

Calificación de un sistema de HPLC-IR para la cuantificación de carbohidratos de diversas composiciones

Isi Veitia Coba*, Javier David Brizuela Cardoso, Jose Miguel Fernández Torres, Duniesky Martínez García, Enrique Pérez Cruz

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Sancti Spíritus, Sancti Spíritus, Cuba, Apartado 83, Código Postal 60200, Teléfono: (53-41) 32 6273, 32 8126, Fax: (53-41) 32 8539

*Autor para correspondencia: isi.veitia@cigb.edu.cu

Recibido: 15 de junio de 2022

Revisado: 6 de julio de 2022

Aceptado: 13 de julio de 2022

RESUMEN

Introducción: los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes en la naturaleza. Su importancia va desde aspectos nutricionales hasta aplicaciones industriales. Entre la inmensa variedad de carbohidratos se encuentran los fructooligosacáridos considerados prebióticos; los azúcares invertidos, de importancia industrial por su alto poder edulcorante; las dextranas, con diversas aplicaciones, pero cuya presencia en jugos de caña provoca afectaciones en la producción azucarera. Las investigaciones y aplicaciones relacionadas con carbohidratos requieren la obtención de datos fiables sobre las cinéticas de síntesis y degradación de los mismos. Uno de los métodos de cuantificación de los carbohidratos es mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de índice de refracción (IR). **Objetivo:** calificar un equipo de HPLC acoplado a un detector de índice de refracción (IR) para la validación del método de cuantificación de carbohidratos. **Metodología:** la calificación del HPLC-IR se realizó según la *Guía para la calificación del equipamiento - Anexo 1* de 2011. Se evaluó la exactitud del flujo de la bomba, la precisión y linealidad del inyector manual, la exactitud y estabilidad de la temperatura del horno, así como la linealidad y relación señal/ruido en el detector IR. **Resultados:** este trabajo demostró que el sistema HPLC-IR se desempeña de manera consistente de acuerdo con las especificaciones del fabricante, de esta forma se aseguró el rendimiento correcto del equipo en condiciones reales de

funcionamiento. **Conclusión:** la calificación satisfactoria del instrumento analítico permitió la validación del método de cuantificación de carbohidratos mediante esta tecnología.

Palabras clave: Calificación, HPLC, índice de refracción, validación, carbohidratos, FOS.

SUMMARY

Qualification of an HPLC-IR system for the quantification of carbohydrates of various compositions

Introduction: Carbohydrates are the most abundant biomolecules in nature. Its importance goes from nutritional aspects to industrial applications. Among the immense variety of carbohydrates are the fructooligosaccharides considered prebiotics; inverted sugars, of industrial importance due to their high sweetening power; dextrans, with various applications, but whose presence in cane juice affects sugar production. Research and applications related to carbohydrates require obtaining reliable data on their synthesis and degradation kinetics. One of the carbohydrate quantification methods is by means of a high-performance liquid chromatography (HPLC) equipment coupled to a refractive index (IR) detector. **Objective:** To qualify a HPLC equipment coupled to a refractive index (IR) detector to validate the carbohydrate quantification method. **Methodology:** The qualification of the HPLC-IR was carried out according to the *Guide for the Qualification of the Equipment - Annex 1* of 2011. The accuracy of the flow of the pump, the precision and linearity of the manual injector, the accuracy and stability of the temperature of the oven, as well as the linearity and signal/noise ratio in the IR detector were determined. **Results:** This work showed that the HPLC-IR system performs consistently according to the manufacturer's specifications, thus ensuring the correct performance of the equipment under real operating conditions. **Conclusion:** The satisfactory qualification of the analytical instrument allowed the validation of the carbohydrate quantification method using this technology.

Keywords: Qualification, HPLC, refractive index, validation, carbohydrates, FOS.

RESUMO

Qualificação de um sistema HPLC-IR para a quantificação de carboidratos de várias composições

Introdução: os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Sua importância vai desde aspectos nutricionais até aplicações industriais. Dentre a imensa variedade de carboidratos estão os frutooligosacarídeos considerados prebióticos; açúcares invertidos, de importância industrial devido ao seu alto poder adoçante; dextrans, com diversas aplicações, mas cuja presença no caldo de cana afeta a produção de açúcar. Pesquisas e aplicações relacionadas a carboidratos requerem a obtenção de dados confiáveis sobre sua síntese e cinética de degradação. Um dos métodos de quantificação de carboidratos é por meio de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado a um detector de índice de refração (IR). **Objetivo:** qualificar um equipamento de HPLC acoplado a um detector de índice de refração (IR) para a validação do método de quantificação de carboidratos. **Metodologia:** a qualificação HPLC-IR foi realizada de acordo com o *Guia para a qualificação do equipamento - Anexo 1* da 2011. A precisão do fluxo da bomba, a precisão e linearidade do injetor manual, a precisão e estabilidade da temperatura do forno, bem como a linearidade e relação sinal/ruído no detector IR. **Resultados:** este trabalho demonstrou que o sistema HPLC-IR funciona consistentemente de acordo com as especificações do fabricante, garantindo assim o correto desempenho do equipamento em condições reais de operação. **Conclusão:** a qualificação satisfatória do instrumento analítico permitiu a validação do método de quantificação de carboidratos utilizando esta tecnologia.

Palavras-chave: Qualificação, HPLC, índice de refração, validação, carboidratos, FOS.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha llegado a ser una de las técnicas de laboratorio más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos, dada su sensibilidad y fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. Esta técnica permite la separación, identificación y cuantificación de los azúcares presente en muestras orgánicas [1].

La Conferencia Internacional de Armonización (conocida por sus siglas en inglés ICH) planteó la necesidad de validación de los métodos analíticos con el objetivo de demostrar que es adecuado para el propósito previsto, así como ofrecer robustez y confianza a los datos obtenidos [2].

La validación de una técnica analítica es la recopilación de evidencia científica de que un procedimiento es adecuado para el uso previsto. Un procedimiento validado con instrumentos analíticos calificados proporciona la confianza de que el procedimiento generará prueba de datos de calidad aceptable [3].

La calificación de instrumentos analíticos (AIQ) es un requisito previo para la validación de cualquier método y, por lo tanto, debe considerarse como una base vital para la integridad y la calidad de los datos [4]. Se han establecido etapas para la calificación del equipamiento: calificación de diseño (DQ), calificación de instalación (IQ), calificación de operación (OQ) y calificación de desempeño (PQ). La DQ es la parte donde el diseño y las características técnicas de un instrumento están predefinidos tomando en cuenta las especificaciones de requisitos del usuario (URS). La IQ establece que el instrumento se recibe tal como fue diseñado y que está correctamente instalado. La OQ de un equipo para HPLC se lleva a cabo de forma modular con la intención de garantizar que los módulos específicos del sistema y todo el sistema funcionan de acuerdo con las especificaciones definidas. La PQ demuestra que un instrumento se desempeña de manera consistente de acuerdo con las especificaciones definidas por el usuario y es apropiado para el uso previsto, de esta manera se asegura el rendimiento satisfactorio de un instrumento en condiciones reales de funcionamiento [3, 5, 6].

En nuestro laboratorio la cuantificación de carbohidratos se realiza por HPLC acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-IR). Esta técnica ha permitido cuantificar diversos carbohidratos tales como fructooligosacáridos [7], dextranas [8] o azúcares invertidos [9, 10]. Sin embargo, debido a los años de explotación del equipamiento se requirió un mantenimiento general del mismo, lo cual implica una recalificación para su puesta en marcha. La calificación debe realizarse a los diferentes componentes del sistema HPLC-IR de manera que puedan lograrse buenos resultados en la validación del método analítico, pues se necesita demostrar previamente que el sistema trabaja de forma satisfactoria de acuerdo a los requisitos especificados. El objetivo de este trabajo fue la calificación del equipo de HPLC acoplado a un detector de IR para la validación del método analítico de cuantificación de carbohidratos.

METODOLOGÍA

Equipos

Se empleó un cromatógrafo para líquidos Merck Hictachi® Lachrom (Alemania), equipado con una bomba de fase móvil (modelo L-7100), horno para columna (modelo L-7350) y un detector de índice de refracción Knauer Differential-Refractometer (modelo 2300) (Alemania). Se utilizó una columna Aminex HPX 42-C (BioRad, Richmond, Estados Unidos) con precolumna Carbo C (BioRad, Richmond, Estados Unidos), inyector con un lazo de 20 μ L y jeringuilla Hamilton® de 50 μ L. La salida analógica del detector se encuentra conectada a un dispositivo NI USB-6008 (interfaz de adquisición de datos de National instrument) que provee 8 canales analógicos de entrada, con un interfaz USB de alta velocidad conectada a un ordenador que permite el registro de la señal mediante el uso del *software* AdqUSB4. Los datos registrados son exportados al *software* ezData (www.chemilab.net), para integrar y calcular el tiempo de retención, altura, altura media del pico y área bajo la curva.

La calificación de la instalación (IQ) se realizó mediante pruebas cualitativas y cuantitativas de los componentes del equipo (módulos). Se verificaron el inyector, la bomba, el detector, el horno para la columna, los *hardware/software*, el cableado, el chasis, los sensores, controles e interruptores, el *software*/pantalla, las señales sonoras, las alarmas y la documentación del equipo.

Para la calificación de operación (OQ) se evaluó cada módulo del equipo HPLC de forma individual, se basó en las especificaciones de diseño del fabricante (bomba, inyector manual, horno de columna, detector y *hardware software*).

La calificación de desempeño (PQ) evaluó parámetros para determinar el rendimiento del instrumento en condiciones reales de funcionamiento. Se tomó como criterio de aceptación lo planteado en la *Guía para la calificación del equipamiento* (anexo 1) [5]. Los cálculos matemáticos se realizaron en el programa Excel 2010 y en el software MATLAB (versión R2015a).

Determinación de la exactitud del flujo en la bomba

Se evaluaron tres velocidades de flujo (0,2 mL/min, 0,3 mL/min y 0,5 mL/min), comprendidas en el rango de operaciones del equipo a escala analítica, se purgó el sistema y puso en funcionamiento asegurando que no había burbujas. Se utilizó agua desgasificada para HPLC como fase móvil. El flujo de salida fue colectado durante 4 min en una probeta graduada y calibrada (Oficina Territorial de Normalización de Villa Clara, www.otn.vcl.cu), el tiempo se midió con un cronómetro calibrado (Oficina Territorial

de Normalización de Villa Clara, www.otn.vcl.cu). Se repitió cinco veces esta operación y se determinó el promedio de cada volumen. La desviación (D_f) se calculó como el valor porcentual de la diferencia absoluta entre la media del flujo medido (f) y el flujo fijado en la bomba (F) dividido por el flujo fijado en la bomba ambos en mL/min (ecuación 1). El criterio de aceptación fue de $D_f \pm 5\%$.

$$D_f = \left(\frac{f - F}{F} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Determinación de la precisión y linealidad del inyector manual

La evaluación se realizó con agua desgasificada para HPLC como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min. Para la preparación de la solución de referencia se utilizó sacarosa (Sigma-Aldrich, USA). A partir de la solución de sacarosa a una concentración de 40 mg/mL se realizaron inyecciones para cada volumen seleccionado (5, 10, 15 y 20 μ L) (2 analistas, 2 días cada uno y 3 réplicas por analista). Se registró el tiempo de retención, el área y la altura del pico en cada perfil cromatográfico. Se evaluó la precisión intra-ensayos (repetibilidad) y la precisión inter-ensayos que contempla la variabilidad debida al error experimental y a los analistas. La precisión se determinó mediante el coeficiente de variación (CV) de las áreas y de las alturas de los picos obtenidos en cada cromatograma (ecuación 2). El criterio de aceptación fue un $CV \leq 1\%$.

$$CV = \left(\frac{DS}{media} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde DS es la desviación estándar.

La linealidad se calculó con la media de las alturas medidas para cada volumen de inyección, se obtuvo la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (R^2). El criterio de aceptación utilizado para autoinyectores es un $R^2 \geq 0,999$.

Exactitud de la temperatura del horno para columna

Se evaluaron tres temperaturas (40 °C, 60 °C y 85 °C) que comprenden el rango de operaciones del equipo de HPLC. Se colocaron los sensores de temperatura (UTT10K termopares calibrados, UNI-T, China) en diferentes posiciones del horno (parte anterior, media y posterior). El horno se ajustó a la temperatura deseada, una vez equilibrado el sistema, se realizaron tres mediciones durante 15 min. La desviación de la temperatura (D_T) se calculó como la diferencia absoluta entre la media de la temperatura medida (t) y la temperatura fijada (T) (ecuación 3). El criterio de aceptación fue de $D_T \pm 2$ °C.

$$D_T = t - T \quad (\text{Ec. 3})$$

La estabilidad se calculó para cada temperatura como la diferencia entre la temperatura más alta y más baja de las tres lecturas en una misma posición. Como criterio de aceptación se consideró una diferencia $D_T \leq 1^\circ\text{C}$.

Calificación del detector de índice de refracción (Knauer)

Se utilizó como fase móvil agua desgasificada para HPLC a un flujo de 0,5 mL/min. Se inyectaron 25 μL de la solución de referencia de sacarosa a cuatro concentraciones diferentes (5, 10, 20 y 40 mg/mL), el experimento se realizó por triplicado. Se registró el tiempo de retención, el área y la altura del pico en cada perfil cromatográfico. Para el cálculo de la linealidad se determinó la media de las alturas medidas para cada concentración, se obtuvo la ecuación de regresión lineal y se calculó el coeficiente de determinación (R^2). El criterio de aceptación fue un $R^2 \geq 0,995$.

Para el cálculo del ruido de la línea de base se utilizó como fase móvil agua desgasificada para HPLC a un flujo de 0,5 mL/min. Se inyectaron 3 réplicas de la solución blanco (fase móvil) durante un tiempo de ejecución donde el sistema fue estable. Se midió el ruido de la línea base durante 20 min. Como criterio de aceptación se consideró una altura media de las tres réplicas $< 1000 \mu\text{V}$. Para calcular la relación señal/ruido (S/R) se inyectó tres veces la solución de referencia de sacarosa a una concentración de 5 mg/mL y se calculó la media de las réplicas (ecuación 4). El criterio de aceptación fue una relación $S/R \geq 10$.

$$SN/R = 2H/h \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde H es la altura del pico para cada perfil cromatográfico y h es la altura del ruido de la línea base.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calificación de los diferentes componentes del sistema HPLC-IR es un aspecto de vital importancia para la validación del método analítico de cuantificación de carbohidratos.

Calificación de la instalación

Para la IQ del equipo para HPLC se verificó que el lugar de instalación estuviera libre de polvo, gases corrosivos y grandes campos magnéticos. Se corroboró que las dimensiones y estabilidad de las mesetas eran las adecuadas. La temperatura del local se mantuvo en $20 \pm 2^\circ\text{C}$, la humedad relativa $50 \pm 5\%$ y la alimentación eléctrica fue de $220 \pm 5 \text{ V}$. Con la calificación de instalación se verificó además que los distintos módu-

los del sistema estaban correctamente instalados según los requisitos especificados por los proveedores y el entorno era el adecuado para su funcionamiento.

La farmacopea americana para la calificación de instrumentos analíticos categoriza a los equipos para HPLC en el grupo C [3]. Este grupo incluye instrumentos y sistemas analíticos computarizados, donde los requisitos del usuario para la funcionalidad, los límites operativos y de rendimiento son específicos para la aplicación analítica.

La calificación del equipo para HPLC-IR se realizó mediante pruebas de funcionamiento y de rendimiento específicas, que incluyen la calificación de operación a nivel modular y la verificación de parámetros para evaluar el desempeño del equipo en tiempo real. Se tuvieron en cuenta los criterios planteados por Kaminski con el objetivo de disminuir los tiempos de operaciones y el costo del proceso [4].

Calificación de la bomba

En un sistema para HPLC, la bomba constituye una de sus partes más importantes, de su buen funcionamiento dependen la calidad de separación y la precisión del ensayo analítico, sobre todo en un método cuantitativo [11]. La evaluación de la bomba se realizó en un rango de operaciones que cubre los flujos más utilizados a escala analítica. La tabla 1 muestra los resultados de la exactitud del flujo isocrático en la bomba L-7100.

Tabla 1. Evaluación de la exactitud del flujo en la bomba HPLC modelo L-7100.

| Flujo fijado (mL/min) | Media flujo medido (mL/min) | Desviación (%) |
|-----------------------|-----------------------------|----------------|
| 0,20 | 0,204 | 1,875 |
| 0,30 | 0,295 | -1,750 |
| 0,50 | 0,491 | -1,800 |

En todos los casos la bomba funcionó con exactitud dentro de los límites de incertidumbre de la medición [4,5]. Estos resultados demuestran que el instrumento mantiene un flujo estable y sostenible, el regulador de presión cumple con las condiciones programadas y no existen fugas de líquido causado por problemas con los sellos de los pistones o conexiones. La bomba en estudio cumple con las especificaciones establecidas y adecuadas a las características del equipo.

Calificación del inyector manual

La figura 1 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos al evaluar la precisión del inyector manual. Se utilizaron diferentes volúmenes de una solución de referencia de

sacarosa a una concentración de 40 mg/mL. En la tabla 2 se resumen los resultados del área y de la altura obtenidos para los picos detectados.

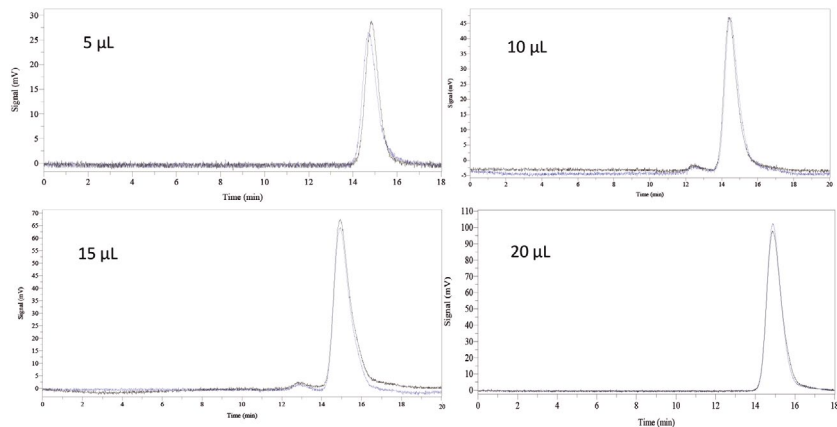


Figura 1. Perfiles cromatográficos obtenidos en la evaluación de la precisión del inyector manual, con 5, 10, 15 y 20 µL de volumen de inyección de la solución de referencia de sacarosa a una concentración de 40 mg/mL. Los valores mostrados representan la media de tres réplicas para cada volumen, por cada analista, en un día de ensayo.

Tabla 2. Evaluación de la precisión del inyector manual

| Cálculos basados en la altura de los picos | | | | |
|--------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Volúmenes (µL) | 5 | 10 | 15 | 20 |
| Media (altura) | 25,50 | 49,69 | 68,63 | 96,10 |
| DS | 0,02 | 0,02 | 0,45 | 0,14 |
| CV (%) | 0,08 | 0,04 | 0,66 | 0,15 |
| Criterio de aceptación ≤ 1% | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |
| Cálculos basados en el área de los picos | | | | |
| Volúmenes (µL) | 5 | 10 | 15 | 20 |
| Media (área) | 25,42 | 51,56 | 65,76 | 95,03 |
| DS | 0,11 | 0,02 | 0,16 | 0,52 |
| CV (%) | 0,45 | 0,04 | 0,25 | 0,54 |
| Criterio de aceptación ≤ 1% | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |

El comportamiento de los picos obtenidos en el estudio de la precisión del inyector manual fue similar para cada una de las réplicas evaluadas con los diferentes analistas y días de aplicación (figura 1), lo que se refleja en un coeficiente de variación menor que el 1 %, tanto para el área como para la altura del pico (tabla 2). Este resultado, similar al reportado por Quiñones-García *et al.*, 2015 [12], demostró que es posible minimizar los errores potenciales asociados a la inyección manual de las muestras si se realizan réplicas y se calcula el valor medio de la respuesta, con ello se consigue la precisión instrumental requerida.

Al referirnos a un inyector manual, donde la mayor parte de la operación recae sobre el operario, la evaluación de este parámetro también demostró la calificación de los analistas. La farmacopea americana plantea que los analistas son los responsables de la operación de los instrumentos analíticos y la calidad de los datos [3].

La altura de los picos es un parámetro que se afecta con pequeñas variaciones, pero brinda mayor información de la calidad de la separación y resolución cromatográfica. El área bajo la curva, por su parte, permite calcular concentraciones desconocidas de analitos de interés. Este parámetro es de mayor importancia teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo es la calificación del equipo para HPLC para la validación de la cuantificación analítica de carbohidratos.

La linealidad del inyector es un parámetro que evalúa la capacidad del instrumento de obtener resultados que sean directamente proporcionales a los volúmenes de la solución de referencia inyectados. La figura 2 muestra un coeficiente de determinación cercano a los valores reportados en la literatura como estándares para autoinyectores [5].

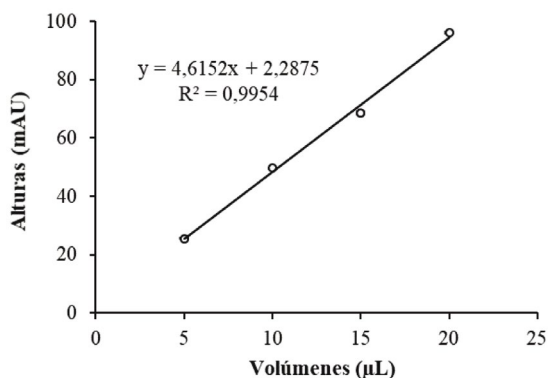


Figura 2. Evaluación de la linealidad del inyector manual. Los valores obtenidos representan la media de tres réplicas para cada volumen \pm la desviación estándar.

Calificación del horno para columna

Por su importancia, la exactitud de la temperatura del horno para columna se considera uno de los parámetros a evaluar para demostrar la idoneidad del sistema. La tabla 3 resume los resultados obtenidos.

Tabla 3. Evaluación de la exactitud de la temperatura del horno de columna.

| T (°C) | Posición | t (°C) | D _T (°C) | Criterio aceptación $\pm 2^{\circ}\text{C}$ |
|--------|-----------|--------|---------------------|---------------------------------------------|
| 40 | anterior | 38,0 | -2,0 | Cumple |
| | media | 38,7 | -1,3 | Cumple |
| | posterior | 40,3 | 0,3 | Cumple |
| 60 | anterior | 58,0 | -2,0 | Cumple |
| | media | 59,0 | -1,0 | Cumple |
| | posterior | 61,3 | 1,3 | Cumple |
| 85 | anterior | 83,0 | -2,0 | Cumple |
| | media | 85,7 | 0,7 | Cumple |
| | posterior | 87,0 | 2,0 | Cumple |

Convenciones: T: temperatura fijada, t: media de la temperatura medida y D_T: desviación de la temperatura.

La desviación de la temperatura demuestra que a medida que aumenta la temperatura fijada en el horno hay una menor exactitud de la misma en las diferentes posiciones de la cámara del horno. La temperatura en la posición anterior (posición del inyector) es inferior a la fijada y en la posición posterior (salida del aire caliente) es superior. Este patrón está asociado a la necesidad del horno de mantener la temperatura constante en la cámara. No obstante, la desviación de la temperatura está en el rango del criterio de aceptación ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). La variable estabilidad de la temperatura en los puntos de medición cumple con el criterio de aceptación de una variabilidad $\leq 1^{\circ}\text{C}$ [5]. Es importante evidenciar un buen funcionamiento del horno, pues se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, este parámetro influye directamente en la retención y selectividad de la misma [13].

Calificación del detector

Otro componente del sistema HPLC de vital importancia para la validación de un método analítico es el detector, en este trabajo se evaluó el detector IR asociado a la cuantificación de muestras de carbohidratos.

La linealidad del detector evalúa la capacidad del ensayo de obtener resultados que sean directamente proporcionales a las concentraciones de las soluciones de referencia inyectadas. La figura 3 muestra los resultados obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas, donde el coeficiente de determinación cumple con el criterio de aceptación establecido de un $R^2 \geq 0.9950$ [4, 5]. El IR evaluado es capaz de emitir una señal con una linealidad adecuada para el análisis y cuantificación de carbohidratos.

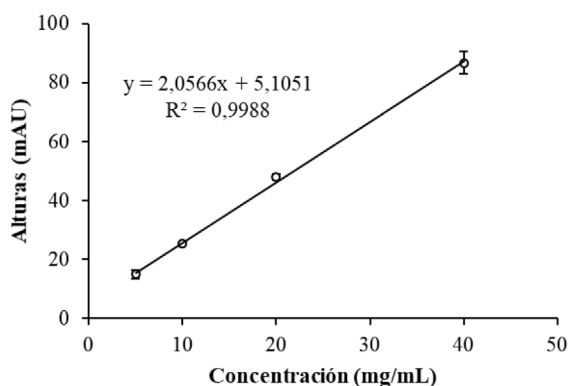


Figura 3. Evaluación de la linealidad del detector de índice de refracción. Los valores obtenidos representan la media de tres réplicas para cada concentración \pm la desviación estándar.

En la figura 4 aparece el perfil cromatográfico resultante de la evaluación de la relación señal/ ruido del detector en un período de 20 min. El parámetro ruido de la línea de base se evaluó de satisfactorio por mostrar valores $< 1000 \mu\text{V}$ en condiciones dinámicas de operación.

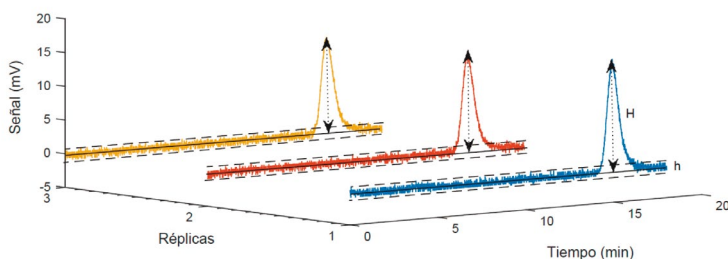


Figura 4. Perfil cromatográfico resultante de la evaluación de la relación señal/ruido del detector IR.

Donde H es la altura del pico del perfil cromatográfico y h es la altura del ruido de la línea base. Para esta evaluación se aplicó una solución de sacarosa a una concentración de 5 mg/mL.

La tabla 4 muestra los datos de la relación señal/ruido obtenidos de la inyección de la solución de referencia (sacarosa 5 mg/mL) realizada por tres analistas. Se evidenció que la relación S/R fue superior al límite inferior del criterio de aceptación para la concentración evaluada [5].

Tabla 4. Evaluación de la relación señal/ruido.

| Relación señal/ruido | S/R (analista 1) | S/R (analista 2) | S/R (analista 3) |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Concentración 5 mg/mL | 18,49 | 16,27 | 15,78 |
| Criterio de aceptación (≥ 10) | Cumple | Cumple | Cumple |

Los parámetros de calificación del detector IR se consideran adecuados, pues cumplen con los estándares internacionales [5]. Los valores obtenidos, (relación señal/ ruido y linealidad) satisfacen los requerimientos necesarios para la validación del método de cuantificación de carbohidratos. Según la Conferencia Internacional de Armonización es posible utilizar varios enfoques para determinar el límite de detección y cuantificación de un analito dependiendo si el procedimiento es instrumental o no instrumental [2]. En este caso, la calificación del HPLC-IR demostró que los cálculos del límite de detección y cuantificación pueden estar basados en la relación S/R. El límite de detección se calculó para la relación $S/R \geq 3$, mientras que el límite de cuantificación se calculó para la relación $S/R \geq 10$ [2].

Una calificación de desempeño continua evita tiempo de trabajo extra, mejora la certeza analítica y, por lo tanto, la calidad general de los datos. La calificación proporciona no solo una instantánea del desempeño del sistema, sino también un historial de rendimiento continuo, basado en el uso de los gráficos de control. Esto permite al usuario contar con una lista de verificación sencilla con la posibilidad de calificar el instrumento antes de su utilización. La determinación de los tiempos de retención o las áreas de picos debe realizarse cada vez que se ejecuta el método, brinda una información rápida y confiable del sistema, demuestran que los diferentes módulos del sistema HPLC-IR se desempeñan de manera consistente de acuerdo con las especificaciones definidas por el fabricante.

CONCLUSIONES

La calificación del sistema HPLC-IR mostró la exactitud del flujo de la bomba, la precisión y linealidad del inyector manual, la exactitud y estabilidad de la temperatura del horno, así como la linealidad y relación señal/ruido en el detector IR según las normas ICH y USP. Este trabajo demostró que los diferentes módulos del sistema HPLC-IR se desempeñan de manera consistente de acuerdo con las especificaciones definidas por cada fabricante para los diferentes módulos, por lo que resultan apropiados para el uso previsto de cuantificación de carbohidratos de diversas composiciones, estructuras y grados de polimerización como son los FOS, los azúcares invertidos y las dextranas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus.

CONFLICTO DE INTERESES

El trabajo aquí descrito no ha sido publicado con anterioridad. Los autores declaran no tener conflicto de intereses y aceptan la publicación del artículo en esta revista. Los autores de este trabajo declaran presentar una participación igualitaria en la concepción, ejecución y redacción de la investigación.

REFERENCIAS

1. A.C. Foitzich, *Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR*, Tesis para optar al título de Ingeniería de los Alimentos, Universidad Austral de Chile, 2013.
2. ICH, International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Text Validation Anal. Proced Text Methodol., Q2 (R1): 1-13, 1995).
3. USP-NF, United States Pharmacopeia, General Chapter: 1058 Analytical Instrument Qualification, Rockville, MD, 2012.

4. L. Kaminski, M. Degenhardt, J. Ermer, C. Feußner, H. Höwer-Fritzen, P. Link, B. Renger, M. Tegtmeier, H. Wätzig, Efficient and economic HPLC performance qualification, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**(1), 557-564 (2010).
5. Guideline Qualification of Equipment Annex 1: Qualification of Liquid Chromatography Equipment, OMCL Network / EDQM of the Council of Europe, PA/PH/OMCL, (11): 04 R6, 2011.
6. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (Anexo 15: Cualificación y validación), Departamento de Inspección y Control de Medicamentos, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2015.
7. L. Hernandez, C. Menendez, E.R. Perez, D. Martinez, D. Alfonso, L.E. Trujillo, R. Ramirez, A. Sobrino, Y. Mazola, A. Musacchio, E. Pimentel, Fructooligosaccharides production by *Schedonorus arundinaceus* sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase constitutively expressed to high levels in *Pichia pastoris*, *Journal of Biotechnology*, **266**, 59-71 (2018).
8. D. Martínez, C. Menéndez, O. Chacón, A.D. Fuentes, D. Borges, A. Sobrino, R. Ramírez, E.R. Pérez, L. Hernández, Removal of bacterial dextran in sugarcane juice by *Talaromyces minioluteus* dextranase expressed constitutively in *Pichia pastoris*, *Journal of Biotechnology*, **333**, 10-20 (2021).
9. D. Martínez, C. Menéndez, F.M. Echemendia, E.R. Pérez, L.E. Trujillo, A. Sobrino, R. Ramírez, Y. Quintero, L. Hernández, Complete sucrose hydrolysis by heat-killed recombinant *Pichia pastoris* cells entrapped in calcium alginate, *Microbial Cell Factories*, **13**(1), 87 (2014).
10. C. Menéndez, D. Martínez, E.R. Pérez, A. Musacchio, R. Ramírez, A. López-Munguía, L. Hernández, Engineered thermostable β -fructosidase from *Thermotoga maritima* with enhanced fructooligosaccharides synthesis, *Enzyme and Microbial Technology*, **125**, 53-62 (2019).
11. M. Cuevas, J. Pérez, M. Hernández, M. Castiñeira, J. Márquez, Calificación de un sistema de HPLC-IR para la determinación de impurezas en vacunas, *Revista Cubana de Farmacia*, **44**(4), 476-484 (2010).

12. Y. Quiñones-García, A. Calvo-Alonso, I. Caraballosa-Noa, H. Alonso-Rodríguez, Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, fase inversa, *Revista Cubana Química*, **27**(2), 163-181 (2015).
13. L. Snyder, J. Kirkland, J. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, 3^a ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (NJ), 2009.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

I. Veitía-Coba, J.D. Brizuela-Cardoso, J.M. Fernández-Torres, D. Martínez-García, E. Pérez-Cruz, Calificación de un sistema de HPLC-IR para la cuantificación de carbohidratos de diversas composiciones, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 51(3), 1418-1433 (2022). DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.102515>