

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINAR LA GENISTEÍNA EN EL GRANO DE SOYA POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR DETERMINATION THE GENISTEIN SOYBEAN HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Daniel Angel Sánchez Vaca¹

Fecha de recepción: 17 febrero 2015

Fecha de aceptación: 20 de mayo 2015

Resumen

El objetivo de la investigación fue validar una metodología por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de estos analitos, haciendo uso de un cromatógrafo Agilent 1100 con detector Ultra Violeta y arreglo de diodos. Se utilizó con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (acetonitrilo) y una solución B (solución acuosa de ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de A desde 5% hasta 22% por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal en A desde 22% hasta 35% durante 8 minutos, seguida de una elusión isocrática al 35% de A por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de A desde el 35% hasta 5 % por 8 minutos. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 262 nm, a un caudal de 1 ml/min, con un volumen de inyección de 10 µL, y una temperatura de 30 °C, encontrándose que los parámetros evaluados: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión del sistema, precisión del método, exactitud y robustez, están dentro de los valores aceptados para una validación.

Palabras clave: *Cromatografía, genisteína, soya, validación.*

Abstrac

In the present research work entitled Validation of an analytical method to determine Genistein in soybean by high-performance liquid chromatography (HPLC), aims to validate a HPLC methodology for determining the concentration of the analyte, using a gas chromatograph Agilent 1100 with diode array detector was used with a Ultraviolet and octadecylsilane column (C18) of 150 mm in length and 4,6 mm internal diameter , was used as mobile phase solution A (acetonitrile) and a solution B (acetic acid 0,1%), with a journey time of 30 minutes in a linear gradient of 5 % A to 22% A for 10 minutes, followed of other linear gradient of 22 % A to 35 % A for 8 minutes, followed by an isocratic elution (35 % of A) for 4 minutes and finally a linear gradient of 35 % A to 5 % A for 8 minutes in length, at wavelength of 262 nm, with a flow rate of 1 mL / min, we injected a sample of 10 µL at a temperature of 30 °C, found that the parameters evaluated: linearity, detection limit, limit of quantification accuracy of the system, method precision, accuracy and robustness, are within accepted values for validation.

Keywords: *Chromatography, gebistein, soybean, validation.*

¹Adscrito a la Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Mg. en Ingeniería Química Ambiental. Universidad Nacional del Santa. Santa. Nuevo Chimbote. Perú. dani19m@hotmail.com

1. Introducción

Se ha estudiado que las Genisteína y Daidzeína, isoflavonas componentes de la soya tienen influencia en el metabolismo de hormonas sexuales y su actividad biológica, intervienen en la producción de enzimas intracelulares, regulan la síntesis de proteínas, tienen efecto sobre la proliferación y diferenciación celular, son antioxidantes, modifican la estructura de la membrana celular y bloquean procesos que originan carcinogénicos.

El contenido de isoflavonas varía en diferentes productos, hasta 2mg/100 mg de muestra seca, influido por factores de procesamiento como pueden ser las condiciones de elaboración o de cultivo, entre otros. Y el rango de diferentes productos fermentados como tempeh y leche de soya, varían de 1µg a 540µg/g.

En 1995, una revisión de 38 estudios controlados sobre la soya y la enfermedad cardiaca concluyó que la soya es definitivamente efectiva para mejorar el perfil del colesterol.

Un estudio más reciente de doble ciego (sin ser parte de la revisión mencionada previamente), el cual incluyó a 66 mujeres ancianas, también encontró mejoras en el colesterol HDL ("bueno"). Se dividió a las mujeres en tres grupos. El primer grupo recibió 40 g de proteína de leche descremada al día. Al segundo grupo se le administró la misma cantidad de proteína de soya y el tercer grupo recibió 40 g de proteína de soya con isoflavonas extras de soya. En comparación con el grupo de la leche descremada (placebo), ambos grupos de soya mostraron mejoras significativas tanto en el colesterol total como en el colesterol HDL.

Aunque existen ciertas evidencias de que las isoflavonas son los ingredientes activos de la soya, responsable de la mejora en el perfil del colesterol, varios estudios contradicen esta hipótesis. Los componentes de soya sin isoflavona, como las proteínas, pueden ser igualmente o quizás incluso más importantes que las isoflavonas en la soya.

También existe otra posibilidad. Un estudio que encontró que esos productos de soya a veces pueden tener un perfil poco común de isoflavonas, que contienen niveles altos de la isoflavona llamada gliciteína más que la genisteína y la daidzeína más comunes. La gliciteína podría estar inactiva con respecto a reducción de colesterol; en otras palabras, las variaciones en los componentes específicos de isoflavonas podrían haber hecho inactivos a algunos productos estudiados de isoflavona de soya. Actualmente, no es evidente bajo qué circunstancias la soya podría tener niveles altos de gliciteína y si eso representa los resultados inconsistentes observados en los estudios. Además, es posible que ciertas formulaciones de soya contengan ingredientes todavía no identificados más allá de las isoflavonas que desempeñan un papel importante.

El papel de las isoflavonas es ampliamente apreciado y constituye uno de los temas actuales de investigación en Nutrición. Las Isoflavonas están presentes en una gran variedad de plantas y vegetales siendo una de las fuentes más abundantes el grano de soya. De hecho, muchos de los beneficios que se atribuyen a la soya se producen por acción de las llamadas isoflavonas. Las más importantes y la que estudiaremos son el (Genisteína y Daidzeína) que destacan por su acentuada acción antioxidante.

Su acción antioxidante impide a las toxinas adherirse a la pared celular y ayuda a que la persona no se demacré rápidamente (los antioxidantes nos ayudan a mantenernos más sanos, más jóvenes). Acción antitumoral (en pecho y ovarios) y anticancerígena (sobre todo a nivel de próstata, mama y colon). Mejora el sistema inmunológico al producir una mayor actividad de los macrófagos y glóbulos blancos.

Aunque las isoflavonas (Genisteína y Daidzeína) no son nutrientes esenciales, pueden ayudar a reducir la incidencia de varias enfermedades. Por lo tanto las isoflavonas pueden ser útiles para la salud óptima, incluso si no son esenciales para la vida como una vitamina clásica.

La cromatografía es una técnica para analizar o separar mezclas de gases, líquidos o sustancias disueltas. En general, todos los tipos de cromatografía involucran dos fases: fase estacionaria (el material adsorbente) y una fase móvil (el solvente que eluye). La separación depende de la competencia de las moléculas de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. (Ríos, 2005).

La cromatografía líquida de alta resolución, o HPLC por sus siglas en inglés, es un método cromatógráfico para separar y analizar mezclas de sustancias, usando una columna que contiene micro esferas recubiertas con la fase estacionaria y donde la fase móvil es bombeada a través de la columna con una bomba de alta presión. La emergencia de cada uno de los componentes de la muestra es analizada de la columna usando diferentes detectores. (Ríos, 2005).

En cromatografía de gases (GC), la única función de la fase móvil es transportar el compuesto. En cromatografía líquida (LC), el soluto interactúa con líquidos o mezclas de líquidos usadas como fase móvil. La selección de la fase móvil es crítica y uno de los criterios más críticos es la solubilidad (Harvey, 2012).

Los solutos vencen la retención cuando existe una interacción débil con la fase estacionaria. La fase móvil debe ser elegida de acuerdo a la naturaleza del soluto (polar, no polar, iónico). La fase estacionaria más usada según encuestas en muchas publicaciones es la fase reversa. En este modo la fase móvil tiene una polaridad mayor a la de la fase estacionaria. Normalmente, la fase estacionaria es de naturaleza hidrofóbica (Harvey, 2012).

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome los solventes, la bomba envía al solvente a través de caños de diámetro pequeño, hacia la válvula inyectora, ésta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de solvente. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector, este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma). (Skoog, Holler y Nieman, 2001).

Las características de desempeño del método analítico se expresan en función de los siguientes parámetros analíticos: linealidad, rango, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. (Sorgorb y Vilanova, 2004).

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

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

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

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

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado. No debe confundirse la exactitud y precisión, la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

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

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

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

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

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

2. Materiales y métodos

Las muestras de grano de soya fueron adquiridas en el centro de acopio (mercado mayorista de Trujillo, proveniente de la sierra del departamento de la Libertad). La preparación de los estándares, solución madre de Genisteína de 1 mg/mL, de la cual se tomó 50, 100, 150, 200 y 250 μ L y se les adicionó a cada una de ellas en fioles de 10 mL, llevándose a su respectivo aforo con acetonitrilo. De la cual se obtuvieron soluciones de 5, 10, 15, 20 y 25 μ g/mL respectivamente. La muestra 5 g de grano de soya y se le colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se le agregó 100 mL de agua y se dejó macerar por 24 horas, posteriormente se le licuo y se le filtró, del filtrado se tomó 1 mL y se le llevó a una fiola de 25 mL y se le aforo con acetonitrilo; de la solución se tomó 3 mL y se filtró haciendo uso de filtros jeringa de celulosa regenerada de 25 mm de diámetro y 0,2 μ m de poro; colocándose en viales ámbar de 1,5 mL.

Para determinar la linealidad del método, se evaluaron 5 soluciones estándares comprendidas entre 5 y 25 μ g/mL de Genisteína empleándose un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una A (acetonitrilo) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de 5% de A hasta 22% de A por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal de 22% de A hasta 35% de A por 8 minutos, seguida de una elusión isocrática (35% de A) por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de 35 % de A hasta 5 % de A por 8 minutos; leyéndose a una longitud de onda de 262 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 μ L, a una temperatura de 30 °C.

Se preparó soluciones estándares de Genisteína menores a 0,5 μ g/mL, hasta encontrar la concentración, y determino los límites de cuantificación L.C.= (10/3) L.D, L.C.: Limite de cuantificación y L.D.: Limite de detección.

La precisión del sistema, se evaluó mediante tres determinaciones. Se preparó una muestra de 1,5 μ g/mL de Genisteína, y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (acetonitrilo) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de 5% de A hasta 22% de A por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal de 22% de A hasta 35% de A por 8 minutos, seguida de una elusión isocrática (35% de A) por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de 35 % de A hasta 5 % de A por 8 minutos; leyéndose a una longitud de onda de 262 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 μ L, a una temperatura de 30 °C.

La precisión del método, se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se prepararon muestras de 1,2 μ g/mL, 1,5 μ g/mL y 1,8 μ g/mL de Genisteína por triplicado, y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (acetonitrilo) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de 5% de A hasta 22% de A por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal de 22% de A hasta 35% de A por 8 minutos, seguida de una elusión isocrática (35% de A) por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de 35 % de A hasta 5 % de A por 8 minutos; leyéndose a una

longitud de onda de 262 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 30 °C.

La exactitud del método se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración. Se añadieron cantidades conocidas de Genisteína a la muestra problema analizada previamente para obtener concentraciones finales de 1,86 µg/ml, 2,16 µg/ml y 2,45 µg/ml por triplicado y se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (acetonitrilo) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de 5% de A hasta 22% de A por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal de 22% de A hasta 35% de A por 8 minutos, seguida de una elusión isocrática (35% de A) por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de 35 % de A hasta 5 % de A por 8 minutos; leyéndose a una longitud de onda de 262 nm, con una velocidad de flujo de 1 ml/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 30 °C.

La robustez del método se evaluó mediante doce determinaciones con dos parámetros a evaluar (cambio en la temperatura y cambio en la velocidad de flujo). Para el cambio de temperatura se evaluó a tal cual, a 20 °C y a 40 °C, para el cambio en la velocidad de flujo se evaluó tal cual, a -0,1 ml (0,9 ml/min) y a +0,1 ml (1,1 ml/min), cada una por duplicado. Se preparó una muestra de 1,5 µg/ml de Genisteína, se analizaron mediante un cromatógrafo Agilent 1100 con arreglo de diodos, se utilizó un detector UV-Visible con una columna Octadecilsilano (C18) de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior; como fase móvil se empleó una solución A (acetonitrilo) y una solución B (ácido acético al 0,1%), con un tiempo de recorrido de 30 minutos, en una gradiente lineal de 5% de A hasta 22% de A por 10 minutos, seguida de otra gradiente lineal de 22% de A hasta 35% de A por 8 minutos, seguida de una elusión isocrática (35% de A) por 4 minutos y finalmente una gradiente lineal de 35 % de A hasta 5 % de A por 8 minutos; leyéndose a una longitud de onda de 262 nm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min., se inyectó una muestra de 10 µL, a una temperatura de 30 °C.

3. Resultados

Tabla 1

Linealidad de las concentraciones en µg/ml de Genisteína a 262 nm

Nivel	Concentración g/ml	Área Pico (mUA*s)
1	0,5	24,87572
2	1,0	52,96392
3	1,5	78,77755
4	2,5	133,70097
5	3,5	186,42355

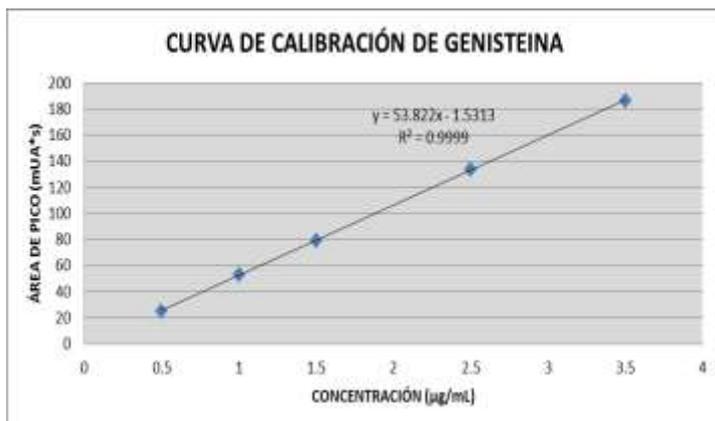


Figura 1
Curva de calibración de Genisteína

Tabla 2:
Límite de detección de Genisteína

Analito	Concentración (µg/ml)	Área pico (mUA*s)
Genisteína	0,03	0,08336

Tabla 3
Límite de cuantificación de Genisteína

Analito	Concentración (µg/ml)	Área pico (mUA*s)
Genisteína	0,1	3,8509

Tabla 4
Precisión del sistema en la determinación de Genisteína

Nivel	Área pico (mUA*s)
1	79,71892
2	80,07132
3	80,47107
X	80,08710
Desviación Estándar	0,37632
DER	0,46989

Tabla 5
Precisión del método en la determinación de Genisteína

Ensayo	Concentración (g/ml)	Área pico (mua*s)	Cantidad recuperada (□g/ml)	Cantidad recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Desviación estándar relativa (%) (2,0%)
1	1,2 (80%)	63,63210	1,21	100,89	101,09	0,17	0,17
		63,81598	1,21	101,17			
		63,83334	1,21	101,20			
		79,71892	1,50	100,64			
2	1,5 (100%)	80,07132	1,51	101,07	101,09	0,46	0,46
		80,47107	1,52	101,57			

		95,11677	1,79	99,76			
3	1,8 (120%)	95,11003	1,79	99,75	100,02	0,46	0,46
		95,88978	1,81	100,55			
		Promedio (%)		100,73			
		Desviación estándar		0,63			
		Desviación estándar relativa (%) (2,0%)		0,62			

Tabla 6
Exactitud del método en la determinación de Genisteína en grano de soya

Ensayo	Concentración (g/ml)	Área pico (mua*s)	Cantidad recuperada (g/ml)	Cantidad recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Desviación estándar relativa (%) (2,0%)
1	1,86	100,56876	1,89	101,98	102,57	0,52	0,50
		101,32502	1,91	102,74			
		101,57107	1,91	102,99			
2	2,16	116,22347	2,18	101,28	100,78	0,55	0,55
		115,74487	2,17	100,87			
		114,94257	2,16	100,18			
3	2,45	129,10683	2,42	98,66	99,87	1,20	1,20
		130,72502	2,45	99,88			
		132,30322	2,48	101,08			
		Promedio (%)		101,07			
		Desviación estándar		1,38			
		Desviación estándar relativa (%) (2,0%)		1,37			

Tabla 7
Robustez del método en la determinación de Genisteína en grano de soya

Parámetro	Área pico (mua*s)	Cantidad recuperada (□g/ml)	Cantidad recuperada (%) (98,0%-102,0%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Desviación estándar relativa (%) (2,0%)	
Cambio en la Temperatura	Tal Cual	79,71892	1,50	100,64	100,67	0,86	0,85
		80,07132	1,51	101,07			
	20 °C	80,47307	1,52	101,57			
		80,30349	1,52	101,36			
	40 °C	78,62712	1,48	99,28			
		79,27760	1,50	100,09			
Cambio en la velocidad de flujo	Tal Cual	79,71892	1,50	100,64	100,90	0,71	0,70
		80,07132	1,51	101,07			
	- 0,1 mL	80,48143	1,52	101,58			
		80,09448	1,51	101,10			
	+ 0,1 mL	78,88378	1,49	99,60			
		80,33770	1,52	101,40			
		Promedio (%)		100,78			
		Desviación estándar		0,76			
		Desviación estándar relativa (%) (2,0%)		0,75			

4. Discusión

En la tabla 1 y figura 1; se presentan los resultados de la linealidad de Genisteína, empleando concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 y 3,5 µg/ml, obteniéndose áreas de pico que van desde 24,87572 a 186,42355; obteniéndose una pendiente de 53,822 y un coeficiente de correlación de 0,9999; lo cual nos indica la sensibilidad del método aplicado por HPLC, así como de una excelente linealidad entre la concentración de los estándares y el área de los picos.

El comportamiento lineal de un método, debe ser demostrado dentro del intervalo en el cual es probable que se trabaje, este intervalo varía dependiendo del tipo de determinación a realizar, en esta investigación el intervalo debe estar entre 33,3% y 166,6% de la concentración de trabajo y el coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0,98 y 1,00; el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0,995; en nuestro caso la correlación para Genisteína es de 0,9999.

En la tabla 2; se presenta el límite de detección de Genisteína, encontrándose que el límite de concentración es 0,03 µg/mL. El límite de detección puede ser establecido de diferentes maneras dependiendo del tipo de método: no instrumentales o instrumentales, y dentro de los instrumentales el de comparación del comportamiento de blanco con blanco enriquecido a diferentes concentraciones. Se preparan soluciones independientes de blanco y de blanco enriquecido a diferentes niveles de concentración bajos, cercanos al límite de detección esperado.

En la tabla 3; se presenta el límite de cuantificación de Genisteína, obteniéndose que el analito se puede cuantificar a partir de la concentración de 0,1 µg/ml. La IUPAC (1997) lo designa por LQ y lo define como el valor verdadero de la señal de la concentración del analito que conducirá a estimaciones (o medidas) con una desviación estándar relativa especificada; puede realizarse por métodos no instrumentales e instrumentales, y dentro de estos últimos la comparación de señal/ruido es de 10:3.

En la tabla 4; se presenta la evaluación de la precisión del sistema para Genisteína, encontrándose que las áreas de pico fluctúan en entre 79,71892 y 80,47107, con una media de 80,08710, con una desviación estándar de 0,37632 y una desviación estándar relativa de 0,46989%, lo cual indica que el sistema se encuentra dentro del rango de precisión (+/- 2%).

En la tabla 5; se presenta la evaluación de la precisión del método en la determinación de Genisteína, en donde se analizaron tres concentraciones: 1,2 µg/ml (80%), 1,5 µg/ml (100%) y 1,8 µg/ml (120%); obteniéndose valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, lo cual nos afirma que la precisión de la metodología aplicada.

Existen diferentes formas de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad. En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa. Se recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajaron tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120 %), con tres muestras independientes de cada nivel. Datos con los que se cuenta si al evaluar la exactitud, se llevó a cabo por el método de Adición estándar.

En la tabla 6; se presenta la evaluación de la exactitud del método en la determinación de Genisteína en grano de soya, en donde se analizaron tres concentraciones: 1,86 µg/ml, 2,16 µg/ml y 2,45 µg/ml; obteniéndose valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, lo cual nos afirma que la exactitud de la metodología aplicada.

La exactitud es uno de los parámetros de calidad básicos que desde un punto de vista metrológico, depende de la trazabilidad de las medidas. La IUPAC (1998) define la exactitud como "el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor real del mesurando", en una nota asociada a esta definición añade que se trata de un concepto cualitativo utilizado para describir el error asociado a un resultado. Efectivamente se suele decir que un valor es muy exacto o poco exacto; sin embargo, hace falta un parámetro que permita medir cuantitativamente la exactitud; este parámetro es el error que se define como "la diferencia entre el resultado de la medida y el valor real del mesurando" 22.

Se determina la concentración de una muestra por triplicado. Luego conocida su concentración promedio, se le enriquece con estándar de analitos a tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método. ICH (International Conference Harmonization), recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración 23.24.

En la tabla 7; se presenta la evaluación de la robustez del método en la determinación de Genisteína en grano de soya, en donde se analizó una concentración de 1,5 µg/mL, con cambios de temperatura (Tal cual, a 20 °C y a 40 °C); y con cambios en la velocidad de flujo (tal cual, a -0,1mL y a +0,1mL), obteniéndose valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, lo cual nos afirma que la robustez de la metodología aplicada.

5. Conclusiones

La curva de calibración para Genisteína está regida por la ecuación $Y=53,822X+1,5313$ con un coeficiente de correlación de 0,9999.

El límite de detección para Genisteína es de 0,03 µg/mL.

El límite de cuantificación para Genisteína es de 0,1 µg/mL.

La precisión del sistema en la determinación de Genisteína, obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.

La precisión del método en la determinación de Genisteína, obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.

La exactitud del método en la determinación de Genisteína, obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%.

La robustez del método en la determinación de Genisteína, obtuvo una desviación estándar relativa menor al 2%

6. Referencias

- Harris D. 1992 "Análisis Químico Cuantitativo" Vol. 30. Editorial Ibero América, México pág. 154.
- Miguel A. Sogorb Sánchez, Eugenio Vilanova Gisbert. 2004. "Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos" Aplicaciones Toxicológicas, Medioambientales y Alimentarias. Editorial Dios de Santos – España. Cap. 9, pág. 173.
- Ramón Compañó B.- Ángel Ríos C. 2005. "Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos". Editorial Síntesis – España. Cap. 11, pág. 213-241.
- Harvey, David. 2002. "Química Analítica Moderna". Editorial Concepción Fernández – España.
- Skoog D.; Holler F.; Nieman T. 2001 "Principios de Análisis Instrumental". 5ª ed. Editorial Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A. Madrid (España). Pág. 11-19, 937-939.
- Willard H.; Dean J. ; Settle F. 1991. "Métodos Instrumentales de Análisis". 5ta edición, Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México D.F. (México) pág. 1 y 2.
- Miller J.C., Miller J.N. 1993 "Estadística para Química Analítica". 20 ed. Edición Addison-Wisley Iberoamericana. Delaware (E.U.A.). pág. 42-52.
- Wiley 2007, HPLC for Pharmaceutical Scientists, editado por Yuri Kazakevich y Rosario Lobrutto.

- Quattrocchi O. A., Abelaida S. I., Lava R. F. "Introducción a la HPLC- Aplicación y práctica", Argentina. 1992.
- Ledezma M. Determinación de vitamina C en frutas por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC". Tecnología en marcha.
- Candelas M. G., Alanís M. G., Del Río F. "Extracción y cuantificación por HPLC de licopeno en tomate y polvo de tomate". Universidad autónoma de Guanajuato. México.
- Callejón R. "Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales" Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. España.
- Mostacero J., Mejía F., Gamarra O. "Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú". Universidad Nacional de Trujillo 2ª edición. 2002.
- Careri M, Elviri L, Mangia A. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of isoflavonoids in soybeans. Study of extraction procedure by experimental design. *Chromatographia* 2001; 54: 45–50.
- Hutabarat LS, Mulholland M, Greendfield H. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 1998; 795: 377–382.