



21
REJ
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FORMACIÓN DE
DERIVADOS SILILADOS DE AZÚCARES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JAVIER

MARTINEZ

PEREZ



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

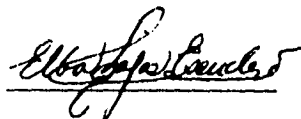
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Prof. Josefina Viades Trejo
Secretario	Prof. Elba Rojas Escudero
1er. Suplente	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
2do. Suplente	Prof. José de Jesús García Valdez

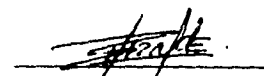
Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 224 Depto. de Química Orgánica DEPg. Facultad de Química UNAM

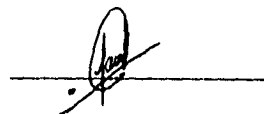
Asesor: Q. Elba Rojas Escudero



Supervisor Técnico: Q. Patricia Elizalde Galván



Sustentante: Javier Martínez Pérez



**Este trabajo contiene el esfuerzo y apoyo de innumerables personas
a quienes agradezco sus aportaciones,
todas muy distintas pero igualmente importantes**

Agradezco especialmente:

**A mis padres, para quienes nunca habrá palabras suficientes que expresen
todo cuanto quiero agradecerles**

**A las profesoras Q. Elba Rojas y Q. Patricia Elizalde
por su asesoría y tiempo dedicados a este trabajo**

**A mis amigos por brindarme su amistad desinteresada y sincera
ustedes saben quienes son**

A la memoria de Maty

No one like you

... Si lo que he aprendido leyendo
no lo comprendiera practicando.

C. di Rienzi

INDICE

Introducción	1
I Antecedentes	
1.1 Azúcar, definición y propiedades	2
1.2 Análisis de azúcares	2
1.3 Derivados de carbohidratos	3
1.3.1 Derivados sililados	4
1.3.2 Formación del derivado sililado	10
1.4 Cromatografía	12
1.4.1 Análisis instrumental por cromatografía	12
1.4.2 Cromatografía de gases	13
1.4.3 Equipo instrumental para cromatografía de gases	13
1.4.4 Parámetros del comportamiento cromatográfico	16
1.5 Análisis cualitativo por CGL	18
1.6 Análisis cuantitativo por CGL	19
1.6.1 Cuantificación por estándar interno	19
II Objetivos	21
III Material y métodos	
3.1 Material y reactivos	22
3.2 Método experimental	23
3.2.1 Extracción de azúcares de manzana	23
3.2.2 Selección de la técnica para formar el derivado sililado	23
3.2.2.1 Preparación de derivados sililados	24
3.2.3 Análisis cualitativo por CGL de azúcares en manzana	25

3.2.4 Optimización de la técnica seleccionada	26
3.2.4.1 Ensayos de temperatura y tiempo de reacción para el derivado Ox-TMS	27
3.2.4.2 Ensayos de temperatura y tiempo para formación de oximas	27
3.2.5 Análisis cuantitativo por CGL de azúcares en manzana	28
IV Resultados	29
V Discusión de resultados	40
VI Conclusiones	44
Apéndices	46
Referencias	51

INTRODUCCION

El desarrollo de reacciones para la formación de derivados sililados ha permitido que compuestos no volátiles, tales como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, sean factibles de analizar por cromatografía de gases (CG).

El primer reporte de la aplicación de derivados sililados en carbohidratos apareció en 1963,¹ desde entonces varias reacciones de formación han sido propuestas,^{2,4} pero aún se presentan inconvenientes debidos a isómeros y subproductos originados durante la reacción, los cuales son causa de la aparición de picos no deseados en el cromatograma. La CG es una técnica eficaz para la separación de muestras complejas, resultando útil en el análisis cualitativo y como método analítico cuantitativo. Para azúcares tiene ventajas sobre los métodos tradicionales basados en la reducción de sales de cobre en solución alcalina,⁵ pues no se limita a azúcares reductores, sino que es posible el análisis de mezclas de azúcares reductores y no reductores, por tanto resulta útil en el análisis de frutos, donde la glucosa, fructosa y sacarosa son los azúcares predominantes, y también otros sacáridos que se encuentran en menor cantidad como la xilosa y galactosa.⁷

La CG se ha adoptado como el método de análisis oficial de la AOAC¹⁴ para azúcares en jugos de frutas, sin embargo desde 1980 la técnica descrita no ha sido actualizada. En años recientes el empleo de columnas capilares permite una mejor separación de mezclas y análisis de azúcares aun en muy baja concentración.

En este trabajo se dan a conocer los resultados de la evaluación por CG de la formación del derivado sililado por cuatro técnicas diferentes, la optimización de las condiciones de temperatura y tiempo para la reacción que generó menos subproductos, y la implementación de una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo de azúcares por cromatografía de gases. Estas condiciones se aplicaron a los azúcares extraídos de Manzana "Starking".

I ANTECEDENTES

1.1 AZUCARES, DEFINICION Y PROPIEDADES

Los carbohidratos son compuestos de fórmula molecular $C_n(H_2O)_n$, el término carbohidrato se utiliza normalmente en un sentido más limitado para designar polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas y sus derivados.²⁶

La palabra azúcar se emplea para designar a los carbohidratos clasificados como mono y oligosacáridos,²⁷ siendo monosacáridos aquellos que en general poseen de tres a nueve átomos de carbono; la conexión de dos o más monosacáridos mediante puentes de oxígeno conduce a oligosacáridos.

La química de los monosacáridos es la de los grupos funcionales hidroxilo y carbonilo; como ambos grupos están en una misma molécula, pueden ocurrir reacciones tanto intramoleculares como intermoleculares, resultando la formación de estructuras cíclicas que dan origen a las formas anoméricas de los monosacáridos y produciendo mutarrotación, que dificulta el análisis de estos compuestos. Al mismo tiempo, es también la estructura del azúcar la que permite diseñar métodos para su análisis, aprovechando las propiedades ópticas y químicas debidas a los grupos funcionales.

1.2 ANALISIS DE AZUCARES

El interés por el análisis de azúcares no debe centrarse en soluciones modelo o materiales cuyo único componente sea algún azúcar, sino que los métodos de análisis deben aplicarse a muestras reales, como los alimentos, en especial los frutos, jugos, conservas y

muchos otros productos donde los azúcares representan la mayor parte estructural o nutritiva.^{16,33}

Para el análisis del tipo de azúcares y su concentración en los alimentos se han diseñado pruebas que permiten alcanzar estos objetivos, pero no siempre se ha logrado su identificación plena.

Los métodos cualitativos de análisis para azúcares están basados en reacciones coloridas, producidas por la condensación de productos de degradación de azúcares con compuestos orgánicos, como son la reacción de la antrona, de Molish y de Seliwanoff.³⁰

Los métodos cuantitativos son semi-empíricos y dependen de la acción reductora del azúcar en soluciones de cobre (II). Pueden ser volúmetricos o gravimétricos;^{5,18} las propiedades ópticas debidas a los átomos de carbono asimétricos, se han usado para relacionar la rotación específica con la cantidad de sustancia en solución.²⁹

Las mezclas de azúcares se han estimado por métodos microbiológicos, pero no resultan útiles para azúcares no fermentables.³⁰

Actualmente nuevas reacciones y técnicas instrumentales como la cromatografía de gases y de líquidos, permiten que compuestos como los azúcares puedan ser identificados y cuantificados con mayor exactitud y precisión.

1.3 DERIVADOS DE CARBOHIDRATOS

La baja volatilidad de algunos compuestos para ser analizados directamente por cromatografía de gases, se debe a la presencia de grupos funcionales que contienen átomos de hidrógeno activos, como son el grupo amino, hidroxilo y carboxilo; mismos que pueden interactuar con moléculas similares o con la fase estacionaria.¹³

Los azúcares presentan múltiples grupos hidroxilo en su estructura, por lo que requieren ser transformados en un derivado que sea volátil para ser analizados por CG.

Las reacciones utilizadas en la formación de derivados transforman a los grupos hidroxilo en grupos éter o éster. El primer reporte de la aplicación de CG en carbohidratos data de 1958, y fue usando derivados metilados.²⁸ Después se propusieron los acetatos de alditol, los cuales son de mayor volatilidad y más prácticos porque presentan menor tiempo de retención que los primeros.⁴

En los acetatos de alditol, el grupo carbonilo se reduce a un alcohol, por lo que se evita la formación de anómeros, pero tienen el inconveniente de que diferentes aldosas producen el mismo alditol y en las cetosas se forma un alcohol secundario, introduciendo un nuevo centro asimétrico, de manera que un azúcar produce dos alditoles.

Se han propuesto otros derivados: los ésteres de fluoroacetato, n-butil boronatos, O-metil-glucósido trifluoro-acetatos, pero los que han resultado de mayor aplicación son los derivados sililados.

1.3.1 DERIVADOS SILILADOS

Hedgel y Overed³⁷ investigaron las condiciones necesarias para la formación de derivados sililados, determinando que la reacción es reversible, y que además es posible recuperar al compuesto original después de la hidrólisis del derivado en metanol acuoso.

La técnica de sililación consiste en sustituir el hidrógeno de los grupos ya mencionados, por un grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃] formando éteres de trimetilsilicio, conocidos como derivados TMS, o sililados (fig 1.1). En ocasiones también se emplea para designar la sustitución con reactivos que contienen grupos orgánicos de silicio como el dimetilsilil y el clorometil dimetilsilil.¹³

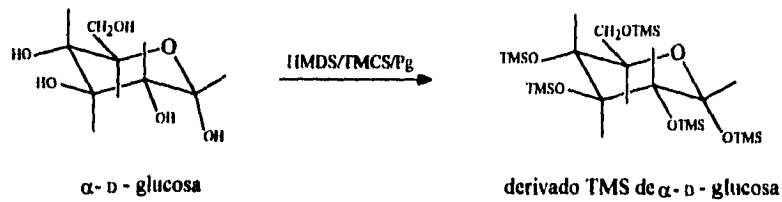


fig 1.1 Formación de derivados TMS o sililados

En los azúcares la sustitución del hidrógeno de los grupos hidroxilo, reduce la polaridad del compuesto y la tendencia a formar puentes de hidrógeno, de esta manera el derivado es más volátil que la molécula original. A la vez, la reactividad se reduce y es menos propenso a reaccionar con otros compuestos del sistema.

Smith y Carlsson estudiaron algunos aspectos analíticos de la reacción, manifestando su potencial de aplicación para el análisis de carbohidratos.¹⁵ Posteriormente un estudio más amplio fue realizado por Sweeley *et al.*¹ Ellos asentaron que los derivados sililados son los más versátiles para el análisis de carbohidratos por Cromatografía Gas-Líquido (CGL) y establecieron las condiciones "estándar" de reacción, formando el derivado con hexametildisilazano (HMDS) y trimetilelorosilano (TMCS).

A pesar de las condiciones de reacción establecidas por Sweeley, aún se presentan problemas en los éteres trimetilsililados de monosacáridos y oligosacáridos, debidos a la generación de isómeros y subproductos, lo cual durante el análisis por CGL ocasiona desventajas como las siguientes:³

- Las proporciones de cada anómero dependen de la composición del disolvente, la temperatura y del tiempo que ha estado disuelto el azúcar.

- Puede ocurrir sobreposición entre la fructosa y la glucosa provocando resultados imprecisos.

- La relación señal/ruido es menor para un monosacárido que produce múltiples picos, que si produjera uno sólo, esto es muy importante cuando el azúcar se encuentra en bajas concentraciones.

Las alternativas para evitar la formación de múltiples picos y subproductos son: evitar la anomerización y formar el derivado con reactivos más potentes y que generen menos subproductos.⁸

Para inhibir la anomerización, Bentley y Botlock²⁰ describen una modificación para soluciones acuosas de azúcares, las cuales se diluyen con N,N,-dimetilformamida, un disolvente en el cual la mutarrotación es lenta y la formación del derivado ocurre a baja temperatura.

La eliminación del centro anomérico por alguna reacción en el grupo carbonilo puede conducir a otros derivados.

La formación de oximas o metil oximas de monosacáridos resulta útil (fig. 1.2). Las oximas son derivados del amoniacio en la forma Y-NH₂, que por sustitución del oxígeno carbonílico por un átomo de nitrógeno, producen compuestos estables tipo imina con aldehidos y cetonas.²¹

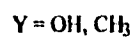


fig. 1.2 Formación de oximas y metil-oximas

A partir de las oximas se desarrollaron los acetatos de aldonitrilo. La reacción consiste en formar la aldoxima, que después se deshidrata, así cada derivado conserva su posición característica del carbono 1, con la presencia del grupo funcional nitrilo;^{25,26} como este grupo no forma isómeros da un sólo derivado (fig. 1.3). Lamentablemente la reacción no produce compuestos volátiles con las cetosas⁴ y la deshidratación de la oxima no es cuantitativa para monosacáridos.⁶

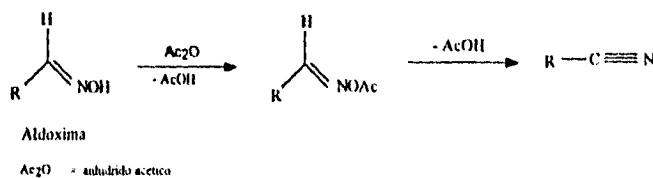


fig. 1.3 Formación de aldonitrilos

La formación de un sólo derivado a partir de reducir la aldoxima al aminopolialcohol, la reportaron Frank *et al.*² el método completo implica cuatro reacciones (fig. 1.4), varias horas para su preparación, y las cetosas aun forman dos isómeros lo que representa pocas ventajas sobre la reacción directa de la oxima con el reactivo para formar el derivado siliado.

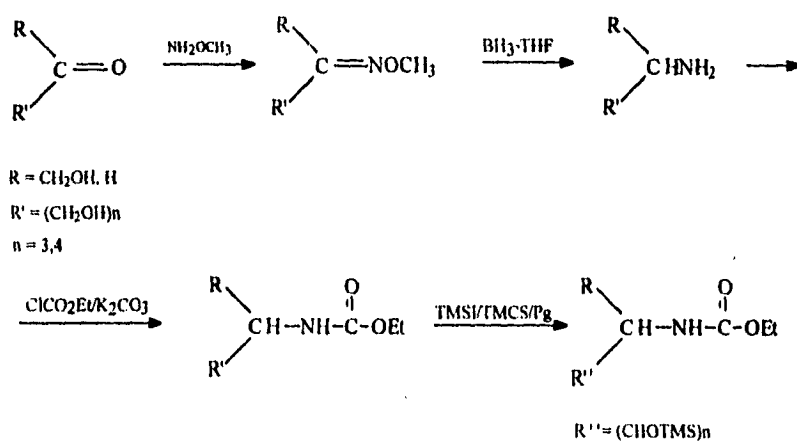


fig. 1.4 Formación de derivados N-etoxicarbonil-O-trimetilsililados

Es posible la formación del derivado TMS en las oximas de los monosacáridos (fig. 1.5), derivados Ox-TMS. Sin embargo el doble enlace C=N, conduce a dos esteroisómeros, el anti y el sin (fig. 1.6), pero reduce los productos a sólo dos isómeros por azúcar. En columnas empacadas no es posible separar estos isómeros y eluyen juntos. Shaffler y Morel Du Boil indican que la separación se puede conseguir con el uso de columnas capilares.³

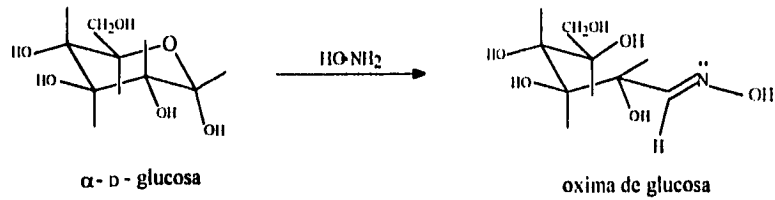


fig 1.5 La sustitución del hidrógeno de los grupos hidroxilo por grupos TMS conduce a los derivados Ox-TMS de los monosacáridos

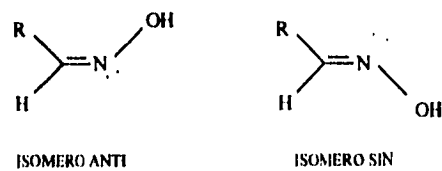


fig. 1.6 Isómeros de oximas

Para la formación de oximas se han considerado tres factores: el tiempo, la temperatura de reacción y la formación de oximas en presencia de un disacárido no reductor, como la sacarosa.

La formación de oximas se realiza generalmente de 70 a 80 °C durante 30 ó 60 minutos.^{4,6,22,23} El estudio realizado por Willis²⁴ señala que en algunos carbohidratos de C₂ a C₇, la reacción se puede hacer a 60°C por 5 min. pero no amplia su estudio sobre los azúcares, por lo cual aun es necesario verificar estas condiciones de reacción en los azúcares.

La sacarosa es un disacárido no reductor, por tanto no produce oxima, pero si este azúcar se encuentra en una mezcla con monosacáridos, puede ocurrir la inversión de sacarosa debida a la acidez del medio de reacción, en consecuencia la concentración de glucosa y fructosa aumentan, para prevenir esta hidrólisis se reporta la adición de dimetilamino etanol, como regulador orgánico del medio.³

1.3.2 FORMACION DEL DERIVADO SILILADO

El desarrollo de agentes sililantes ha permitido avances en la formación de derivados y de las condiciones para la reacción. Cuando se está desarrollando un método lo más recomendable es monitorear la reacción por CG para establecer las condiciones adecuadas de tiempo y temperatura para completar la reacción.

Estos parámetros de la reacción de sililación para algunas muestras, requiere sólo de algunos minutos y temperatura ambiente^{1,19} con la mezcla adecuada de reactivos; sin embargo por la naturaleza y condiciones de las muestras se puede requerir tiempo y temperatura adicionales, para facilitar la solubilidad y completar la reacción, también debe considerarse el reactivo utilizado.

La selección del reactivo apropiado por lo general se basa en criterios como son:

- reactividad de la muestra y del reactivo
- selectividad del reactivo
- reacciones secundarias
- productos de reacción y subproductos

Para formar derivados sililados de azúcares, la mezcla de reactivos de Sweeley (HMDS/TMCS), actualmente se considera de efectividad regular y apropiada para azúcares anhidros.¹⁹

Los reactivos actuales como el bis-trimetilsililacetamida (BSA), y el Trimetilsililimidazol (TMSI) son más fuertes, no requieren mezclas y aseguran una reacción cuantitativa, así como subproductos de mayor volatilidad, lo que resulta en una menor interferencia o ruido en el cromatograma.

Los reactivos fluorados como el N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA), además minimizan la acumulación de SiO_2 en el detector de ionización de flama, evitando que aumente el ruido y la sensibilidad disminuya.¹⁹

Los reactivos actuales como el bis-trimetilsililacetamida (BSA), y el Trimetilsililimidazol (TMSI) son más fuertes, no requieren mezclas y aseguran una reacción cuantitativa, así como subproductos de mayor volatilidad, lo que resulta en una menor interferencia o ruido en el cromatograma.

Los reactivos fluorados como el N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA), además minimizan la acumulación de SiO_2 en el detector de ionización de flama, evitando que aumente el ruido y la sensibilidad disminuya.¹⁹

1.4 CROMATOGRAFIA

El término cromatografía se aplica a los procesos de separación donde los componentes de una mezcla son equilibrados repetidamente entre dos fases, una de ellas fija o estacionaria y la otra móvil. La fase móvil puede ser un gas o un líquido, y la fase estacionaria un líquido o un sólido.¹⁰

1.4.1 ANALISIS INSTRUMENTAL POR CROMATOGRAFIA

En el análisis instrumental pueden realizarse diferentes combinaciones de cromatografía (fig. 1.7).

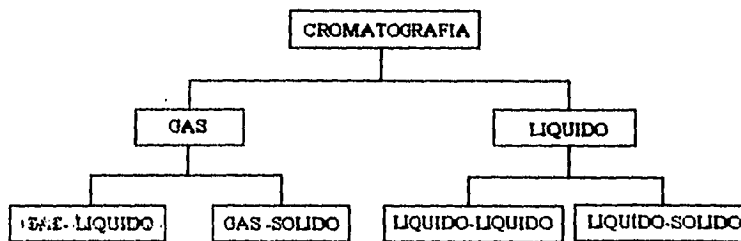


fig. 1.7 División de cromatografía de acuerdo a las fases empleadas (móvil-estacionaria)

La cromatografía de gases se ha desarrollado rápidamente desde que fue introducida en 1952 por James y Martin,³⁹ y actualmente permite que muchos componentes de los alimentos sean analizados por esta técnica. Por su alta capacidad de separación, se prefiere la CG cuando las mezclas son desconocidas y complejas, o los analitos están en baja concentración, el requisito es que los compuestos a analizar sean volátiles o puedan transformarse en un derivado volátil, por tal motivo y debido a la complejidad de los alimentos la CG es generalmente la última etapa del análisis.

1.4.2 CROMATOGRAFIA DE GASES

La forma más común de CG es como Cromatografía Gas-Líquido (CGL), la cual es un proceso de elución, donde los compuestos son llevados por el eluyente a través de la columna, al tiempo que se van separando, por tanto cuando concluye un análisis la columna queda lista para otra muestra.¹²

La separación de una mezcla por CGL ocurre de la forma siguiente: una solución de la muestra se inyecta a través de un bloque caliente (Inyector), donde inmediatamente es vaporizada y llevada por una corriente de gas acarreador (Fase móvil) al interior de la columna, ahí los constituyentes de la mezcla se distribuyen entre el gas y la fase líquida o estacionaria; al avanzar y debido a las continuas etapas de reparto los solutos gradualmente forman bandas, que se desplazan a su propia velocidad a través de la columna, las moléculas de los compuestos que son más solubles o muestran más afinidad por la fase estacionaria, requieren de un mayor tiempo para eluir que aquellas debilmente orientadas hacia la fase estacionaria.¹³

1.4.3 EQUIPO INSTRUMENTAL PARA CROMATOGRAFIA DE GASES

El equipo instrumental necesario para el análisis por CGL (fig. 1.8), consta de las siguiente partes: 1) cilindro de gas portador, 2) control de flujo de gas, 3) entrada de la muestra o inyector, 4) horno, 5) columna, 6) detector, 7) registrador o integrador.

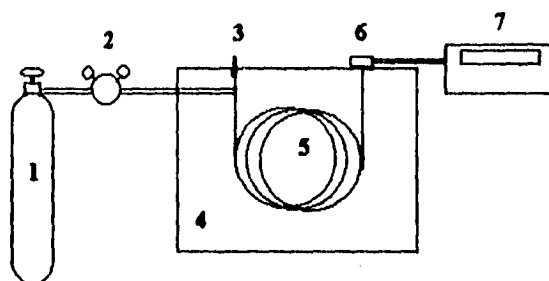


fig. 1.8 Esquema del equipo para cromatografía de gases

Los propósitos y algunos aspectos fundamentales relativos a estas partes que permiten diseñar un método de análisis por CGL son los siguientes:

El propósito primario del gas portador es transportar los componentes de la muestra a través de la columna, el gas debe ser de alta pureza, no debe reaccionar con la muestra ni con la fase estacionaria. Los gases empleados son hidrógeno, helio o nitrógeno; la elección depende del tipo de detector que se emplee y de la alternativa entre optimizar la eficiencia de la columna o el tiempo de análisis, cuando el segundo punto es el de interés se prefiere un gas ligero.¹²

El control del flujo es importante al establecer el método de análisis, del flujo dependen la eficiencia de la columna y la velocidad del gas en la columna, esta velocidad influye en el tiempo de retención de los compuestos y estos tiempos deben mantenerse constantes para que sean útiles en el análisis cualitativo.

La introducción de la muestra se hace con una jeringa especial a través de un sello de silicón. Se depositan en el inyector, que es un bloque metálico que se calienta a una temperatura suficientemente alta para vaporizar casi al instante a la muestra inyectada. Para muestras que se descomponen al contacto con superficies metálicas calientes, debe incluirse una pared de vidrio inactivo dentro del inyector, esta superficie es inerte y evita también que los compuestos inyectados queden adsorbidos en ella.

Con el uso de columnas capilares se reduce el volumen de inyección para prevenir una sobrecarga en la columna, por tal motivo se emplea un inyector tipo "split" o divisor de flujo, el cual mezcla al gas portador con la muestra vaporizada y sólo deja pasar a la columna alrededor del 1% del volumen inyectado, el resto se desecha.⁹

La función del horno es mantener homogénea la temperatura de la columna, y debe ser capaz de enfriar y calentar rápidamente, en especial cuando se usan temperaturas programadas con el propósito de reducir el tiempo de análisis.

Son de uso general dos tipos de columnas, las empacadas y las capilares. En años recientes el uso de estas últimas se ha incrementado debido a la mejor resolución que se obtiene. En las columnas capilares la fase estacionaria está retenida en la pared interna de la columna, de manera que el centro queda abierto al flujo del gas lo cual permite que las columnas sean más largas, pues la caída de presión es baja.⁹ La longitud de las columnas capilares es de 30 a 60 m, el diámetro interno puede ser de 0.53, 0.32 ó 0.25 mm, y se ha observado que al disminuir el diámetro se obtienen mejores separaciones.

Puesto que la mayoría de los detectores fueron diseñados para operar con columnas empacadas, el uso de un gas auxiliar o "make up" al final de la columna compensa la diferencia entre el flujo de gas acarreador de una columna empacada (normalmente de 30 a 40 cm³/min) con el de una columna capilar (normalmente de 0.5 a 3 cm³/min).

El detector es un sistema localizado al final de la columna que permite registrar la salida de los compuestos que se han separado. Los detectores de uso general son el detector de conductividad térmica (DCT) y el detector de ionización de flama (DIF). Para el análisis de compuestos orgánicos el DIF resulta adecuado por su alta sensibilidad y amplio intervalo de respuesta lineal.

Los límites de detección son cercanos a 4 pg/seg y la respuesta lineal es desde 0.001 ng a 10000 ng. no detecta agua ni a los gases permanentes como son CO, CO₂, CS₂, SO₂, NH₃, SiCl₄, y los óxidos de nitrógeno.

Su funcionamiento se basa en la combustión de material ionizable en presencia de aire e hidrógeno, los iones generados producen una caída de voltaje entre dos electrodos, la cual se registra, amplifica y se envía como señal a un integrador o a una computadora, donde se imprime o registra el cromatograma.¹²

1.4.4 PARAMETROS DEL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Los datos cualitativos útiles para optimizar el comportamiento cromatográfico son los siguientes:

Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo que transcurre desde que se deposita la muestra en el sistema cromatográfico hasta el tiempo máximo de elución del soluto, es una función que depende del largo de la columna, de la velocidad de la fase móvil, de la afinidad del soluto por la fase estacionaria y de la temperatura.

Tiempo muerto (t_0). Es el tiempo requerido para que un componente no retenido pase a través de la columna.

Factor de capacidad (k'). Expresa la capacidad para retener un soluto en la columna. Cuando su valor es muy bajo, los componentes son eluidos demasiado rápido, mientras que si k' es muy alto la elución es muy lenta, se calcula con la siguiente ecuación

$$k' = (t_r / t_0)$$

Número de platos teóricos (N). Es una medida de la eficiencia de la columna, son muchos los factores que afectan este parámetro, algunos de ellos son: el t_r , longitud de la columna, temperatura de la columna y naturaleza del soluto inyectado.

Se calcula con la ecuación

$$N = 16 (t_r / W_b)^2$$

Donde: W_b = ancho del pico medido en su base.

Los parámetros que permiten evaluar la separación entre los picos son:

Retención relativa (α). Es la relación de tiempo para dos solutos que permanecen en la fase estacionaria. También se denomina eficiencia del disolvente¹² ya que mide la selectividad de la fase líquida respecto a los solutos; si $\alpha = 1$ los dos solutos tienen solubilidades idénticas. Mientras más elevados sean los valores de α , será más fácil la separación.

Se calcula con la ecuación

$$\alpha = (t_r'_{(2)} / t_r'_{(1)})$$

donde: $t_r' = t_r - t_0$

$$t_r'_{(2)} > t_r'_{(1)}$$

Resolución (R). La resolución es una medida de la separación de dos componentes en una mezcla. Este término incluye la separación y ancho de los picos, su valor indica el grado de separación entre los picos, un valor de 1.5 o mayor representa una separación de los picos a la línea base, un valor de 1 indica que la separación es adecuada, con un valor menor se tiene dificultad para cuantificar. Se calcula con la siguiente ecuación.

$$R = 2 (t_{r(2)} - t_{r(1)}) / (W_{b(2)} - W_{b(1)})$$

1.5 ANALISIS CUALITATIVO POR CGL

El cromatograma es un registro gráfico del análisis de la muestra donde se indica el perfil de elución de los componentes y dos parámetros de información: el tiempo de retención y el área del pico, los cuales pueden usarse en el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente. La cromatografía de gases no identifica directamente a los compuestos separados, únicamente el número de compuestos, sin embargo cuando se establecen las condiciones del análisis, (temperatura, velocidad de flujo, etc.) es posible la identificación de cada pico por su tiempo de retención (tr), el cual permanece constante para un soluto en particular.

La comparación de los tiempos de retención y la adición estándar es el método que se utiliza para el análisis cualitativo. Para ello, primero por separado, se determinan los tiempos de retención de un componente de la muestra y del compuesto puro que se cree corresponde al de la muestra, los tr deben coincidir. Después en las mismas condiciones de análisis, se adiciona estándar a la muestra original, si los dos compuestos son el mismo, el área del pico se incrementa y el tr no debe cambiar.

1.6 ANALISIS CUANTITATIVO POR CGL

La base del análisis cuantitativo por CGL establece que bajo condiciones constantes de análisis, el área bajo la curva del pico, es proporcional a la concentración del componente. Las técnicas de integración que para el área de los picos se han empleado son: planimetría, triangulación, cortado y pesado del papel, y la integración electrónica, esta última con la ventaja de tener una alta sensibilidad y amplia respuesta lineal. El área se calcula directamente por la señal generada en el detector, lo cual evita errores por medición sobre los cromatogramas.

Los métodos que se emplean para cuantificar son: calibración por estándar externo, normalización de área, estándar interno, adiciones patrón y en ocasiones combinaciones de éstos.

La elección de un método depende de la naturaleza de la muestra, del tipo de inyector y del detector.

1.6.1 CUANTIFICACION POR ESTANDAR INTERNO

El método de estándar interno o calibración relativa, no requiere volúmenes exactos de inyección y permite trabajar con inyectores "split". La dificultad del método es encontrar un estándar interno (EI). El estándar interno debe ser un compuesto de estructura similar a la sustancia que se determina, no estar presente en la muestra, no reaccionar con la muestra, producir un pico bien definido y eluir cerca del compuesto de interés.¹²

La cuantificación por estándar interno consiste en construir una curva de calibración, donde se relaciona el área de cada soluto con el área del pico de EI.

Para ello se preparan muestras de varias concentraciones, con los estándares de los compuestos a cuantificar y con una cantidad constante del EI. Se separan en el cromatógrafo y

se obtiene el área de los picos. La gráfica se construye de la relación de áreas de los picos en función de la relación de concentraciones, obteniendo así la curva de calibración (fig. 1.9).

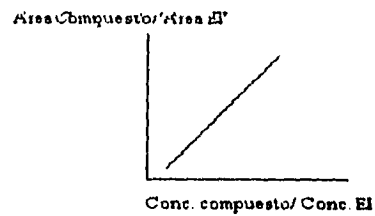


fig. 1.9 Esquema de curva de calibración por estándar interno

Para cuantificar, a la muestra desconocida se le agrega una cantidad del EI, igual a la usada en la curva de calibración, se separan y se relacionan las áreas, entonces a partir de la curva de calibración se leen las relaciones $\frac{\text{Conc. compuesto}}{\text{Conc. EI}}$; como la concentración de EI es conocida es posible calcular la concentración del otro compuesto.

II OBJETIVOS

Objetivo específico

- Evaluar la formación de derivados sililados de azúcares con diferentes sustratos, para desarrollar una técnica de análisis cuantitativo por CGL.

Objetivos particulares

- Aplicar diferentes técnicas de formación de derivado sililado en estándares de azúcares y en un extracto de azúcares de un fruto, para determinar cual es la más adecuada para realizar su análisis cualitativo por CGL.

- Optimizar las condiciones de tiempo y temperatura de reacción para la técnica seleccionada.

- Realizar el análisis cuantitativo de los azúcares de manzana "Starking" con la técnica desarrollada.

III MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL Y REACTIVOS

Estándares de azúcares: arabinosa, fructosa, glucosa, sacarosa, xilosa y salicina

(2-[hidroximetil]fenil β-D-glucopirósido), (Sigma Chemical Co.)

Disolventes: Piridina seca destilada sobre potasa, etanol al 96% y agua destilada.

Reactivos para formar derivado sililado:

Hexametildisilazano (HMDS), Trimetilelorosilano (TMCS),

N,O bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA), (Chemical Company)

Acido trifluoroacético (TFA) (Pierce Chemical Co.)

Clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker S.A de C.V.)

Manzana variedad "Starking" USA #15, almacenada en refrigeración.

Papel filtro Wathman # 5

Viales para reacción (5ml.) con tapa de rosca y sello de silicón (Pierce Chemical Co.)

Aparatos:

-Procesador de Alimentos (Osterizer 4 vel.)

-Cromatógrafo de gases, (Varian 3300) equipado con inyector "split" y detector de ionización de flama

-Integrador (Hewlett-Packard 3390A)

3.2 METODO EXPERIMENTAL

Inicialmente se trabajó con los estándares de azúcares para establecer los tiempo de retención de los derivados sililados y posteriormente se aplicaron las técnicas a los extractos de azúcares en manzana.

3.2.1 EXTRACCION DE AZUCARES DE MANZANA

Para el análisis de azúcares en alimentos por CGL, la extracción se realiza con etanol o metanol acuosos, o agua.^{34,35} Para el análisis de frutos durante la extracción se incluye la adición de solución saturada de acetato de plomo para precipitar los ácidos,^{7,14} pero también se puede omitir,^{17,22} porque su concentración relativa a los azúcares es muy baja, de manera que no afecta la determinación de estos.

La extracción de azúcares se hizo en muestras de manzana "starking" en dos presentaciones: pulpa y manzana entera, homogeneizadas en el procesador de alimentos.

Para la extracción se tomaron porciones de 5 g de pulpa o manzana homogeneizadas y se suspendieron en agua destilada (12.5 mL), para después calentar a punto de ebullición, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se diluyeron con etanol (10 mL); posteriormente se filtraron sobre papel aplicando vacío y el filtrado se diluyó cuantitativamente a 25 mL con etanol.

Para obtener el extracto, se evaporó a sequedad 5 mL del filtrado en un rotavapor.

3.2.2 SELECCION DE LA TECNICA PARA FORMAR EL DERIVADO SILILADO

Para establecer la técnica adecuada para formar el derivado, se ensayaron cuatro métodos: dos producen directamente el derivado TMS del azúcar y dos implican la formación previa de la oxima en el azúcar, para formar posteriormente el derivado sililado (Ox-TMS).

Los cuatro métodos se aplicaron a cada uno de los estándares, en las condiciones de tiempo y temperatura reportadas por Knapp⁴ para el derivado sililado (80°C por 10 min), y por Schaffler³ para formar la oxima (80°C por 30 min). Los métodos ensayados fueron los del cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Métodos de formación para los derivados sililados

Tipo de derivado	Número de método y reactivos
Derivados TMS	1) HMDS/TMCS
	2) BSTFA
Derivados oxima-TMS	3) clorhidrato de hidroxilamina + BSTFA
	4) clorhidrato de hidroxilamina + HMDS / TFA

¹ Formación directa como en fig 1.1 ² Formación previa de la oxima como en fig 1.5

Las técnicas aplicadas para su preparación se describen a continuación.

3.2.2.1 PREPARACION DE DERIVADOS SILILADOS

Métodos 1 y 2

En un vial se pesaron 10 mg del azúcar y se disolvieron en 1 mL de piridina seca, adicionando después el reactivo correspondiente para cada método:

- 1) HMDS (0.2 mL) + TMCS (0.1 mL)
- 2) BSTFA (0.3 mL)

Para formar el derivado se tapó el vial y se agitó por 1 min, después se colocó en baño de nujol a 80°C por 10 min.

Métodos 3 y 4

Obtención de la oxima: En un vial de reacción se pesaron 10 mg del azúcar y se disolvieron en 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina seca (50mg/mL), el vial tapado se colocó en baño de nujol a 80°C por 30 min, y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente por 10 min.

Para formar el derivado Ox-TMS se agregó el reactivo correspondiente al método:

3) BSTFA (0.3 mL)

4) HMDS (0.5 mL) e inmediatamente TFA (0.1 mL)

Las condiciones para estas reacciones fueron como las descritas anteriormente.

Para hacer la evaluación cualitativa de las cuatro técnicas, se realizó el análisis por CGL en las condiciones que se listan en la tabla 3.1.

3.2.3 ANALISIS CUALITATIVO POR CGL DE AZUCARES EN MANZANA

Los derivados de la muestra se prepararon con 10 mg de extracto seco, aplicando las cuatro técnicas y realizando el análisis por CGL en las condiciones indicadas en la tabla 3.1. La identificación de los azúcares en el extracto fue por comparación con los tiempos de retención de los estándares y por adiciones patrón.

3.2.4 OPTIMIZACION PARA LA TECNICA SELECCIONADA

Después del análisis cualitativo se decidió que la técnica que resultaba adecuada para el análisis cuantitativo era formando los derivados oxima-TMS, (método 3) por lo que se optimizaron las condiciones para las reacciones que producen este derivado. La optimización consistió en ensayar diferentes condiciones de temperatura y tiempo de reacción, que dieran resultados cualitativos y cuantitativos mejores o semejantes a los obtenidos en las condiciones iniciales.

La evaluación cuantitativa de cada derivado se hizo utilizando un factor de respuesta (Fr) relativo al estándar interno (EI), el cual se calculó de la relación

$$Fr = (A_x/A_{EI}) \times (C_{EI}/C_x)$$

donde:

A_{EI} = Area de respuesta del EI,

C_{EI} = Concentración del EI,

A_x = Area de respuesta del azúcar x

C_x = Concentración del azúcar x

x = arabinosa, fructosa, glucosa o sacarosa

EI = Estándar Interno (salicina)

3.2.4.1 ENSAYOS DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCION PARA EL DERIVADO Ox-TMS

Estos ensayos se realizaron sólo en los estándares para lo cual se prepararon mezclas de reacción con cada estándar y salicina como EI, (1 mg estándar + 1 mg de EI) para formar los derivados con la técnica descrita en 3.2.2.1 método 3, a la cual para tratar de favorecer la cuantitatividad en la reacción del derivado sililado, se hicieron los siguientes ensayos, variando primero la temperatura y después el tiempo de reacción.

- Las pruebas de temperatura fueron a 115°C y 100°C por 10 min a reflujo.

- Los ensayos de tiempo fueron por 5 y 15 min, a temperatura constante (80°C).

Los resultados de estos ensayos se compararon con los obtenidos de la reacción a 80° C por 10 min.

3.2.4.2 ENSAYOS DE TEMPERATURA Y TIEMPO PARA FORMACION DE OXIMAS

Con el objeto de reducir el tiempo de formación del derivado Ox-TMS se prepararon mezclas de estándares, incluyendo sacarosa, (1 mg de cada azúcar + 1 mg de EI en solución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina 50mg/ml.), para evaluar las condiciones propuestas por Willis²⁴ para la formación de las oximas (60°C por 5 min), también se ensayaron a 80°C por 5 y 10 minutos, en los tres casos la reacción para formar el derivado Ox-TMS fue a 80°C por 10 minutos.

El análisis por CGL de los ensayos fue en las condiciones citadas (Tabla 3.1), probando también diferentes condiciones que permitieran una mejor resolución de los solutos.

3.2.5 ANALISIS CUANTITATIVO POR CGL DE AZUCARES EN MANZANA

Una vez establecida la técnica para formar el derivado sililado, se realizó el análisis cuantitativo de los azúcares extraídos de la manzana variedad "starking". La metodología desarrollada y las condiciones de análisis por CGL se describen en los apéndices I y II.

Tabla. 3.1 Condiciones experimentales del análisis cualitativo por CGL.

Columna	DB-1701. 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m
Flujo de gas acarreador de la columna	Hidrógeno 1.14 cm ³ /min
Relación de split	1:25
Temperaturas:	
Inyector/Detector	250/290°C
Programa de Temperatura	200-235°C a 10°C/min, 235-290°C a 50°C/min, 290°C por 3 min
Nitrógeno ("Make up")	30 cm ³ /min
Hidrógeno	30 cm ³ /min
Aire	300 cm ³ /min

IV RESULTADOS

SELECCION DE LA TECNICA

La formación de subproductos durante la reacción se debe a que las condiciones de la reacción o los reactivos usados no son los adecuados, por tanto, para la selección de la técnica se establecieron los tiempos de retención de los estándares y se consideró el número de subproductos que cada uno generaba con los reactivos seleccionados (tablas 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1 Tiempos de retención de estándares

Azúcar	Tiempo de retención (min)	
	Derivados TMS ¹	Derivados Ox-TMS ²
Arabinosa	1.71	2.01, 2.06
Xilosa	1.98	2.01, 2.04
Fructosa	2.30, 2.19	2.69, 2.74
Glucosa	2.58, 2.95	2.99, 3.13
Salicina (EI)	5.68	5.68
Sacarosa	5.92	5.94

¹ En los azúcares que producen múltiples picos el primer tr corresponde al pico predominante.

² Los tr corresponden a los isómeros de la oxima (anti o sin)

Tabla 4.2 Número de subproductos generados por azúcar con los diferentes reactivos

Reactivos	pH ¹	arabinosa	glucosa	fructosa	sacarosa	xilosa
1) HMDS/TMCS	9.00	3	1	2	0	3
2) BSTFA	9.22	1	1	2	3	1
3) Ox/BSTFA	4.07	0	0	0	0	0
4) Ox/HMDS/TFA	4.00	1	1	0	1	0

¹ pH del medio de reacción pH del reactivo para formar oximas 5.53

Por no haber detectado subproductos en la reacción 3 (oxima/BSTFA), se optimizó esta técnica para hacer el análisis cuantitativo.

ANÁLISIS CUALITATIVO

La aplicación de los diferentes métodos para formar el derivado sililado en los extractos de manzana fue necesaria para comprobar que la técnica seleccionada sería útil en muestras reales y no sólo en las de composición conocida.

Los cromatogramas de las reacciones con HMDS/TMCS, BSTFA, oxima/BSTFA y oxima/HMDS/TFA en los extractos de manzana (Fig. 4.1-4.4), muestran un perfil similar al obtenido con los estándares. Pero en la reacción con HMDS/TMCS el estándar de glucosa generó dos picos en diferentes proporción y no siempre apareció el segundo pico (Fig. 4.1 y 4.5). En el extracto, de acuerdo a lo reportado,¹⁴ los picos corresponden a la α y β glucosa.

El análisis cualitativo por comparación de los tiempos de retención (Tabla 4.1) y adiciones estándar, permitió identificar en los extractos de manzana los azúcares fructosa, glucosa, sacarosa, y detectar la presencia de arabinosa o xilosa (fig 4.3 y 4.4). Estos últimos tienen una estructura similar, y en el análisis por CGL como derivados Ox-TMS eluyeron en juntos ($t_r = 2.01$ min), como derivados TMS no se detectaron en los extractos.

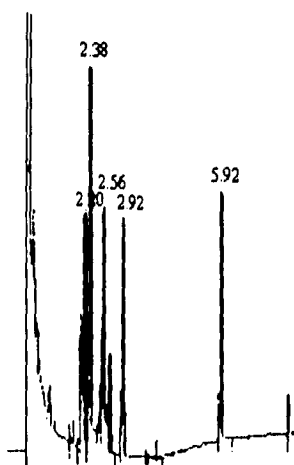


fig. 4.1 Derivados TMS de azúcares en pulpa de manzana
reacción con HMDS/TMCS

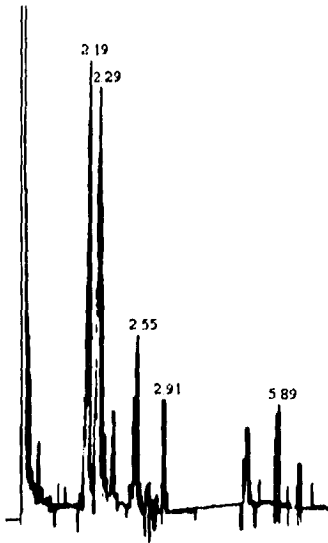


fig. 4.2 Derivados TMS de azúcares en manzana formados con BSTFA

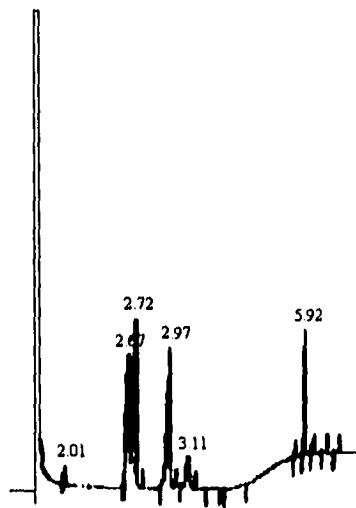


fig. 4.3 Azúcares en manzana como derivados Ox-TMS utilizando BSTFA

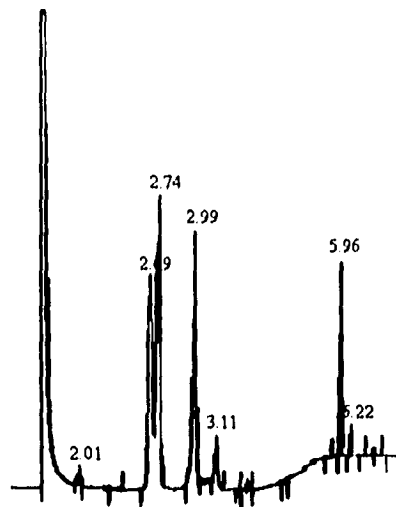


fig. 4.4 Azúcares en manzana como derivados Ox-TMS formados con HMDS/TFA

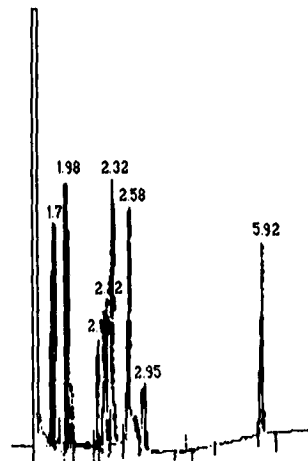


fig. 4.5 Derivados TMS de estándares a partir de HMDS/TMCS con formación de subproductos e isómeros α y β de glucosa tr 2.58 y 2.95 respectivamente

OPTIMIZACION DE LA REACCION PARA FORMAR EL DERIVADO SILILADO

ENSAYOS DE TEMPERATURA

Los ensayos de temperatura a 100°C y 115°C para formar el derivado sililado, ocasionaron la hidrólisis de sacarosa, lo cual no permitiría la cuantificación precisa de sacarosa, y afectaría también las concentraciones iniciales de glucosa y fructosa. (Fig. 4.6 y 4.7)

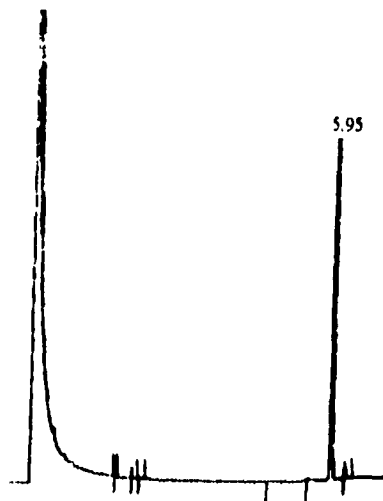


fig. 4.6 Derivado TMS de sacarosa formado a 100 °C a pesar de que no se integraron los picos menores, indican que inició la hidrólisis de la sacarosa

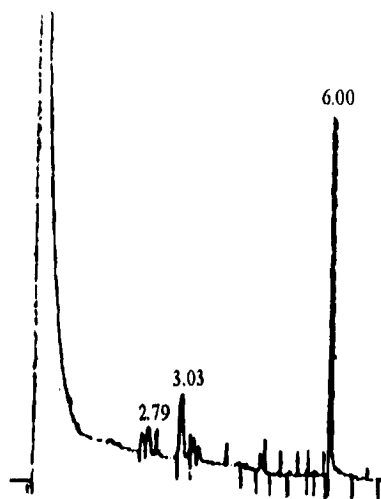


fig. 4.7 Formación del derivado TMS de sacarosa a 115 °C, los picos menores corresponden a los derivados Ox-TMS de fructosa y glucosa, generados por la hidrólisis de la sacarosa

ENSAYOS DE TIEMPO DE REACCION

La modificación del tiempo de reacción en condiciones constantes de temperatura (80 °C), se evaluó con los factores de respuesta de los estándares (tabla 4.3).

FORMACION DE OXIMAS-TMS

La evaluación de las diferentes condiciones de reacción también fue por medio de los factores de respuesta (tabla 4.4)

Tabla 4.3 Factores de respuesta para la formación del derivado sililado*

tiempo de reacción (min)	arabinosa	fructosa	glucosa	sacarosa
5 ^a	1.8117	1.3993	1.5852	1.0418
10	2.3224	1.8778	2.2353	1.5918
15 ^a	1.5638	1.4576	1.5949	1.0793

* Promedio de tres determinaciones, la formación de la oxima fue a 80 °C/ 30 min

^a significativamente iguales ($\alpha = 0.01$)

Tabla 4.4 Factores de respuesta para la formación de oximas*

condiciones de reacción	arabinosa	fructosa	glucosa	sacarosa ¹
60°C / 5 min ^a	2.0591	1.8885	1.9994	1.3668
80°C / 5 min ^{bc}	1.7538	1.4939	1.7064	1.1072
80°C / 10 min ^c	1.4785	1.4138	1.4314	1.1258
80°C / 30 min ^{ab}	2.0883	1.6017	1.5563	1.0524

* Promedio de tres determinaciones como derivados Ox-TMS formados a 80 °C / 10 min ¹ Derivado TMS

^{a b c} Igual índice indica que son significativamente iguales ($\alpha = 0.01$)

Se observó que la resolución entre los picos de isómeros de las oximas de fructosa no era adecuada (fig 4.3 y 4.4), pero con ensayos en diferentes programas de análisis por CGL, se logró mejorar esta separación. Lo mismo ocurrió con los derivados ox-TMS de los estándares de arabinosa y xilosa, donde aunque no hubo separación del producto principal, ésta sí mejoró para los isómeros minoritarios de las oximas, y permitió observar que las proporciones de cada isómero permanecían constantes (tabla 4.5). Debido a la modificación del programa de temperatura los tiempos de retención cambiaron, este aumento del tiempo de retención indica que el compuesto permanece más tiempo en la fase estacionaria, con lo que se consigue mejorar la resolución de los isómeros (fig. 4.8 y tabla 4.6).

Tabla 4.5 Proporción de isómeros en derivados Ox-TMS

Azúcar	Proporción de isómeros (%)		D.R.E*
Xilosa	81.80	18.20	0.12
Arabinosa	75.17	24.83	0.13
Fructosa	42.92	57.08	0.17
Glucosa	81.15	18.85	0.03

* desviación relativa estándar

Tabla 4.6 Evaluación de los programas de temperatura

isómeros de azúcares	condiciones iniciales ¹		condiciones modificadas ²	
	α	R	α	R
xilosa	1.02	0	1.02	0.63
arabinosa	1.04	0.41	1.06	1.60
fructosa	1.05	0.83	1.03	1.40
glucosa	1.06	2.50	1.06	3.60

corresponden a la tabla 3.1 ¹ Tabla 1.2 (apendice 1) α = retención relativa R = resolución

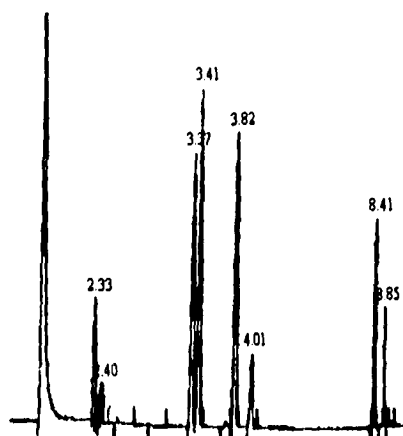


fig. 4.8 Derivados Ox-TMS de estándares. Pares de isómeros en orden de elución: arabinosa, fructosa, glucosa, salicina y sacarosa. Condiciones de análisis: 200 °C por 2 min, 200-270 °C a 10 °C/min, 270 °C por 5 min

ANÁLISIS CUANTITATIVO

La técnica desarrollada para formar el derivado Ox-TMS y condiciones de análisis por CGL para el análisis cuantitativo se describen en los apéndice I y II.

Debido a la baja concentración de arabinosa o xilosa en la muestra no fue posible establecer cual de los azúcares estaba presente, o si era una mezcla de ambos. Las figuras 4.9 y 4.10 indican que lo último era lo más probable. Solamente se integró el pico mayor del cual su t_r (2.35 min) en las condiciones de análisis (fig 4.8) corresponde al producto principal tanto de arabinosa como de xilosa; no se logró integrar los isómeros minoritarios por lo que se decidió cuantificarlo como arabinosa (tablas 4.7 y 4.8), en base a que es el azúcar minoritario del que se ha reportado su presencia en manzanas.²²

Tabla 4.7 Análisis cuantitativo de azúcares en pulpa de manzana¹

Muestra No.	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Arabinosa	Total	Relación G/F ²
1	6.82	3.19	0.64	0.08	10.72	0.47
2	6.17	3.04	0.69	0.09	9.99	0.49
3	7.13	3.51	0.66	0.06	11.37	0.49
Promedio	6.71	3.25	0.66	0.08	10.69	0.48
D.E. ³	0.49	0.24	0.03	0.01	0.70	0.01

¹Cantidades en g/100g de pulpa, ²Brix de la muestras = 12.2

²relación glucosa / fructosa

³desviación estándar

Tabla 4.8 Análisis cuantitativo de azúcares en manzana¹

Muestra No.	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Arabinosa	Total	Relación G/F ²
1	8.63	4.07	0.81	0.11	13.59	0.47
2	7.70	3.65	0.69	0.07	12.11	0.47
3	7.92	3.69	0.83	0.07	12.50	0.47
Promedio	8.08	3.80	0.78	0.08	12.74	0.47
D.E. ³	0.49	0.23	0.08	0.02	0.77	0

¹Cantidades en g/100g de manzana ²Brix de la muestras = 13.3

²relación glucosa / fructosa

³desviación estándar

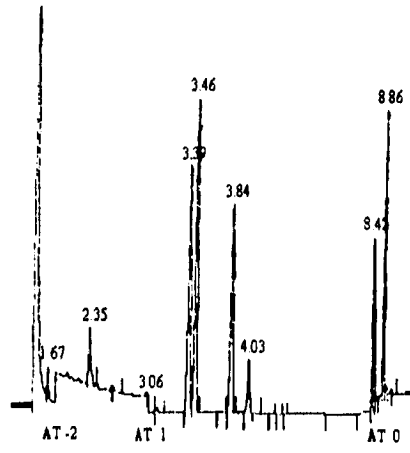


fig. 4.9 Derivados Ox-TMS de azúcares en pulpa de manzana.

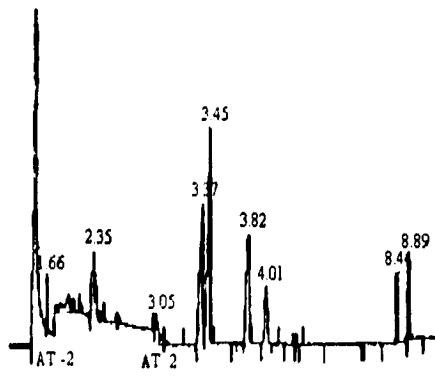


fig. 4.10 Derivados Ox-TMS de azúcares en manzana

V DISCUSION DE RESULTADOS

En la selección de la técnica para la formación del derivado sililado fue importante determinar primero el tiempo de retención del pico predominante, que se asume corresponde al azúcar con los grupos hidroxilo totalmente sustituidos. Los subproductos son debidos a la parcial sustitución de la molécula, lo cual ocasiona pequeñas diferencias en la volatilidad del compuesto. las que se manifiestan durante el análisis por CGL. se retienen más en la columna eluyendo por lo general después del producto principal.

La causa de la diferencia en los tiempos de retención de los derivados obtenidos por las diferentes técnicas, se atribuyeron a las estructuras cíclica y acíclica de los derivados TMS y Ox-TMS, respectivamente. Los derivados acíclicos tienen una mayor afinidad por la fase líquida, debida al nitrógeno de la oxima, que los derivados TMS no tienen, lo cual aumenta su polaridad y su retención en la columna.

Para los derivados TMS de la glucosa, se observó que la formación de los isómeros dependía del estado del azúcar, en el estándar predominó la forma α , y en el extracto de los azúcares de manzana aumentó la proporción de la β -glucosa, esto se debió a que en el extracto se encuentran ambas estructuras, por el tiempo que estuvieron en solución durante la extracción; comparadas con el estándar que estaba en forma cristalina y al disolverlo no se equilibró la proporción de isómeros durante el tiempo de reacción.

El derivado TMS de fructosa también presentó isómeros, pero en la misma proporción tanto en el estándar como en el extracto, estos debieron corresponder a la estructura de furanosa de la fructosa por ser la más estable,²⁷ aunque también podrían existir las formas de piranosa. sin embargo con la información de la CGL. no fue posible asignar la forma anomérica y conformacional de los productos y en la bibliografía consultada no se encontraron reportes de la separación del derivado TMS de fructosa en columna capilar, y para columnas empacadas por la menor resolución que se obtiene reportan un sólo producto.

Para elegir la técnica a optimizar, también se hizo un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para el número de subproductos generados por azúcar, el cual indicó que sería equivalente aplicar cualquiera de las técnicas, sin embargo en los cromatogramas fue notable la diferencia entre las técnicas.

Dos factores a los que se atribuyeron las diferencias observadas en las técnicas para formar el derivado sililado, fueron el pH del medio y la fuerza del reactivo. El medio de las reacciones para los derivados TMS, pudo ser la causa del gran número de subproductos, porque en estas condiciones de pH los azúcares pueden enolizarse y también sufrir fragmentaciones. El BSTFA es un agente muy reactivo, por tanto rápidamente actuó sobre todas las estructuras presentes del azúcar de manera que fueron múltiples los productos, la mezcla de HMDS/TMCS no es tan reactiva, pero también influyó el medio en la formación de subproductos.

Las reacciones con formación previa de la oxima, resultaron independientes de las formas anómeras de los azúcares y generaron menos subproductos, permitiendo una mejor identificación de los azúcares en mezclas, a pesar de los isómeros de las oximas. También permitieron detectar la mezcla de arabinosa y xilosa en la muestra, azúcares que por su baja concentración y por los subproductos que forman como derivados TMS no se detectaron con las dos primeras reacciones. De esta manera los derivados Ox-TMS resultaron la mejor opción para hacer el análisis cualitativo y cuantitativo. La elección del BSTFA, sobre la mezcla de HMDS/TFA fue porque con el primero no se detectaron subproductos, además se facilita agregar sólo un reactivo, disminuyendo así la posibilidad de que la humedad afecte a la reacción.

Durante la optimización de la técnica para el derivado Ox-TMS, se observó que contrariamente a lo reportado,²² no era posible emplear temperaturas superiores a 100°C para favorecer la reacción; a 115 °C fue clara la hidrólisis de sacarosa y a 100°C aun no era muy apreciable pero ya había iniciado. Esta evaluación era necesaria, porque aunque la sacarosa no forma oxima, si estaba en el extracto de manzana y su hidrólisis afecta la cuantificación de glucosa y fructosa. La causa más probable de la hidrólisis, además de la temperatura, fue el pH

del medio pues no se contó con el regulador recomendado, sin embargo el pH usado es el necesario para la formación adecuada de las oximas y a 80°C no hubo problemas de hidrólisis.

La evaluación del tiempo óptimo de reacción y formación de oximas fue con los factores de respuesta (Fr) relativos al estándar interno (EI), casi siempre el valor del Fr de los monosacáridos y de la sacarosa eran, respectivamente, alrededor de 1.5 y 1.1 respecto al EI. En base a esto, eran necesarios 15 minutos para formar el derivado sililado si la oxima se formaba a 80 °C por 30 minutos, pero al optimizar la reacción de la oxima, sólo se necesitaron 10 minutos a 80 °C para cada reacción y formar el derivado Ox-TMS.

Los análisis de varianza para las condiciones de reacción, (tablas 4.4 y 4.5) indican cuales producen factores de respuesta iguales, dentro de un intervalo, a un nivel de confianza,³⁶ obsérvese que la formación de oximas a 60 °C por 5 minutos da altos valores de respuesta, los que pudieron ser causa de baja reactividad del EI en tales condiciones, pero también las reacciones a mayor temperatura y por más tiempo dan resultados similares, ya que no se encontró ninguna correlación de estos datos con las demás reacciones, no se consideró conveniente trabajar con aquellas que daban valores altos de Fr. La reacción que se eligió para el análisis cuantitativo presentó reproducibilidad y uniformidad en la respuesta, también redujo considerablemente el tiempo de preparación de los derivados.

La evaluación de otros programas de temperatura, con los valores de retención relativa (α) y la resolución (R) de los isómeros, indicaron que la selectividad de la columna no aumentó, pues los picos mayores de arabinosa y xilosa continuaron eluyendo juntos, y por tanto para su separación se requiere de otra fase estacionaria. Pero la resolución sí mejoró al incluir un intervalo isotérmico al inicio del programa, con lo cual el valor de R obtenido entre los picos de los isómeros de glucosa, fructosa y arabinosa era aceptable ($R > 1.0$), excepto para los de xilosa donde no siempre se separaba al segundo isómero. Aunque para el análisis cuantitativo no se requiere definir a que estructura, anti o sin, corresponden los productos, definir la proporción de isómeros en los estándares, sí resulta de utilidad para establecer que no hay variación en el

comportamiento de los derivados y que al aplicar la técnica en las muestras es factible detectar si hay otros compuestos eluyendo con el azúcar.

De los cromatogramas del análisis cuantitativo de los azúcares de pulpa y manzana fue posible establecer, que había una mezcla de xilosa y arabinosa, pero no se determinó en que proporción, sólo se cuantificó un pico, porque los picos menores estaban abajo del límite de cuantificación. Estos azúcares por su baja concentración no siempre se cuantifican y reportan en los frutos, pero hacerlo podría servir como característica de la variedad y región de cultivo, puesto que las proporciones de cada azúcar dependen del origen del fruto.

Los resultados del análisis cuantitativo comparados con los reportados por Fourie³⁴ para la manzana "Starking", indican que la fructosa siguió siendo el principal azúcar, se presentaron diferencias para la glucosa y sacarosa, las cuales se atribuyen al origen del fruto y al estado de maduración, la concentración de sacarosa resultó más baja probablemente causada por la maduración, como indican los °Brix. La mezcla de xilosa y arabinosa estaba en la misma cantidad en la pulpa que en la manzana entera, por lo que su origen debió ser de los polisacáridos de la pulpa. El incremento calculado de azúcares en la manzana entera, se consideró que aunque en los frutos si hay aporte de azúcares por la cáscara y paredes celulares,^{31,33,40} este sería principalmente en los azúcares minoritarios, el aumento encontrado de estos fue mínimo, por lo que la mayor concentración de fructosa, glucosa y sacarosa en manzana entera podría estar más relacionado al estado de maduración que a la cáscara. En los resultados se incluyeron los valores de la relación G/F, esta relación es un parámetro establecido por Mattick y Moyer,³² su valor presenta menor variación (tablas 4.7 y 4.8) que los valores individuales de glucosa y fructosa en el caso de que ocurra hidrólisis de sacarosa por el almacenamiento del fruto, tiene un intervalo (0.16-0.60) y se emplea para detectar adulteraciones en jugos de manzana,³⁸ pero también resultó aplicable para la manzana fresca.

VI CONCLUSIONES

- La formación de derivados TMS de azúcares con HMDS/TMCS y BSTFA produjo al menos un subproducto por cada azúcar presente, dificultando el análisis cualitativo de mezclas, lo que además interfiere en la determinación de azúcares que están en baja concentración, sin embargo los reactivos resultaron adecuados para los derivados Ox-TMS.

- El análisis de CGL en columna capilar, permitió separar los derivados TMS de los isómeros de la fructosa, pero aun falta establecer a que estructuras corresponden los productos.

- Fue posible la formación de oximas de monosacáridos y del derivado Ox-TMS, ambas reacciones a 80 °C por 10 minutos, lo que disminuye el tiempo de preparación y resulta de utilidad cuando el número de muestras a analizar es grande.

- La formación de derivados Ox-TMS de azúcares, simplificó el análisis de mezclas con fructosa y glucosa, la proporción de los isómeros formados se mantuvo constante, y fue independiente de la fuente del azúcar. Esto es de utilidad para detectar si hay otros productos eluyendo con el azúcar, y es una mejor opción para el análisis cualitativo y cuantitativo de azúcares.

- La separación de los isómeros de las oximas de xilosa y arabinosa se podría mejorar empleando una fase estacionaria selectiva. Durante el presente estudio no se logró su separación ni cuantificación individual en la muestra, pero hacerlo permitiría establecer otro dato sobre el contenido de azúcares del fruto, que son característicos de la variedad y de la región de cultivo.

- La utilidad de la metodología desarrollada (apéndice I) se demostró con su evaluación (apéndice II) y con el análisis cuantitativo de azúcares en manzana, y tanto el método de extracción, como el de análisis por CGI., podrían ser aplicados a frutos de características similares y productos relacionados como son jugos y concentrados de frutas, para establecer su autenticidad en base al perfil de azúcares.

- La utilidad de la metodología desarrollada (apéndice I) se demostró con su evaluación (apéndice II) y con el análisis cuantitativo de azúcares en manzana, y tanto el método de extracción, como el de análisis por CGL, podrían ser aplicados a frutos de características similares y productos relacionados como son jugos y concentrados de frutas, para establecer su autenticidad en base al perfil de azúcares.

APENDICE I**TECNICA DE ANALISIS CUANTITATIVO DE AZUCARES
COMO DERIVADOS OX-TMS POR CGL****Método de estándar interno**

Métodología aplicada al análisis de Manzana "Starking"

Se Prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A, clorhidrato de hidroxilamina en piridina (50 mg/mL)
- Solución B, salicina (1 mg/mL en solución A)
- Solución de EI, salicina (10 mg/mL en solución A)
- Solución "stock" de estándares (25 mL), preparada en solución A con diferentes concentraciones de azúcar (Tabla I.1).

Tabla I.1 Solución "stock"

Azúcar	mg / mL en solución A
Arabinosa	2.0080
Fructosa	11.9920
Glucosa	6.0040
Sacarosa	1.9960

Para obtener la curva de calibración, de la solución "stock" se tomaron diferentes volúmenes (5, 3.75, 2.5, 1.25, 0.75, 0.25 y 0.1 mL), a cada uno se le agregó 1 ml de solución de EI y se diluyó cuantitativamente a 10 mL con solución A.

Para formar los derivados de la dilución correspondiente, se puso en un vial de reacción una alícuota de 1 mL, y se calentó a 80°C por 10 min, después de enfriar a temperatura ambiente por 10 min, se adicionó BSTFA (0.3 mL), se agitó por 1 min y se calentó a 80 °C por 10 min.

Para el análisis de las muestras se pesaron 8.0 ± 0.2 mg del extracto seco y se disolvieron en 1 mL de solución B, para formar los derivados se aplicó la técnica descrita anteriormente.

Para el análisis por CGL se inyectó 1 microlitro de la mezcla de reacción. Los detalles del análisis cuantitativo por CGL se listan en la Tabla 1.2.

La curva de calibración para cada azúcar se contruyó de la relación A_x/A_{EI} en función de Conc. de x /Conc. de EI.

Tabla 1.2 Condiciones experimentales del análisis cuantitativo por CGL

Columna	DB-1701. 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm
Flujo de gas acarrendor	Hidrógeno 1.36 cm ³ /min
Relación de split	1:191
Temperaturas	
Inyector/Detector	250/290°C
Programa de temperatura	200°C por 2 min, 200-270°C a 10°C/min, 270°C por 5 min
Nitrógeno ("Make up")	30 cm ³ /min
Hidrógeno	30 cm ³ /min
Aire	300 cm ³ /min

APENDICE II

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA

La evaluación de la técnica por CGL se realizó en base a los siguientes parámetros:

- **linealidad del sistema.** Es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia a determinar. Se realiza construyendo una curva de calibración, graficando respuesta medida contra concentración, donde se demuestra que las determinaciones analíticas son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro del intervalo determinado.

El sistema evaluado se obtuvo de las diluciones de la solución "stock" (tabla II.1)

Tabla II.1 Relación de diluciones de la solución "stock"

Dilución ²	arabinosa ¹	fructosa	glucosa	sacarosa
5/10	1.0040	5.9960	3.0020	0.9980
3.75/10	0.7530	4.4970	2.2515	0.7485
2.5/10	0.5020	2.9980	1.5010	0.4990
1.25/10	0.2510	1.4990	0.7505	0.2495
0.75/10	0.1506	0.8999	0.4503	0.1497
0.25/10	0.0502	0.2998	0.1501	0.0499
0.1/10	0.0201	0.1199	0.0600	0.0199

¹ Concentración en mg/mL, todas las diluciones incluyen 1.0005 mg de EI / mL

² mL "stock"/volumen final

Linealidad del sistema. Evaluada con las áreas de respuesta del pico (tabla II.2), para los monosacáridos el área utilizada fue la suma de los dos isómeros.

Tabla II.2 Curvas de calibración para estándares*

arabinosa		fructosa		glucosa		sacarosa	
Aa/A _{EI}	Ca/C _{EI}	Af/A _{EI}	Cf/C _{EI}	Ag/A _{EI}	Cg/C _{EI}	As/A _{EI}	Cs/C _{EI}
1.4785	0.9990	8.4770	5.9363	4.2972	2.9871	1.1237	0.9930
1.2808	0.7493	6.9098	4.4746	3.7471	2.2403	0.7308	0.7448
0.8445	0.4995	4.6262	2.9831	2.2456	1.4935	0.4961	0.4965
0.5319	0.2495	2.6612	1.4915	1.3356	0.7468	0.2727	0.2483
0.2855	0.1499	1.4014	0.8949	0.6630	0.4481	0.1469	0.1490
0.1519	0.0500	0.6315	0.2983	0.2198	0.1494	0.0533	0.0197
0.0612	0.0200	0.3040	0.1193	0.1606	0.0597	0.0247	0.0198
r = 0.9869		r = 0.9922		r = 0.9938		r = 0.9907	

* Ax/A_{EI} relación de áreas de respuesta del azúcar / estándar interno
r = coeficiente de correlación de la curva

- Sensibilidad, es cualitativa y cuantitativa mediante el límite de detección, o la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada; y el límite de cuantificación es la menor concentración de una sustancia la cual puede ser determinada con precisión aceptable bajo las condiciones de operación.

Los límites de detección corresponden a la última dilución de la curva de calibración (tabla II.3).

Tabla II.3 Límites de cuantificación en estándares

	arabinosa		fructosa ²	glucosa ²	sacarosa
	isómero 1	isómero 2			
límite de detección (ng)	0.0181	0.0069	0.6245	0.3125	0.1036
D.R.E	6.67	14.18	0.25	0.22	9.07

¹ isómeros numerados en orden de elución
² suma de los dos isómeros D.R.E: desviación relativa estándar

Para los resultados de la respuesta de azúcares en pulpa y manzana (tabla II.4) el área cuantificada con arabinosa corresponde al pico del primer isómero, los picos menores se encontraron abajo del límite de cuantificación.

Tabla II.4 Relación de respuestas para las muestras e interpolaciones

muestra	arabinosa		fructosa		glucosa		sacarosa	
	Aa/A _{EI} ¹	Ca/C _{EI} ²	Af/A _{EI}	Cf/C _{EI}	Ag/A _{EI}	Cg/C _{EI}	As/A _{EI}	Cs/C _{EI}
pulpa No.								
1	0.0595	0.0371	5.3949	3.6125	2.6548	1.7782	0.4332	0.4061
2	0.0769	0.0479	6.3409	4.2459	2.9661	1.9867	0.4292	0.4023
3	0.1034	0.0644	7.7610	5.1969	3.8264	2.5629	0.5155	0.4832
manzana No.								
1	0.0863	0.0538	6.3212	4.2328	2.9859	1.9999	0.4218	0.3954
2	0.0636	0.0396	6.1960	4.1489	2.9093	1.9486	0.3923	0.3677
3	0.0544	0.0339	6.0906	4.0783	2.8254	1.8991	0.4538	0.4254

Promedios de análisis por triplicado: ¹ relación de áreas ² resultado de interpolación

- Se evaluó la especificidad (tabla II.5), para demostrar que la respuesta obtenida se debe exclusivamente a la sustancia de interés y no a otros compuestos de la muestra o productos de degradación. La relación de isómeros no difiere de la calculada en los estándares (ver tabla 4.5).

Tabla II.5 Especificidad de la determinación en las muestras de pulpa y manzana

	fructosa ¹		glucosa ¹	
	isómero 1	isómero 2	isómero 1	isómero 2
proporción	45.72*	54.28	79.08	20.92
D.R.E. ²	0.66	0.65	0.70	2.66

* valores en %, promedio de 12 determinaciones ¹ isómeros numerados en orden de elución
² desviación relativa estándar

Referencias

1. Sweeley, C.C. Bentley, R., Makita, M. & Wells, W. Gas-liquid Chromatography of TMS derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963)
2. Frank, H., Das Neves, H.J.C. & Bayer, E. Gas Chromatography of monosaccharides: Formations of a single derivative for each aldose. *J. Chromatogr.* **207**, 213-220 (1981)
3. Schäffler, K.J. & Morel Du Boil, P.G. Quantitative gas chromatographic analysis of sucrose in the presence of sugar oximes using a buffered oximation reagent and glass capillary columns. *J. Chromatogr.* **207**, 221-229 (1981)
4. Knapp, D.R. Handbook of analytical derivatization reactions p. 542 John Wiley & sons, Inc. US (1979)
5. Official Methods of Analysis of the AOAC, secs. 22.084-22.085 13th Edition p. 369 US (1980)
6. Bradbury, A.G. Gas chromatography of carbohydrates in food. In Principles and applications of GC in food analysis, Editor Gordon M.H. Chap. 4 Ellis Horwood Ltd. Great Britain (1990)
7. Kline D.A., Fernandez, E., & Johnson, A.R. Quantitative determination of sugars in fruits by GLC separation of TMS derivatives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **51**, 1198-1202 (1970)
8. Angyal, S.J. The composition of reducing sugars en solution. *Advan. Carbohydr. Chem. & Biochem.* **42** 15-62 (1984)
9. Willard, H. Instrumental methods of analysis Van Nostrand Co 6th Edition Chap. 15 and 16 US (1981)
10. Fritz, J.S., & Schenk, G.H. Quantitative analytical chemistry Allin & Bacon Chap 19 Boston, US (1978)
11. Gordon, M.H. Principles of gas Chromatography. In Principles and applications of GC in food analysis. Editor Gordon M.H. Chap. 1 Ellis Horwood Ltd, Great Britain (1990)
12. McNair, H.M. Cromatografia de gases. Cap. 1 y II O.E.A. Washington D.C. EU (1981)
13. Jennings, W. Gas Chromatography with glass capillary columns. 2nd Edition p. 1 Academic Press Inc. US (1980)
14. Carbohydrates in Fruit Juices Gas Chromatographic method 971.18 Official Methods of Analysis of the AOAC 15th Edition Vol II p. 922 US (1990)
15. Herry, J.W. Gas chromatography of carbohydrates. In Advances in Chromatography. Editor Giddins J.C. Chap. 7 Marcel Dekker Inc. US (1966)
16. Lichon, M.J. Sample Preparation for chromatographic analysis food. *J. Chromatogr.* **624**, 3-9 (1992)
17. Fourie, P.C., & Bassons, D.S. Sugar content of almond, pecan, and macadamia nuts. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 101-104 (1990)
18. Official Methods of Analysis of the AOAC, Method 906.03 p 580 14th edition US (1984)
19. Chromatography products 1994 p. 554-561 Supelco, Inc (1994)
20. Bentley, R. & Botlock, N. A gas chromatographic method for analysis of anomeric carbohydrates and for determination of mutarotation coefficients. *Anal. Biochem.* **20**, 312-320 (1967)
21. Reusch, W.H. An introduction to organic Chemistry. p. 375-376 Holden-Day Inc. US (1977)
22. Morvai, M., & Molnár-Perl, I. Simultaneous determination of organic acids in apples by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **520**, 201-207 (1990)

23. Anderle, D., & Königstein, J. Separation of trioses and tetroses as trimethylsilyl oximes by gas chromatography *Anal. Chem.* **49**, 137-139 (1977)
24. Willis, D.E. GC Analysis of C2-C7 Carbohydrates as the trimethylsilyl-oxime derivatives on packed and capillary columns. *J. Chromatogr. Sci.* **21**, 132-138 (1983)
25. Norman, R.O.C. and Coxon J.M. Principles of organic synthesis p. 311 Blackie academic & professional Great Britain (1993)
26. Pine, S.H. Química Orgánica 2a ed. p. 508 McGraw-Hill México (1991)
27. Badui, S. Química de los alimentos 2a ed. p 46 Alhambra Mexicana, México (1990)
28. Bishop, C.T. In Methods of biochemical analysis. Editor Glick, D Vol 10 p. 1 Interscience Publishers, Inc New York, US (1962)
29. Pomeranz, Y., & Meloan C.E. Food analysis, theory & practice Chap. 35 AVI Publishing Co. Inc. US (1982)
30. Jacobs, M.B. The chemical analysis of foods and food products. 3th ed. p. 447 R. Krieger Publishing Co. Inc. US (1973)
31. Harris, P.J., & Blakeney, A.B. Gas Chromatographic determination of the monosaccharide composition of plant cell wall preparations *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 272-275 (1988)
32. Mattick, L.R. & Moyer, J.C. Composition of apple juice *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 1251-1235 (1983)
33. Lee, C.Y. & Mattick, L.R. Composition and nutritive values of apple products. In Processed Apple Products Editor Downing D.L. Chap. 14 Van Nostrand Reinhold New York US (1989)
34. Fourie, P.C., Hansmann, C.F. & Oberholzer, H.M. Sugar content of fresh apples and pears in South Africa *J. Agric. Food Chem.* **39** 1938-1939 (1991)
35. Saura-Calixto, F., Canellas, J. Gas chromatographic analysis of sugars and sugar alcohols in the mesocarp, endocarp and kernel of almond fruit *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1018-1020 (1984)
36. O'Mahoney, M. Sensory evaluation of food. Statistical methods and procedures p. 157 Marcel Dekker Inc. US (1986)
37. Hedgley, E.J. and Overend, W.G. Trimethylsilyl derivatives of carbohydrates. *Chem. & Ind* 378-380 London U.K. (1960)
38. Lee, H S., & Wrolstad, R E. Apple juice composition: sugar, nonvolatile acid, and phenolic profiles. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 789-79 (1988)
39. James, A.T., & Martini, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid *Biochem. J.* **50**, 679 (1952)
40. Gross, K.C. & Sams, C.E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey *Phytochemistry* **23**, 2457-2461 (1984)