

Verificación de ácidos grasos en alimentos funcionales y cosméticos

Esta nota de aplicación describe la utilización del analizador Metrohm Instant Raman Analyzer Mira P para la identificación y verificación de ácidos grasos, similares a los que se encuentran en cosméticos o nutraceuticos. Los nutraceuticos son productos derivados de alimentos que afirman proporcionar beneficios adicionales para la salud además del valor nutricional básico. A medida que la industria de la salud personal avanza hacia tratamientos homeopáticos naturales, muchos productos nuevos informan beneficios al complementar la dieta con

vitaminas y ácidos grasos, como aceites que son fuentes de vitamina E pero que no aumentan el colesterol LDL ("malo"). Algunos nutraceuticos están regulados por la FDA, mientras que otros no. De todos modos, es importante para los fabricantes que sus productos cumplan con las regulaciones internas y externas. La determinación de la identidad y pureza de los ingredientes son esenciales para la calidad del producto, y la inspección de los ingredientes antes del inicio del proceso de fabricación evitará demoras costosas y una calidad deficiente del producto.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos deben verificarse durante los procesos de producción. Las similitudes entre los ácidos grasos pueden dificultar la identificación del ácido graso exacto a través de los algoritmos de correlación de Pearson; sin embargo, la verificación del valor p garantiza que se utilice el material correcto en la fabricación. MIRA P es un espectrómetro Raman portátil diseñado para la identificación y verificación rápida y no destructiva de muestras. La identificación de muestras implica medir un espectro de la muestra y correlacionarlo con espectros existentes en una biblioteca. Luego el resultado se muestra con una correlación de Pearson. La verificación de las muestras se realiza con un conjunto de entrenamiento de los espectros que contiene la variabilidad aceptada entre diferentes muestras del mismo material. El conjunto de entrenamiento se analiza con análisis de

componentes principales (PCA) y se informa como un porcentaje de probabilidad de que la muestra medida esté dentro de un nivel de confianza establecido por el operador. Normalmente, se utiliza un nivel de confianza del 95% para la verificación del material. Si bien tanto la identificación a partir de una biblioteca como la verificación con un conjunto de entrenamiento son útiles, la verificación puede detectar diferencias muy pequeñas en las muestras. Los ácidos grasos y el alcohol graso analizados en esta nota de aplicación serán ácido láurico ($C_{11}H_{23}CO_2H$), ácido mirístico ($C_{13}H_{27}CO_2H$), ácido palmítico ($C_{15}H_{31}CO_2H$), ácido esteárico ($C_{17}H_{35}CO_2H$) y alcohol estearílico ($C_{17}H_{37}OH$). La **Figura 1** muestra los espectros de estos materiales y las similitudes espectrales, ilustrando la dificultad de diferenciación basándose únicamente en la correlación.

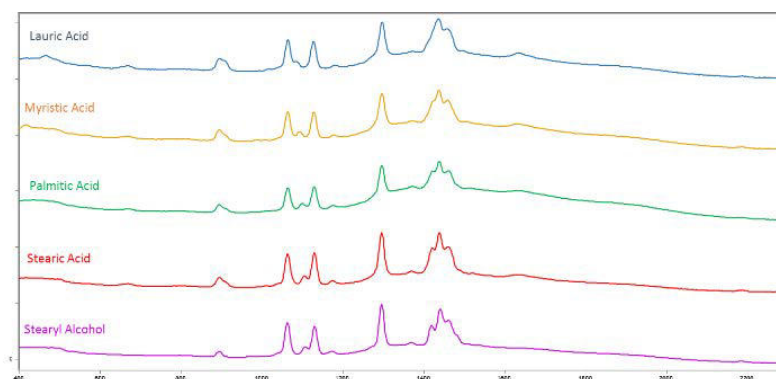


Figure 1. Espectros Raman de los ácidos grasos y alcoholes grasos analizados en esta nota de aplicación

EXPERIMENTO

Creación de un procedimiento operativo (OP)

En el software MiraCal, seleccione la pestaña Procedimientos Operativos y cree un nuevo OP "Ácidos grasos". Los parámetros se establecen en potencia láser 5, promedio de 1 y tiempo de

integración automática. Adquiera un espectro de cada muestra con el OP, nombre cuidadosamente cada muestra y sincronice los datos con la base de datos del software MiraCal.

Creación y prueba de la biblioteca de ácidos grasos

A partir de las muestras que se guardaron utilizando la OP "Ácidos grasos", se puede crear la biblioteca de ácidos grasos. Seleccione la pestaña Bibliotecas y nombre la nueva biblioteca "Biblioteca de ácidos grasos". Agregue las muestras recopiladas previamente a la "Biblioteca de ácidos grasos" y guárdela. A continuación, cree un nuevo OP con el nombre "Prueba de biblioteca" y configure los parámetros en potencia láser 5, promedio de 1 y

tiempo de integración automática. Con la pestaña Evaluaciones seleccionada, marque la casilla de identificación y seleccione la "Biblioteca de ácidos grasos". Guarde la OP "Prueba de biblioteca" y sincronícela con su sistema. El sistema ahora se puede utilizar para hacer coincidir muestras con la "Biblioteca de ácidos grasos". En la figura se ilustra un ejemplo de puntuaciones de coincidencia para cada muestra de ácido graso. **Tabla 1.**

Creación y prueba del conjunto de entrenamiento de ácidos grasos con valor p

Seleccione el OP "Ácidos grasos" que se creó en el experimento anterior y proceda a recolectar ~20 espectros de cada muestra de ácido graso. Una vez terminado, conecte el instrumento al software MiraCal y sincronice los datos con la base de datos. El siguiente paso es crear un conjunto de entrenamiento para cada muestra. Seleccione la pestaña Conjuntos de entrenamiento en el software y proceda a crear nuevos conjuntos de entrenamiento para cada material ingresando el nombre de la muestra como nombre del conjunto de entrenamiento y agregando los ~20 espectros que se recopilaron en el paso anterior. Una vez que se hayan creado y guardado los 5 conjuntos de entrenamiento, el siguiente paso es

crear nuevos OP que correspondan a cada conjunto de entrenamiento. Los cinco OP tendrán los mismos parámetros de adquisición: integración automática, potencia láser 5 y promedio establecido en 1. En la pestaña Evaluación del OP, marque la casilla Verificación para cada OP y agregue el conjunto de entrenamiento correspondiente presionando el botón "Conjunto de entrenamiento".

Una vez terminado esto, guarde cada OP y sincronice la base de datos del software para agregar los OP al sistema. Ahora mida un espectro de cada muestra contra cada OP. Los resultados de aprobado/reprobado se registran en la **Tabla 2**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como vimos anteriormente, la simple comparación de bibliotecas (correlación de Pearson) no siempre identifica con precisión el material correcto cuando hay otros materiales similares presentes en la biblioteca. Las puntuaciones de coincidencia de

materiales similares pueden diferir solo en un 0,01-0,03 del índice de calidad de acierto (HQI), lo cual es difícil de interpretar y reduce la confianza del análisis. **Tabla 1**).

Tabla 1. Valores de correlación de Pearson entre diferentes ácidos grasos y alcoholes grasos probados en la Nota de Aplicación.

Muestra	Valor de correlación de Pearson	Muestra de coincidencia
Ácido palmítico	1,00	Ácido palmítico
	0,98	Ácido mirístico
	0,98	Ácido esteárico
Alcohol estearílico	1,00	Alcohol puro
	0,97	Ácido esteárico
	0,93	Ácido palmítico
Ácido láurico	1,00	Ácido láurico
	0,98	Ácido mirístico
	0,95	Ácido palmítico
Ácido mirístico	1,00	Ácido mirístico
	0,98	Ácido palmítico
	0,98	Ácido láurico
Ácido esteárico	1,00	Ácido esteárico
	0,97	Ácido palmítico
	0,95	alcohol estearílico

La verificación mide la muestra contra el conjunto de entrenamiento seleccionado y, si la muestra cae dentro de ese conjunto de entrenamiento, hay un resultado positivo ("Aprobado"). Si la muestra queda fuera del conjunto de entrenamiento, el resultado es negativo ("Fail"). Al crear modelos de verificación para cada una de las muestras de ácidos grasos y probar cada modelo contra cada muestra, podemos ver que

el instrumento siempre puede PASAR la muestra correcta y REPROBAR muestras que son similares pero diferentes. Además, el resultado de la verificación es fácil de interpretar (Tabla 2). Por ejemplo, el ácido palmítico pasa con un 33,1% de confianza, que está dentro del intervalo de confianza del 95% establecido.

S A M P L E S	TRAINING SETS					
		<i>Palmitic Acid</i>	<i>Stearyl Alcohol</i>	<i>Lauric Acid</i>	<i>Myristic Acid</i>	<i>Stearic Acid</i>
	<i>Palmitic Acid</i>	PASS 0.331	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Stearyl Alcohol</i>	FAIL 0.000	PASS 0.628	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Lauric Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.127	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Myristic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.494	FAIL 0.000
	<i>Stearic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.365

Table 2. Resultados de aprobación y rechazo de diferentes muestras frente al conjunto de entrenamiento

CONCLUSIONES

La identificación es útil cuando se identifican muestras que presentan grandes diferencias en los espectros, y la verificación es útil cuando se examinan muestras con características espectrales similares. Para las muestras desconocidas, se utiliza la correlación para buscar en una biblioteca de materiales conocidos para intentar identificar lo desconocido. Cuando es

necesario confirmar la autenticidad de una muestra, lo mejor es verificarla con el valor p. Los resultados "Aprobado" y "Reprobado" de la verificación brindan una confirmación más confiable de lo que es la muestra, mientras que con la identificación existe un potencial de obtener puntajes de coincidencia altos con muestras que son muy similares entre sí.

CONTACT

Metrohm Hispania
Calle Aguacate 15
28044 Madrid

mh@metrohm.es

CONFIGURACIÓN



MIRA P Advanced

El Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P es un potente espectrómetro Raman portátil que se puede utilizar para determinar y verificar de forma rápida y no destructiva los más diversos materiales como, por ejemplo, principios activos y excipientes de uso farmacéutico. Pese a su pequeño tamaño, el MIRA P es muy robusto y cuenta con un espectrógrafo de diseño muy eficiente, que está equipado con nuestra extraordinaria tecnología Orbital Raster Scan (ORS). El MIRA P cumple la normativa FDA 21 CFR Parte 11.

El paquete Advanced incluye una lente adicional con la que los materiales se pueden analizar directamente o en sus recipientes (láser de clase 3b) y un accesorio de soporte de vial para analizar las muestras que se encuentran en viales de vidrio (láser de clase 1).



MIRA P Basic

El Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P es un potente espectrómetro Raman portátil que se utiliza para la determinación y verificación rápida y no destructiva de diversos tipos de materiales como, por ejemplo, principios activos y excipientes de uso farmacéutico. A pesar del pequeño tamaño del aparato, el MIRA P tiene un diseño resistente y cuenta con un espectrógrafo altamente eficiente equipado con nuestra exclusiva tecnología Orbital Raster Scan (ORS, por sus siglas en inglés). El MIRA P cumple plenamente con las directivas de la FDA 21 CFR Part 11.

El paquete básico MIRA P permite al usuario adaptar el MIRA P a sus necesidades. El paquete básico Mira es un paquete inicial que incluye los componentes esenciales para operar el Mira P.

El paquete básico contiene los accesorios de calibración/verificación de MIRA, la librería de la USP y el adaptador LWD para los análisis en botellas o bolsas. Funciona con clase de protección láser 3B.



MIRA P Flex

El MIRA P Flex Package permite al usuario adaptar el MIRA P a sus necesidades. El Flex Package incluye todos los componentes básicos para el funcionamiento del MIRA P sin adaptadores para la toma de muestras. Para su funcionamiento se requiere al menos un adaptador para la toma de muestras. El MIRA P Flex Package contiene la librería de la USP, accesorios para la calibración y la verificación, y un cable USB. Operación con clase 3B.