA..... | 20 |
| CAPITULO IV. DESARROLLO DEL ANALISIS..... | 25 |
| CAPITULO V. CONCLUSIONES Y DISCUCIONES | 29 |
| CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| ANEXOS | |

ANEXOS

LISTA DE TABLAS:

- Tabla 1: Cromatografías de Linealidad de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de los Taninos (catequina) por HPLC.
- Tabla 2: Cromatografías de Precisión del método de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ en la determinación de Taninos (Catequina) por HPLC.
- Tabla 3: Cromatografías de la Exactitud del método de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ en la determinación de Taninos (Catequina) por HPLC.
- Tabla 4: Cromatografía de la muestra de pepa (tegumento) de palta (*Persea americana* Miller var. hass), en la determinación de Taninos (Catequina) por HPLC

LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1: Palta (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 2: Separación de la semilla (pepa) con el endocarpio PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 3: Semilla (pepa) con el Tegumento de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 4: Semilla (pepa) con el Tegumento secado a la temperatura ambiente de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 5: Separación del Tegumento con la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 6: Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass)
- Figura N° 7: Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), fraccionado.
- Figura N° 8: Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), pulverizada.

Figura N° 9: Pesado del Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass).

Figura N° 10: Muestra del Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), para el análisis por HPLC.

Figura N° 11: Muestra del Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), se colocó al ultrasonido para el análisis por HPLC.

Figura N° 12: Muestra del Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), se colocó (se filtró), hacia un vial para el análisis por HPLC.

Figura N° 13: Muestra del Tegumento de la Semilla (pepa) de la PALTA (*Persea americana* Miller Var. Hass), se analizó en HPLC.

Figura N° 14: Estándar de Taninos (Catequina) grado HPLC.

ANEXOS

CAPITULO I

Introducción

1.1 Realidad Problemática

En las últimas décadas los fitofármacos han ido ganando terreno dentro del arsenal terapéutico mundial, fundamentalmente por su escasa toxicidad, bajos costos y por utilizar tecnologías de bajos niveles de inversión e insumos. Lo cual a su vez ha incidido poderosamente 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 natural¹. Todo lo anterior da una medida de la importancia de los fitofármacos para los países del tercer mundo; por su parte en Cuba se le ha dado una importancia estratégica a los mismos 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).

El presente trabajo tiene como objetivo la validación de 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.

1.2 Estado del arte

Los taninos hidrolizables encuentran amplia aplicación debido a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para formar complejos solubles e insolubles con las proteínas. Por ello se emplea en la industria de alimentos, farmacéutica y en cervecería. En este último campo, por ejemplo, se usan como estabilizadores de la cerveza: en el producto que no ha sido recientemente preparado, las proteínas se combinan con los polifenoles para formar complejos que son responsables de la presencia de turbidez. Al agregar los taninos, el nivel de proteínas es disminuido a un valor apropiado y se aumenta así el tiempo de almacenamiento de la cerveza. En la industria farmacéutica, se emplean para contraatacar el efecto de los alcaloides y el envenenamiento por sales de metales, inactivándose éstos por precipitación. En la industria de alimentos se puede por ejemplo, remover impurezas proteínicas por precipitación con taninos; emplearlo en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando sus propiedades antisépticas y antioxidantes; así como en la clarificación del vino. Su aplicación en otros campos está orientada, por ejemplo, a la extracción de Pb, Fe, Ca, Ba, y Ra presentes en soluciones, por precipitación con gelatina y taninos; al efecto anticorrosivo en superficies de Fe, expuestas al medio ambiente; al empleo en la elaboración de tintas; como recubrimiento protector de zinc y aleaciones del mismo metal.

1.3 Caracterización y naturaleza del objeto de investigación

1.3.1 Clasificación taxonómica (Persea Americana Millar Var. Hass)

| Clasificación Taxonómica | |
|--------------------------|-------------------------|
| Reino | Vegetal |
| División | Spermatophyta |
| Clase | Dicotyledoneae |
| Subclase | Dipétala |
| Orden | Ranales |
| Familia | Lauraceae |
| Género | Persea |
| Especie | Persea americana Miller |
| Variedad | Has |
| Nombre común | Aguacate, Palto |

Fuente: Rafael Franciosi 2003

Elaboración: Solid Peru

1.3.2 Composición química de la palta (Persea Americana Millar Var. Hass)

| Composición química de la palta | Composición | Porcentaje |
|--|-----------------------|-------------------|
| | Agua | 70% |
| | Proteínas | 1,5% |
| | Lípidos | 22% |
| | Hidratos de Carbono | 6% |
| | Vitamina A | 40 µg/100 g |
| | Vitamina B1 | 0,09 mg/100 g |
| | Vitamina B2 | 0,12 mg/100 g |
| | Vitamina B6 | 0,5 mg/100 g |
| | Vitamina E(tocoferol) | 3,2 mg/100 g |
| | Vitamina C | 17 mg/100 g |
| | Potasio | 400 mg/100 g |

Fuente: Conafrut. 1997 y Nagalingam J.C. 1993

Elaboración: Equipo facilitador del Análisis Participativo de la Cadena Productiva de Palta en Luricocha y Huanta, 2005.

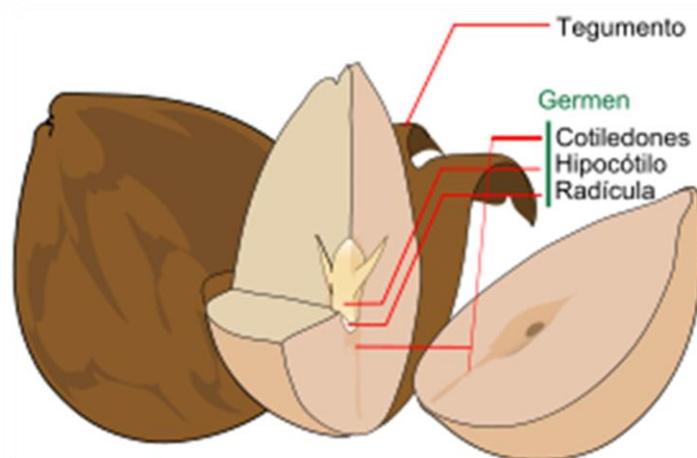
1.3.3 Composición química de la semilla de palta (Persea Americana Millar Var. Hass)

| Composición Química de la Semilla de palta | |
|--|--------|
| AGUA | 64.5 % |
| PROTEINA | 1.70 % |
| GRASA | 26.4 % |
| HIDRATOS DE CARBONO | 5.10 % |
| CALORIAS | 264 |

Humedad* natural

Fuente: Proyecto FODECYT 02 – 2006

1.3.4 Partes de una semilla de palta (Persea Americana Millar)



Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Avocado_seed_diagram-e.svg

Objetivos de la investigación

Objetivos General

Validar una metodología analítica para cuantificar taninos (catequina) en el tegumento de la pepa de palta (*Persea americana* Miller var. *has*) por cromatografía líquida de alta resolución.

Objetivos Específicos

- Determinar la linealidad del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar el límite de detección de taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar el límite de cuantificación de taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar la precisión del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar la exactitud del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.

1.5. Formulación del problema

¿Cuáles serán los parámetros que se empleen en el proceso de validación para la determinación de taninos (catequina) en el tegumento de la pepa de palta (*Persea Americana Millar Var. Hass*) por cromatografía líquida de alta resolución?

1.6. Formulación de Hipótesis

El proceso de validación para la determinación de taninos (catequina) en el tegumento de la pepa de palta (*Persea Americana Millar Var. Hass*) por cromatografía líquida de alta resolución, cumplen con los parámetros básicos de exactitud, precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

1.6.1 Objetivos General

Validar una metodología analítica para cuantificar taninos (catequina) en el tegumento de la pepa de palta (*Persea americana Miller var. has*) por cromatografía líquida de alta resolución.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Determinar la linealidad del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar el límite de detección de taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.

- Determinar el límite de cuantificación de taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar la precisión del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar la exactitud del método para determinar taninos (catequina) en el tegumento de pepa de palta por cromatografía líquida de alta resolución.

1.7. Importancia y Justificación

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios y en la semilla de algunos frutos, en este caso el estudio de la pepa de palta. Estos compuestos tienen la habilidad de formar complejos con las proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas. **Fuente:** Sara Arranz Martínez 2010, Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología de su determinación e identificación, Madrid.

Los taninos condensados presentes en leguminosas tropicales se encuentran en tres formas principales:

1. Extractables (reactivos con proteína).
2. Ligados a proteína.
3. Ligados a fibra.

Existen leguminosas donde todos los taninos son extractables (ejemplo *Acacia boliviana*) y en otras donde todos son ligados (ejemplo *Gliricidiasepium*). En hojas maduras de *D. molliculum*, se ha encontrado que un 50% de los taninos son extractables y el otro 50% ligados. En contraste, en hojas inmaduras hay más taninos extractables (67%) que ligados (33%). Por otra parte, se ha demostrado que el secado de la muestra puede afectar la distribución de taninos en el tejido de una planta. Por ejemplo, Cano *et al.* (1994) observaron que en varias leguminosas secadas al horno (60 °C) hubo una reducción de taninos extractables y un aumento de taninos ligados en comparación con muestras liofilizadas.

La propiedad biológica más conocida de los taninos condensados es su capacidad de reaccionar mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con proteínas, lo cual se denomina astringencia.

Estudios realizados han mostrado que los taninos de *D. ovalifolium* son más astringentes que los de *Flemingiamacrophylla*, lo cual parece que está relacionado con su menor peso molecular.

Existen varios métodos descritos en la literatura para cuantificar taninos, siendo la mayoría de tipo colorimétrico. Sin embargo, el método de cuantificación en este trabajo será utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Fundamentos filosóficos teóricos de la investigación

Los taninos (Tn) son polímeros polifenólicos distribuidos en todo material vegetal. Están clasificados como taninos hidrolizables si forman polímeros de ácidos fenólicos (gálico y elágico), o como taninos condensados (TC) si son polímeros de flavan-3-oles. Los TC poseen la propiedad de formar complejos con los metales (quelatos), las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos. Debido a esas propiedades, los TC bajan el valor nutricional. (1)

Los compuestos fenólicos representan un numeroso grupo, ampliamente distribuido en la naturaleza. Son componentes importantes en la dieta humana, el consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante. (4)

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero. (4)

La implementación de metodologías que permitan la determinación y cuantificación de Taninos (catequinas) en muestras vegetales, es de importancia para tareas de bioprospección, desarrollo de ingredientes para las industrias farmacéutica, de alimentos y cosmética, para el control de calidad, y muchas otras aplicaciones. (5)

El desarrollo de técnicas instrumentales, que logren de manera rápida y eficaz la determinación de compuestos polares y no-volátiles, tales como la cromatografía líquida de alta eficiencia, ha resultado de gran utilidad para la identificación y cuantificación rápida de diversos tipos de catequinas, en matrices con diferentes características (Castro, M. et al. 2011; Calderón, A. et al. 2009). Aunque esta técnica ha mostrado excelentes resultados en cuanto a la separación de catequinas, la discusión sobre cuál resulta más adecuada comparada con otras técnicas analíticas como electroforesis capilar continua abierta, ya que cada una presenta diferentes ventajas y desventajas, tal como lo muestran algunas publicaciones sobre el estudio comparativo de estas técnicas analíticas (Valls, J. et al. 2009; Bowser, M. et al. 2010; Dalluge y Nelson, 2000). (5)

El aguacate es un fruto de suma importancia comercial para nuestro país, la semilla representa aproximadamente el 15% en peso del fruto (Ramos, 1999), se tiene que de la industrialización actual resultan más de 3,000 toneladas aproximadamente de semilla anualmente, las mismas que son desechadas sin aprovechamiento alguno. A la semilla del aguacate se le atribuyen algunas propiedades de tipo farmacológicas debido a la

presencia de ácidos grasos (Werman y Neeman, 1986), compuestos polifenólicos (Valeri y Gimeno, 1953) y esteroides (Werman y Neeman, 1987; Lozano et al., 1993) y ha sido usada desde épocas precolombinas contra el padecimientos de males como dolores musculares, parásitos y micosis (Cabrera, 1996; Argueta et al., 1994; Atzin, 1990). (6)

Por otra parte, en el tejido secretor de los vegetales se sintetizan sustancias tales como taninos, esencias, resinas, látex y glúcidos entre otros, los cuales pueden almacenarse ahí mismo o bien ser vaciados a cavidades; por lo mismo pueden existir células secretoras aisladas, epidermis secretora y canales excretores. En el caso de la epidermis secretora, las células epidérmicas elaboran y acumulan esencias volátiles en su citoplasma. En los canales excretores se trata de cavidades situadas en los parénquimas, rodeados de células que excretan los productos elaborados (Camefort, 1977). (6)

En el aguacate el pericarpio está formado de tres capas: exocarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio junto a la cubierta seminal. El endocarpio se compone de pocas capas de parénquima de células planadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Barrientos, 1996).

Las células del parénquima, en las semillas, almacenan almidón (gránulos fundidos o agrietados en cotiledones y en el endospermo), proteínas (esferas o cuerpos pequeños e irregulares), o aceites (elaioplastos o en

esferosomas) (Esau, 1977). El almidón después de tinción con yodo presenta una coloración azul a violeta (Miehe, 1928; Curtis, 1986), en cambio las proteínas se tiñen de color amarillo (Miehe, 1928).

Los lípidos se tiñen de rojo con el Sudán III y el Sudán IV (Mauseth, 1988) y se ennegrecen con el ácido ósmico y la intensa osmiofilidad indica alto grado de insaturación (Camefort, 1977; Esau, 1977). Cuando hay taninos, éstos se tiñen de color amarillo, rojo o café con safranina (Mauseth, 1988), es típico encontrarlos en color fuerte y en gran cantidad y pueden estar localizados en células alargadas llamadas sacos de taninos (Esau, 1977).

La testa madura consiste de epidermis externa, células de taninos y remanentes del xilema cuyos elementos conductores, las traqueidas, pueden contener cantidades considerables de células ricas en azúcares, grasas o proteínas (Esau, 1977). El esclerénquima de la testa es abundante con esclérides (también llamadas células pétreas) de varios tamaños (Mauseth, 1988), éstas células son generalmente alargadas (Camefort, 1977), pueden formar masas continuas en pequeños grupos o solas alrededor de otras células, son de pared gruesa, secundaria y a menudo lignificada. Se distinguen dos formas principales, las esclérides (varían en forma) y las fibras (que son generalmente largas). (6)

El embrión contiene nutrientes de reserva, orgánicos e inorgánicos, localizados alrededor del embrión o en sus mismos tejidos; contiene

aproximadamente el 50% del aceite de la semilla y antes de germinar presenta una situación citológica que indica inactividad, esto es la presencia de proteínas y lípidos de reserva (Scagel et al, 1987; Esau, 1977) (6)

La cromatografía es una técnica para analizar o separar mezclas de gases, líquidos o sustancias disueltas. En general, todos los tipos de cromatografía involucran dos fases: fase estacionaria (el material adsorbente) y una fase móvil (el solvente que eluye). La separación depende de la competencia de las moléculas de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. (8)

La cromatografía líquida de alta resolución, o HPLC por sus siglas en inglés, es un método cromatógráfico para separar y analizar mezclas de sustancias, usando una columna que contiene micro esferas recubiertas con la fase estacionaria y donde la fase móvil es bombeada a través de la columna con una bomba de alta presión. La emergencia de cada uno de los componentes de la muestra es analizada de la columna usando diferentes detectores. (8)

En cromatografía de gases (GC), la única función de la fase móvil es transportar el compuesto. En cromatografía líquida (LC), el soluto interactúa con líquidos o mezclas de líquidos usadas como fase móvil. La selección de la fase móvil es crítica y uno de los criterios más críticos es la solubilidad (9).

Los solutos vencen la retención cuando existe una interacción débil con la fase estacionaria. La fase móvil debe ser elegida de acuerdo a la naturaleza del soluto (polar, no polar, iónico). La fase estacionaria más usada según encuestas en muchas publicaciones es la fase reversa. En este modo la fase móvil tiene una polaridad mayor a la de la fase estacionaria. Normalmente, la fase estacionaria es de naturaleza hidrofóbica (9).

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome los solventes, la bomba envía al solvente a través de caños de diámetro pequeño, hacia la válvula inyectora, ésta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de solvente. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector, este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma) (10).

Las características de desempeño del método analítico se expresan en función de los siguientes parámetros analíticos: linealidad, rango, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y robustez (7)

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o promedio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación. La linealidad en un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado. La linealidad se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta, ya sea lineal o no.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuáles son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La procedencia de las

muestras destinadas al estudio de precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio. El objeto del estudio de la predicción es conocer la variabilidad o el mas - menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, entre otros.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales. En este contexto definimos: Reproducibilidad.- Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios; Precisión intermedia.- Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, en diferentes días, o con diferentes analistas o equipos.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado. No debe confundirse la exactitud y precisión, la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero

poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿cuál es el valor verdadero del analito en la muestra?, el valor verdadero en muchos casos se desconoce. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón. También se acepta la comparación de resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico, se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo: Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80 – 120%. La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza.

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límite solamente fundamentan que la cantidad del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad.

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo impurezas en materias primas y productos de degradación en productos terminados. Es la cantidad menor de analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas.

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inafectado por pequeñas variaciones deliberadas en el método y provee un indicio de su veracidad durante su uso normal.

CAPITULO III

METODOLOGÍA EMPLEADA

3.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN

3.1.1 MÉTODOS

3.1.2 TOMA DE MUESTRA

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).

3.1.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Se preparó una solución madre de Catequina de 1 mg/mL, de la cual se tomó 10, 50, 100, 150, 200 y 250 μ 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 μ g/mL respectivamente.

3.1.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

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 centrifugo 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 μ m de poro; colocándose en viales ámbar de 1,5 mL.

3.1.5. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD

Para determinar la linealidad del método, se evaluaron 6 soluciones estándares comprendidas entre 1 y 25 µg/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; 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.

3.1.6. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCION

Se preparó soluciones estándares de Catequina menores a 1 µg/mL, hasta encontrar la concentración, a la cual en el cromatograma aparezca un pico en el tiempo de retención característico del analito, pero que no sea cuantificable por el equipo.

3.1.7. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se obtuvo aplicando la fórmula:

$$\text{L.C.} = (10/3) \text{ L.D.}$$

Dónde:

L.C.: Limite de cuantificación.

L.D.: Limite de detección.

3.1.8. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Para determinar la precisión del método, se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se prepararon muestras de 8 µg/mL, 10 µg/mL y 12 µg/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 µL, a una temperatura de 35 °C.

3.1.9 DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD

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 µg/mL, 12 µg/mL y 14 µg/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 µL, a una temperatura de 35 °C.

3.2. MATERIAL

3.2.1. MATERIAL DE ESTUDIO

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

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

3.2.2.1. REACTIVOS

- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Agua ultra pura
- Catequina
- Metanol grado HPLC

3.2.2.2. MATERIAL DE VIDRIO

- Fiolas 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.

3.2.2.3. EQUIPOS

- Balanza Analítica Sartorius 2942, Sensibilidad 0,0001g
- Cromatógrafo Agilent 1100 series
- Filtro de vacío SANILAB
- Micropipeta 100-1000 uL
- Micropipeta 20-200 uL
- Sistema de purificación para obtener agua ultra pura: Modelo: EASY PURE, Marca: BARNSTEAD

3.2.2.4. OTROS

- Cocinas eléctricas
- Filtros jeringa de Celulosa Regenerada de 0,2 μm de poro, y 25 mm de diámetro
- Impresora
- Jeringas descartables de 3 mL
- Laptop HP I3
- Membrana de Nylon de 47 mm de diámetro y 0,2 μm de poro
- Memoria USB de 1 Gb
- Papel de filtro

CAPÍTULO IV

4.1 Desarrollo del análisis e interpretación

4.1.1 Resultados

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 |

GRÁFICO 1: Curva de calibración de Taninos (Catequina)

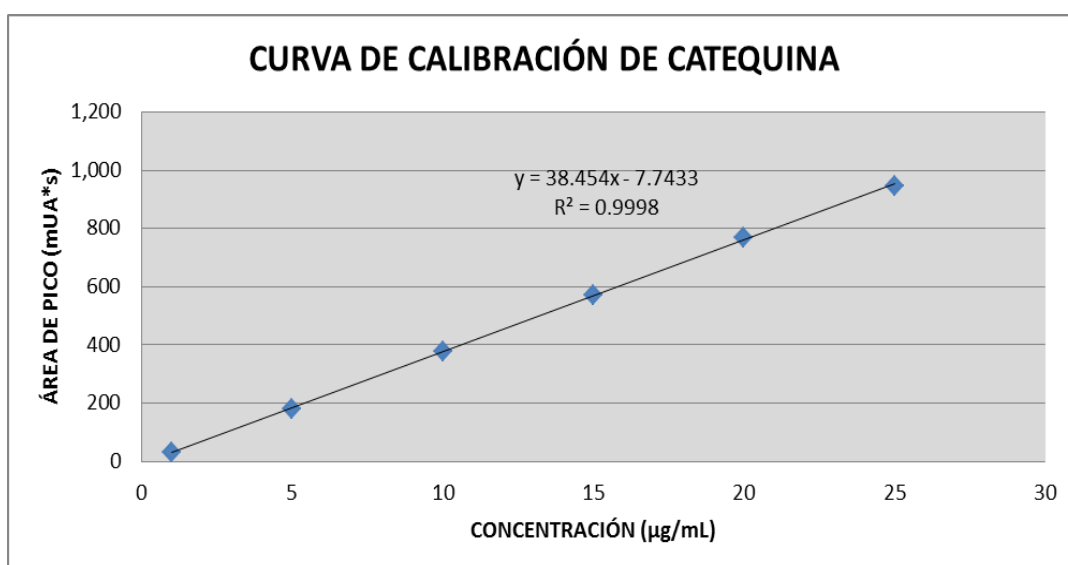


TABLA 2: Límite de detección de Taninos (Catequina)

| ANALITO | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$) | ÁREA PICO (mUA*s) |
|----------------|--|--------------------------|
| Catequina | 0,21 | 0,33204 |

TABLA 3: Límite de cuantificación de Taninos (Catequina)

| ANALITO | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$) | ÁREA PICO (mUA*s) |
|----------------|--|--------------------------|
| Catequina | 0,7 | 30,71070 |

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 ($\mu\text{g/mL}$) | ÁREA PICO (mUA^*s) | CANTIDAD RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$) | CANTIDAD RECUPERADA (%) (98,0%-102,0%) | PROMEDIO (%) | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (%) (2,0%) |
|--|---------------------------------------|---|--|---|-----------------|------------------------|--|
| 1 | 10 | 377,72824 | 10,02 | 100,24 | 99,55 | 0,66 | 0,66 |
| | | 372,66486 | 9,89 | 98,92 | | | |
| | | 374,83847 | 9,94 | 99,49 | | | |
| 2 | 12 | 460,75049 | 12,18 | 101,52 | 100,78 | 0,66 | 0,65 |
| | | 454,89499 | 12,03 | 100,25 | | | |
| | | 456,27179 | 12,06 | 100,55 | | | |
| 3 | 14 | 538,66953 | 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 | | | |

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir en:

- 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 $\mu\text{g/mL}$.
- El límite de cuantificación para Taninos (Catequina) es de 0,7 $\mu\text{g/mL}$.
- 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%.

5.2 DISCUSIÓN

En la tabla 1 y grafico 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, así como de una excelente linealidad entre la concentración de los estándares y el área de los picos.

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.

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.

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 $\mu\text{g/mL}$. La IUPAC (1997) 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 dentro de estos últimos la comparación de señal/ruido es de 10:3.

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 $\mu\text{g/mL}$ (80%), 10 $\mu\text{g/mL}$ (100%) y 12 $\mu\text{g/mL}$ (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. Se recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. 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.

La exactitud es uno de los parámetros de calidad básicos que desde un punto de vista metrológico, depende de la trazabilidad de las medidas. La IUPAC (1998) 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” (22)

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 (23.24).

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 6.1. Contreras-Domínguez M, Marnet N, Perraud-Gaime I, Roussos S, Guyot S, Augur C. Degradación inicial de taninos condensados por *Aspergillus fumigatus* MC8. *XI Congreso Nacional De Biotecnología Y Bioingeniería*. 2005; México (Yucatán).
- 6.2. Sánchez LM, Mancebo B, Faure R, Travieso MC. Validación de la técnica para la determinación de catequina en tabletas de *Rhizophora mangle* L. por CLAR. *Revista Cubana de Farmacia*. 2010; 45(1): 58-70.
- 6.3. Cala M, Vásquez A, Garcia A, Martinez JR, Stashenko E. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2011; 136(35): 371-379.
- 6.4. Gracia Nava Manuel Alejandro. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. *Rev Acad 2009; 1-4*.
- 6.5. Mónica Cala, Ángela Vásquez, Alejandro García. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.: Volumen xxxv, número 136-septiembre de 2011: 2 -3*.

- 6.6. J. A. García-Fajardo; M. del R. Ramos-Godínez; J. Mora-Galindo
Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa
extraída por diferentes técnicas 1999. Revista Chapingo Serie
Horticultura 5: 123-128. 3-4.
- 6.7. Miguel A. Sogorb Sánchez, Eugenio Vilanova Gisbert. 2004. "Técnicas
Analíticas de Contaminantes Químicos" Aplicaciones Toxicológicas,
Medioambientales y Alimentarias. Editorial Dios de Santos – España. Cap.
9, pág. 173.
- 6.8. Ramón Compañó B.- Ángel Ríos C. "Garantía de la Calidad en los
Laboratorios Analíticos". Editorial Síntesis – España. Cap. 11, pág. 213-
241.
- 6.9. Harvey, David. 2002. "Química Analítica Moderna". Editorial
Concepción Fernández – España.
- 6.10. Ledezma M. Determinación de vitamina C en frutas por cromatografía
líquida de alta resolución "HPLC". Tecnología en marcha.
- 6.11. Skoog D.; Holler F.; Nieman T. 2001 "Principios de Análisis
Instrumental". 50 ed. Editorial Mc Graw-Hill/ Interamericana de
España, S.A. Madrid (España). Pág. 11-19, 937-939.
- 6.12. Willard H.; Dean J. ; Settle F. 1991. "Métodos Instrumentales de
Análisis". 5ta edición, Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V.
México D.F. (México) pág. 1 y 2.
- 6.13. Miller J.C., Miller J.N. 1993 "Estadística para Química Analítica". 20 ed.
Edición Addison-Wisley Iberoamericana. Delaware (E.U.A.). pág. 42-
52.

- 6.14. Willey 2007, HPLC for Pharmaceutical Scientists, editado por YURI KAZAKEVICH y ROSARIO LOBRUTTO.
- 6.15. Quattrocchi O. A., Abelaida S. I., Lava R. F. "Introducción a la HPLC- Aplicación y práctica", Argentina. 1992.
- 6.16. Candelas M. G., Alanís M. G., Del Río F. "Extracción y cuantificación por HPLC de licopeno en tomate y polvo de tomate". Universidad autónoma de Guanajuato. México.
- 6.17. Callejón R. "Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales" Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. España.
- 6.18. Mostacero J., Mejía F., Gamarra O. "Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú". Universidad Nacional de Trujillo 2ª edición. 2002.
- 6.19. Meyer R, Chardonnes F, Hübner P, Lüthy J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 1996; 203: 339–344.
- 6.20. Hupfer Ch, Hotzel H, Sachse K, Engel KH. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1998; 206: 203–207.
- 6.21. Agater IB, Briant KJ, Liewellyn JW, Sawyer R, Bailey J, Hitchcock CHS. The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. *J Sci Food Agric* 1986; 37: 317–331.

- 6.22. Janssen FW, Voortman G, De Baai JA. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and imonoperoxidase staining. *J Agric Food Chem* 1987; 35: 563–567.
- 6.23. Molander E. Determination of soya protein in meat products by standard curves obtained from SDS gel electrophoresis. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1982; 174: 278–281.
- 6.24. Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 1994; 45: 4635–4638.
- 6.25. Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K. Isoflavones in soy-based infant formulas. *J Agric Food Chem* 1997; 42: 1666–1673.
- 6.26. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 1994; 9: 1905–1913.
- 6.27. Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 1998; 264: 1–7.
- 6.28. Wilkinson AP, Wähälä K, Williamson G. Identification and quantitation of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *J Chromatogr B* 2002; 777: 93–109.
- 6.29. Franke AA, Custer LJ, Wang W, Yang, Shi CH. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and human fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 37: 263–272.

- 6.30. Körs M, Steinhart H. CTAB electrophoresis and immunoblotting: a new method for the determination of soy proteins in meat products. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 205: 224–226.
- 6.31. Shihabi ZK, Kute T, Garcia LL, Hinsdale M. Analysis of isoflavones by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1994; 680: 181–185.
- 6.32. Klejdus B, Vitamvásová D, Kubáň V. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1999; 839: 261–263.
- 6.33. Griffith AP, Collison MW. 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* 2001; 913: 397–413.
- 6.34. Careri M, Elviri L, Mangia A. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of isoflavonoids in soybeans. Study of extraction procedure by experimental design. *Chromatographia* 2001; 54: 45–50.
- 6.35. Hutabarat LS, Mulholland M, Greendfield H. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 1998; 795: 377–382.