

Análise aprimorada de carboidratos no xarope de agave usando HPAE-PAD no modo de geração de eluente de cartucho duplo

Autores: Jingli Hu e Jeffrey Rohrer
Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA

Palavras-chave: Coluna Dionex CarboPac PA200-1 mm, sistema de HPIC Dionex ICS-6000, polióis, oligossacarídeos, frutano, adulteração, NOM do México, detecção eletroquímica

Objetivo

Demonstrar que o método da Norma Oficial Mexicana (Padrão oficial mexicano) para a análise de carboidratos de xarope de agave pode ser executado com uma coluna Dionex™ CarboPac™ PA200-1 mm da Thermo Scientific™ usando um eluente de KOH/KMSA produzido eletroliticamente usando o modo de geração de eluente de cartucho duplo

Introdução

O xarope de agave, um produto alimentício recente do México, é produzido a partir da seiva da planta agave. Este produto ganhou popularidade como alternativa aos adoçantes tradicionais, como o açúcar de mesa e o mel, em parte devido ao seu baixo índice glicêmico (IG) (17–27) quando comparado ao mel (55) e à sacarose (68).¹⁻² O IG é uma classificação relativa dos carboidratos nos alimentos em função de como afetam os níveis de glicose no sangue. Os carboidratos com baixo valor de IG (55 ou menos) são digeridos, absorvidos e metabolizados mais lentamente e causam um aumento mais lento e prolongado da glicose



no sangue e, portanto, dos níveis de insulina. O xarope de agave tem um IG baixo, especialmente porque quase todo o açúcar contido nele é frutose e tem muito pouca glicose. O alto teor de frutose também o torna mais doce que os xaropes contendo níveis apreciáveis de glicose ou sacarose, de modo que seja possível usar menos xarope de agave para obter o mesmo nível de doçura, diminuindo assim a ingestão de calorias.

O conhecimento da composição química dos alimentos é importante não apenas para a saúde humana, mas também para a autenticidade. Devido à crescente popularidade do xarope de agave como adoçante de mesa e como ingrediente alimentício, ele começou a ser adulterado. O fato de o xarope de agave ser composto principalmente

de carboidratos permite uma adulteração relativamente simples e economicamente viável desse material por meio de adoçantes nutritivos de menor custo, como o xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS). Uma maneira de detectar este tipo de adulteração é por meio da elaboração de perfis de oligossacarídeos usando a cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD). Esta técnica se caracteriza pela detecção direta e, portanto, elimina os erros associados à derivatização do analito.

Como principal produtor de agave, o México criou recentemente um artigo aprovado pelo governo "NOM-003-SAGARPA-2016" como uma diretriz oficial para a caracterização do xarope de agave puro.³ A parte central do método na Norma Oficial Mexicana (Padrão oficial mexicano, NOM) é a determinação dos principais açúcares (frutose, glicose e sacarose), polióis (sorbitol, manitol) e 5-hidroximetilfurfural (HMF), bem como a detecção de adulterações usando HPAE-PAD. De acordo com a NOM, o xarope de agave é diluído em água e analisado antes e depois da hidrólise enzimática da amiloglicosidase e frutanase usando uma coluna Dionex CarboPac PA1 (250 × 4 mm) e detecção amperométrica pulsada (PAD). O teor de açúcares e o teor de frutano são calculados.

O método NOM para carboidratos no xarope de agave foi executado com êxito em uma coluna Dionex CarboPac PA1 (250 × 2 mm) usando eluentes de hidróxido de sódio/acetato de sódio preparados manualmente, reduzindo o consumo de eluentes em quatro vezes.⁴ Também mostramos que este método pode ser executado com sucesso em uma coluna Dionex CarboPac PA1 (250 × 1 mm) usando HPAE-PAD no modo EGC duplo. Isso reduz o consumo de eluentes e elimina a preparação manual dos eluentes de hidróxido de sódio/acetato de sódio. A coluna Dionex CarboPac PA200 foi especialmente desenvolvida para proporcionar separações de alta resolução de oligossacarídeos carregados e neutros e é a coluna recomendada para aplicações de oligossacarídeos.⁵ Nesta nota de aplicação, o método NOM foi avaliado com uma coluna Dionex CarboPac PA200 (250 × 1 mm) usando HPAE-PAD no modo EGC duplo. Este modo usa um cartucho de geração de eluentes (EGC) de ácido metanossulfônico (MSA) e um EGC de hidróxido de potássio (KOH) em série para gerar um gradiente de eluentes de KOH/KMSA extremamente

reprodutível e exato necessário para separar carboidratos complexos. Foram avaliados os principais parâmetros de desempenho, incluindo a separação, a linearidade, os limites de detecção e a precisão. Foram analisadas três amostras e foram determinados os principais açúcares, polióis e HMF nessas amostras. O inositol também foi determinado porque foi relatada a sua presença no xarope de agave.⁶ A possibilidade de adulteração foi avaliada com a hidrólise enzimática da amiloglicosidase. O total de frutano foi determinado por meio do tratamento com frutanase. Em comparação com a coluna Dionex CarboPac PA1, a coluna Dionex CarboPac PA200 proporciona uma melhor separação para os oligossacarídeos. Conseqüentemente, os perfis de oligossacarídeos antes e depois da hidrólise enzimática podem ser mais claramente observados e usados na detecção de adulteração.

Experimental

Equipamento

- Sistema de HPIC Dionex™ ICS-6000 da Thermo Scientific™, incluindo:
 - Módulo da bomba DP ou módulo da bomba SP Dionex ICS-6000
 - Módulo de geração de eluentes Dionex ICS-6000 EG
 - Módulo de detecção/cromatografia DC Dionex ICS-6000 com detector eletroquímico ED
 - Amostrador automático Dionex AS-AP com resfriamento da bandeja de amostras, (P/N 074926)
 - Kit de reconstrução de válvulas de 4 portas (P/N 074699), que inclui um loop de injeção de 0,4 µL
- Célula de detecção eletroquímica Dionex™ ICS-6000 ED da Thermo Scientific™ (P/N 072044)
- Eletrodo de trabalho de ouro descartável, PTFE com junta de 1 mil, pacote de 6 (P/N 303397).
- Eletrodo de referência, pH, Ag/AgCl (P/N 061879)

Monte a célula de acordo com o manual do operador⁷ do Dionex ICS-6000 e o Compêndio do usuário para detecção eletroquímica do Dionex ED.⁸

Consumíveis

- Filtro de seringa Nalgene™ da Thermo Scientific™, membrana PES, 0,2 µm (P/N 725-2520)
- Unidades de filtro de 0,2 µm Nalgene™ Rapid-Flow™ da Thermo Scientific™, 1.000 mL, membrana de nylon, diâmetro de 90 mm (P/N 164-0020)
- Tubo de microcentrífuga, 2 mL (Fisher Scientific P/N 05-408-138)
- Nitrogênio, grau de pureza ultra-alto da Airgas
- Cartucho de geração de eluentes de hidróxido de potássio Dionex™ EGC 400 KOH da Thermo Scientific™ (P/N 302766)
- Cartucho de geração de eluentes de ácido metanossulfônico Dionex™ EGC 400 MSA da Thermo Scientific™ (P/N 302767)

Software

- Software do sistema de dados de cromatografia (CDS) Chromeleon™ da Thermo Scientific™, versão 7.2.9

Reagentes e padrões

- Água deionizada (DI), grau de reagente Tipo I, resistividade de 18 MΩ cm ou superior
- Glicose (Sigma-Aldrich P/N G8270)
- Frutose (Sigma-Aldrich, P/N F2543)
- Sacarose (Sigma-Aldrich P/N S7903)
- Manitol (Sigma-Aldrich, P/N M9546)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich, P/N S1876)
- Inositol (Sigma-Aldrich, P/N I5125)
- Hidroximetilfurfural (Fisher Scientific, P/N AC1214)
- Pó de amiloglicosidase (36.000 U/g) (Megazyme, P/N EOAMGDSPD)
- Mistura de frutanas (pó purificado) (exo-inulinase 20.000 U, endo-inulinase 1000 U) (Megazyme, P/N E-FRMXPD)

Amostras

Foram compradas três amostras de xarope de agave em um supermercado local.

Condições cromatográficas

Parâmetro	Valor
Colunas:	Pré-coluna Dionex CarboPac PA200, 1 × 50 mm (P/N 302862) Coluna de separação Dionex CarboPac PA200, 1 × 250 mm (P/N 302861)
Eluente:	Gradiente (Tabela 1)
Vazão:	0,063 mL/min
Temperatura da coluna:	30 °C
Volume de injeção:	0,4 µL
Temperatura do amostrador automático:	5 °C
Eletrodo de referência:	Ag/AgCl
Eletrodo de trabalho:	Eletrodo de ouro descartável, com uma junta de 1 mil (25,4 µm)
Deteção:	Detector amperométrico pulsado (deteção eletroquímica)
Temperatura do compartimento de deteção:	30 °C
Forma de onda de deteção:	Ouro, carboidratos, 4 potenciais (Tabela 2)
Contrapressão do sistema:	~3300 psi (100 psi = 0,6894 MPa)
Tempo de processamento:	70 min

Tabela 1. Gradiente de eluente

Tempo (min.)	KMSA (mM)	KOH (mM)
-20	0	50
0	0	50
6	0	50
12	10	80
30	35	80
40	70	80
40,1	0	50
50	0	50

Tabela 2. Carboidratos, forma de onda de 4 potenciais

Tempo (s)	Tensão (V) vs Ag/AgCl	Integração
0	0,1	Desativada
0,2	0,1	Ativada
0,4	0,1	Desativada
0,41	-2	Desativada
0,42	-2	Desativada
0,43	0,6	Desativada
0,44	-0,1	Desativada
0,5	-0,1	Desativada

Instalação do sistema e precauções

Instale o sistema de acordo com a Figura 1. Para garantir uma linha de base estável e um baixo ruído de fundo, é fundamental remover o suficiente os gases hidrogênio e oxigênio formados com os eluentes gerados por EGC. Conecte a ventilação do desgaseificador de eluentes EG duplo Dionex à porta de vácuo localizada na parte traseira do módulo Dionex DP e confirme se o status do vácuo está OK antes de prosseguir com a inicialização do sistema de cromatografia. Confirme o status do vácuo pressionando os comandos (F8), selecione pump_1 (bomba_1), clique com o botão direito no painel de propriedades e habilite o “expert”. Se o valor lido for NÃO OK, verifique se há vazamentos em todas as conexões quanto a vácuo. Instale a tubulação de contrapressão PEEK (P/N 22181-20031) conforme necessário para atingir um valor de pressão acima de 3.000 psi. Para garantir o melhor desempenho do sistema, ligue o EGC somente quando a pressão do sistema exceder 3.000 psi. Encha um frasco de eluente de 2 litros com água DI desgaseificada. Conecte o frasco de eluente à bomba e mantenha o eluente sob um gás inerte (hélio ou nitrogênio) a 5–8 psi (35–55 kPa). Ligue a bomba e bombeie água DI através do cartucho Dionex EGC 400 MSA por 15 minutos a uma vazão de 1 mL/min. Condicione o cartucho Dionex EGC 400 MSA por 30 minutos usando 100 mM de MSA a uma vazão de 0,1 mL/min. Conecte o Dionex EGC 400 KOH e bombeie água DI através do cartucho Dionex EGC 400 KOH por 15 minutos a uma vazão de 1 mL/min. Em seguida, condicione o cartucho Dionex EGC 400 KOH por 30 minutos usando 100 mM de KOH a uma vazão de 0,1 mL/min. Após condicionar os EGCs, remova a tubulação

de contrapressão, instale um conjunto de colunas Dionex CarboPac PA200-1mm, defina as concentrações desejadas de KMSA e KOH para a aplicação e mantenha o fluxo por 60 minutos.

Preparação de soluções e reagentes

Preparação de padrões

Soluções padrão de estoque

Prepare soluções padrão de estoque individuais (1000 mg/L) de inositol, sorbitol, manitol, hidroximetilfurfural, glicose e sacarose em água DI. Prepare uma solução padrão de estoque de 5.000 mg/L de frutose em água DI.

Soluções padrão de trabalho

Prepare uma mistura padrão de calibração de estoque de sete açúcares (segunda coluna, Tabela 3) e, em seguida, prepare os padrões de calibração diluindo a mistura padrão de estoque (Tabela 3).

Tabela 3. Padrões de calibração

Analito	Conc. de estoque (mg/L)	L1 (mg/L)	L2 (mg/L)	L3 (mg/L)	L4 (mg/L)	L5 (mg/L)
Inositol	50	0,05	0,5	1	2,5	5
Sorbitol	50	0,05	0,5	1	2,5	5
Manitol	50	0,05	0,5	1	2,5	5
HMF	200	0,2	2	4	10	20
Glicose	200	0,2	2	4	10	20
Frutose	2000	2	20	40	100	200
Sacarose	50	0,05	0,5	1	2,5	5

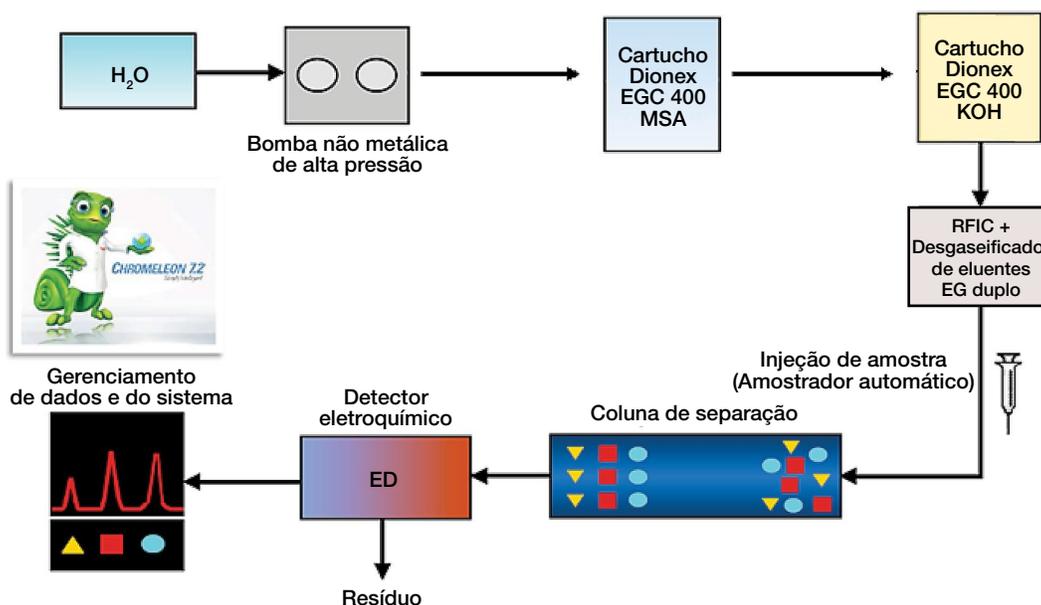


Figura 1. Sistema de HPIC Dionex ICS-6000 no modo EGC duplo

Preparação de enzimas

Amiloglucosidase (270 U/mL)

Dissolva 75,2 mg de pó em 10 mL de água DI. Distribua alíquotas desta solução em frascos de 2 mL e armazene a -20 °C.

Frutanas (1.400 U de exo-inulinase, 70 U de endo-inulinase)

Adicione 10 mL de água DI ao frasco do produto para preparar 2.000 U de exo-inulinase e 100 U de endo-inulinase. Dilua com água DI para preparar 1.400 U de exo-inulinase e 70 U de endo-inulinase. Distribua alíquotas desta solução em frascos de 2 mL e armazene a -20 °C.

Preparação de amostras

Pese 250 mg de xarope de agave ($\pm 0,01$ mg) em um frasco plástico de 100 mL, adicione 50 mL de água DI e misture bem. Filtre esta amostra com um filtro de seringa Nalgene, PES, 0,2 μ m.

A partir da solução de amostra de estoque, prepare as seguintes amostras para a hidrólise enzimática em tubos de centrífuga de 2 mL (Tabela 4). Feche o tubo de microcentrífuga e agite em vórtex por 15 segundos. Coloque os tubos A2, A3, A4, B1 e B2 em um aquecedor elétrico a 45 °C por 30 minutos, aumente a temperatura para 80 °C e mantenha por 20 minutos para interromper a hidrólise. Agite em vórtex por 15 segundos. Dilua as soluções A1, A2 e A3 em água DI para a determinação de glicose e frutose de acordo com a Tabela 5.

Resultados e discussão

Separação

A coluna Dionex CarboPac PA200 foi desenvolvida para fornecer separações de alta-resolução de oligossacarídeos carregados e neutros e é a coluna recomendada para essas aplicações.⁹ A Figura 2 mostra a separação dos principais açúcares (frutose, glicose e sacarose), polióis (sorbitol, manitol, inositol) e 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Tal como demonstrado na Figura 2, o inositol, sorbitol, manitol, HMF, frutose e glicose estão bem resolvidos. A resolução entre todos os componentes é $>2,0$.

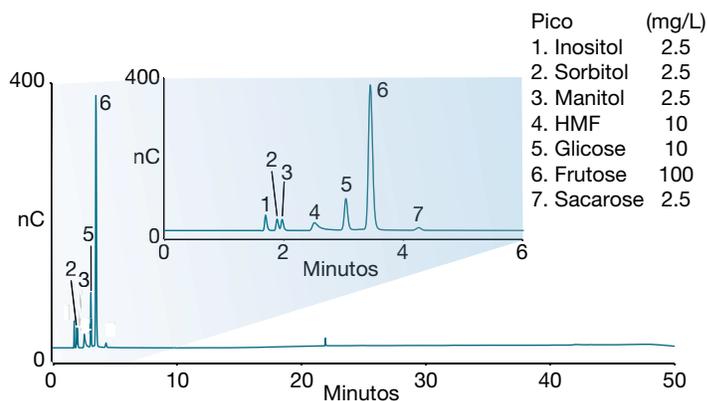


Figura 2. Separação de sete padrões de açúcar de agave usando um conjunto de colunas Dionex CarboPac PA200-1 mm

Tabela 4. Tratamento enzimático da amostra

Código	Estoque de amostra (μ L)	Amiloglucosidase (AG) (μ L)	Frutanas (FN) (μ L)	H ₂ O (μ L)	Nota
A1	600			1400	Amostra
A2	600	40		1360	Amostra após AG
A3	600		40	1360	Amostra após FN
A4	600	40	40	1320	Amostra após AG e FN
B1		40		1960	Branco de AG
B2			40	1960	Branco de FN

Tabela 5. Diluição da amostra

Código	Amostra	Volume de amostra (μ L)	H ₂ O (μ L)	Quantidade de diluições	Nota
A5	A1	200	800	5	Glicose
A6	A2	200	800	5	Glicose após AG
A7	A1	50	950	20	Frutose e glicose
A8	A3	50	950	20	Frutose e glicose após FN

Calibração

A mistura padrão de calibração foi preparada usando concentrações de carboidratos individuais que podem ser diluídas na faixa de concentração típica do xarope de agave.

Foram construídas curvas de calibração com cinco níveis de concentração para cada um dos sete carboidratos. Para a frutose, a curva de calibração apresentou um desvio da

linearidade na faixa de calibração selecionada. Portanto, a área de pico em relação aos dados de concentração da frutose foi ajustada usando uma função de regressão quadrática. O modelo linear de mínimos quadrados foi usado para os outros seis carboidratos. A Figura 3 mostra as curvas de calibração. A Tabela 6 resume os dados de calibração. O coeficiente de determinação (r^2) foi maior que 0,999 para cada componente.

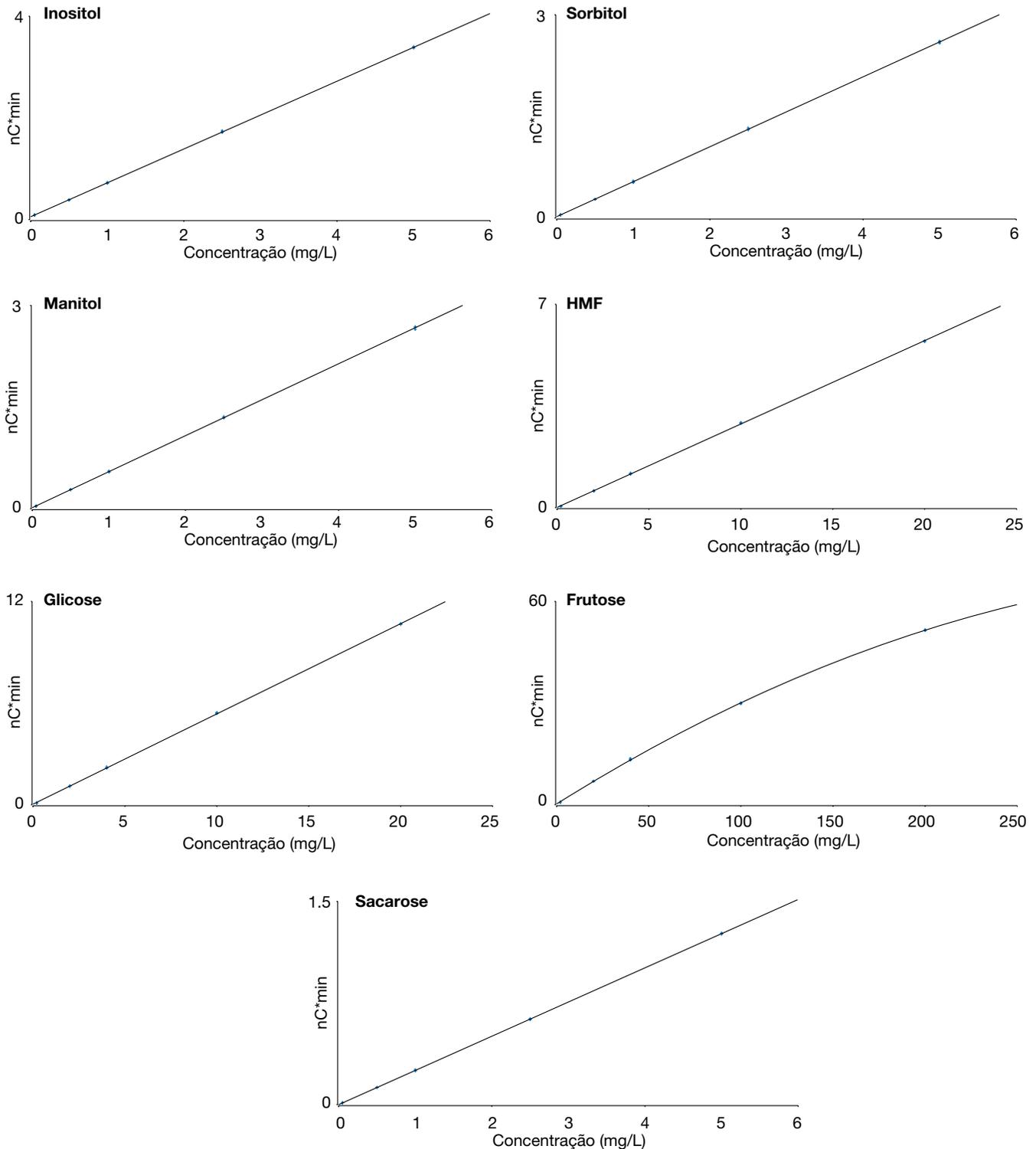


Figura 3. Sete curvas de calibração de carboidratos, ajuste linear, exceto da frutose

Tabela 6. Calibração

Padrão	Faixa (mg/L)	Tipo de calibração	Coefficiente de determinação (r ²)
Inositol	0,05–5	Linear	0,9999
Sorbitol	0,05–5	Linear	0,9999
Manitol	0,05–5	Linear	0,9999
HMF	0,2–20	Linear	0,9999
Glicose	0,2–20	Linear	0,9999
Frutose	2–200	Quadrático	0,9999
Sacarose	0,05–5	Linear	1,0000

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A determinação da relação S/R é realizada comparando o sinal medido de um padrão com uma baixa concentração de analito com o sinal do branco e estabelecendo a concentração mínima na qual é possível detectar o analito com segurança. É usada uma S/R de 3 para estimar o limite de detecção (LOD) e é usada uma S/R de 10 para estimar o limite de quantificação (LOQ).¹⁰ Neste estudo, o ruído da linha de base foi determinado primeiro medindo o ruído pico a pico em um segmento representativo de um minuto da linha de base no qual não se eluem picos, mas perto do pico de interesse. O sinal foi determinado a partir da altura do pico. O LOD e o LOQ na amostra de xarope de agave foram calculados com base no peso da amostra (250 mg) e no volume da amostra (50 mL) (Tabela 7).

Tabela 7. LOD e LOQ

Analito	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD no xarope de agave (µg/g)	LOQ no xarope de agave (µg/g)
Inositol	2,90	9,65	1,930	6,43
Sorbitol	1,15	3,83	0,767	2,56
Manitol	1,38	4,59	0,919	3,06
HMF	11,56	38,5	7,70	25,7
Glicose	5,23	17,4	3,49	11,6
Frutose	1,50	5,00	1,00	3,33
Sacarose	14,6	48,6	9,72	32,4

Tabela 8. Teor de carboidratos (g/100 g)

Analito	Inositol	Sorbitol	Manitol	HMF	Glicose	Frutose	Sacarose
Amostra 1	0,112	0,00262	0,247	ND	1,48	73,1	0,0421
Amostra 2	0,0699	0,00250	0,102	ND	1,35	70,7	0,0604
Amostra 3	0,0670	0,00214	0,232	ND	1,31	74,8	0,0826

Análise de amostras

Foram obtidas três amostras de xarope de agave em um supermercado local. A amostra A1 foi usada para determinar o inositol, sorbitol, manitol, HMF e sacarose no xarope de agave. (Figura 4). A amostra A7 foi usada para determinar a glicose e frutose no xarope de agave. (Figura 5). A Tabela 8 resume os resultados da análise de carboidratos e polióis. O principal carboidrato encontrado nas três amostras de xarope de agave foi a frutose, que representa de 71 a 75% do carboidrato total. O outro carboidrato importante identificado foi a glicose, com 1,3 a 1,5% do carboidrato total.

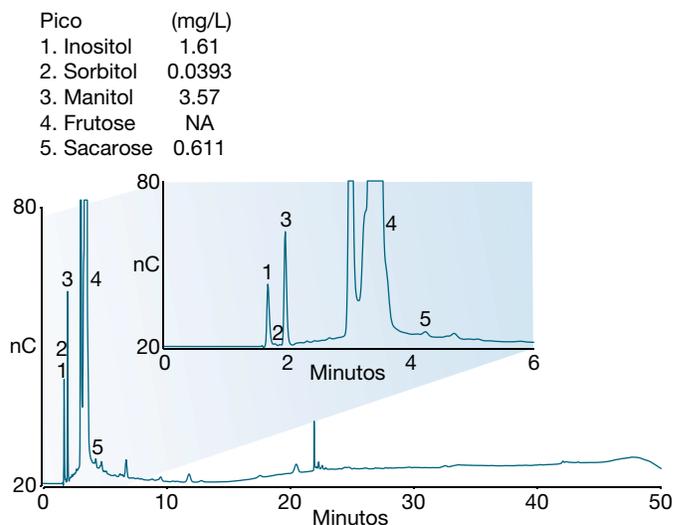


Figura 4. Perfil de carboidratos da amostra 1-A1

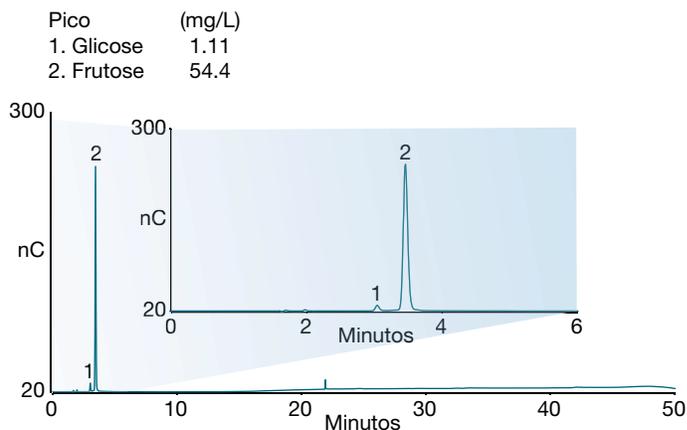


Figura 5. Glicose e frutose na amostra 1-A7

Os principais polióis identificados na amostra de xarope de agave foram o manitol e inositol, compreendendo de 0,1 a 0,3% e 0,06 a 0,11% do carboidrato total, respectivamente. Os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos com uma coluna Dionex CarboPac PA1-2 mm usando um eluente de hidróxido de sódio e acetato de sódio preparado manualmente.⁵

O perfil de oligossacarídeos das três amostras de xarope de agave foi examinado por HPAE-PAD, e um cromatograma representativo é mostrado na Figura 4. A Figura 6 mostra o perfil de oligossacarídeos antes e depois da hidrólise com amiloglucosidase. O perfil de oligossacarídeos muda pouco após a hidrólise com amiloglucosidase. A Figura 7 mostra que o teor de glicose aumenta apenas ligeiramente após a hidrólise com amiloglucosidase. Isso indica que a amostra de xarope de agave não foi adulterada com HFCS ou xarope de milho.

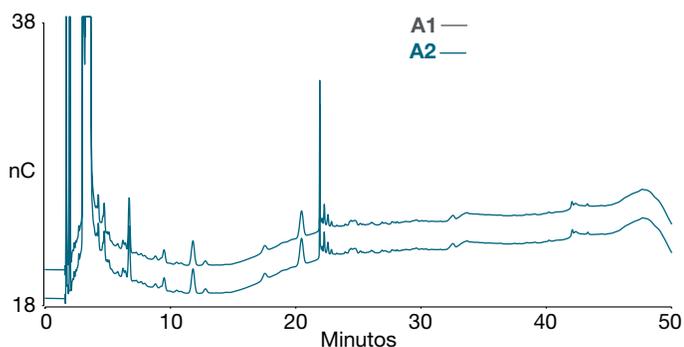


Figura 6. Perfil de oligossacarídeos da amostra 1 antes (A1) e depois da hidrólise da amiloglucosidase (A2)

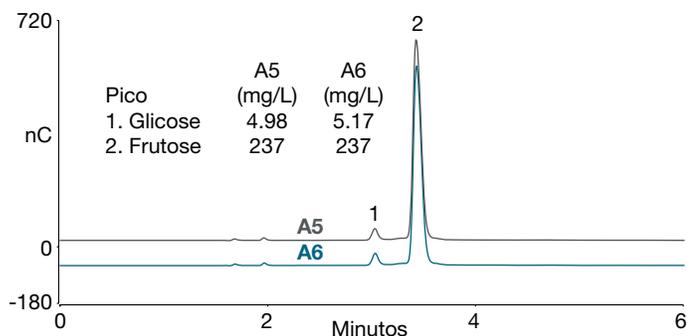


Figura 7. Glicose e frutose da amostra 1 antes (A5) e depois da hidrólise da amiloglucosidase A6 (zoom em 6 minutos)

A Figura 8 mostra o perfil de oligossacarídeos antes e depois da hidrólise com frutanasase. Alguns frutooligosacarídeos (FOS) que eluem entre 10 e 30 minutos foram removidos após a hidrólise com frutanasase. A Figura 9 mostra que a glicose e a frutose aumentam ligeiramente após a hidrólise com frutanasase. Isso sugere que a amostra contém uma pequena quantidade de frutano.

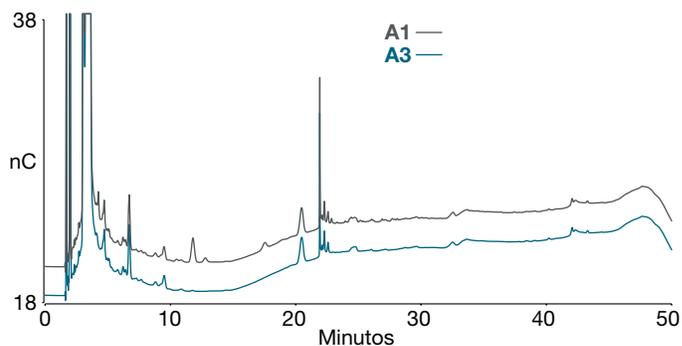


Figura 8. Perfil de oligossacarídeos da amostra 1 antes (A1) e depois da hidrólise da frutanasase (A3)

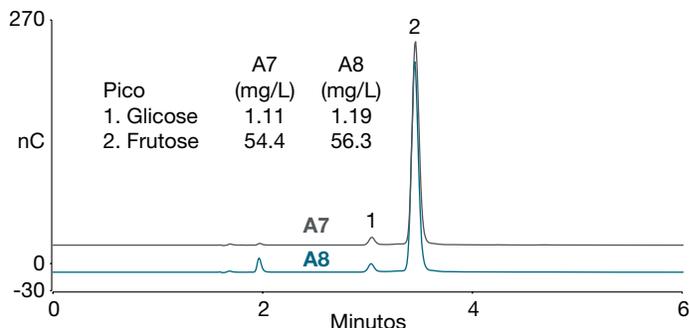


Figura 9. Glicose e frutose da amostra 1 antes (A7) e depois da hidrólise da frutanasase A8 (zoom em 6 minutos)

Para determinar a quantidade de frutano, foram calculadas a frutose e a glicose corrigidas subtraindo a frutose e a glicose presentes no produto. É aplicado um fator de correção de 0,9 à frutose para corrigir a absorção de água durante a hidrólise do frutano. A Tabela 9 resume os resultados de frutano das amostras.

$$TF = (C_F \times 0,9) + C_G$$

Em que

TF = Total de frutano na amostra (g/100 g)

C_F = Frutose liberada do frutano (g/100 g)

C_G = Glicose liberada do frutano (g/100 g)

0,9 = fator para corrigir a absorção de água durante a hidrólise do frutano

Tabela 9. Total de frutano na amostra (g/100 g)

	Glicose corrigida	Frutose corrigida	Total de frutano
Amostra 1	0,121	2,63	2,48
Amostra 2	0,168	3,50	3,31
Amostra 3	0,114	1,43	1,40

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada determinando as recuperações de sorbitol, glicose e sacarose nas amostras de xarope de agave (Tabela 10). A amostra A1 foi usada para experimentos com adição de sorbitol e sacarose. A amostra A7 foi usada para um experimento com adição de glicose. As recuperações foram calculadas a partir da diferença na resposta entre as amostras com e sem aditivos. A recuperação desses três carboidratos apresentou uma variação de 97,2 a 105%, indicando que este método pode determinar com exatidão os carboidratos nas amostras de xarope de agave.

Precisão

A precisão do método foi determinada pela injeção tripla do padrão de calibração de nível 4 em três dias separados durante uma semana. Conforme mostrado na Tabela 11, a precisão da área de pico calculada variou de 0,85 a 1,66% com uma precisão do tempo de retenção <0,28% para todos os carboidratos-alvo. Os resultados da precisão foram melhores do que os resultados obtidos com a coluna Dionex CarboPac PA1-2 mm usando um eluente de hidróxido de

sódio/acetato de sódio preparado manualmente.⁵ A alta precisão deste método é consistente com os resultados geralmente obtidos com um sistema que usa a geração de eluentes.

Conclusão

Esta nota de aplicação demonstra que o método NOM para a análise de carboidratos no xarope de agave pode ser executado com sucesso em uma coluna Dionex CarboPac PA200-1 mm usando HPAE-PAD no modo EGC. A separação, linearidade, reprodutibilidade e sensibilidade foram excelentes. Este método é confiável e pode ser usado para a determinação dos principais açúcares, polióis e HMF no xarope de agave. O perfil de carboidratos após a hidrólise enzimática pode ser usado para a detecção de adulterações. A comparação com uma separação por HPAE-PAD tradicional de xarope de agave usando eluentes de hidróxido de sódio/acetato de sódio mostrou que o método EGC duplo proporciona uma resolução semelhante dos carboidratos de agave, mas simplifica a operação (não é necessária a preparação de eluentes) e melhora a precisão do tempo de retenção.

Tabela 10. Recuperação dos carboidratos com adição de xarope de agave

Analito	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3		
	Quantidade encontrada (mg/L)	Quantidade adicionada (mg/L)	Recuperação (%)	Quantidade encontrada (mg/L)	Quantidade adicionada (mg/L)	Recuperação (%)	Quantidade encontrada (mg/L)	Quantidade adicionada (mg/L)	Recuperação (%)
Sorbitol	0,0487	1	102	0,0375	1	99,5	0,0321	1	101
Glicose	1,11	1	103	1,02	1	101	0,981	1	97,2
Sacarose	0,632	1	105	0,905	1	101	1,24	1	105

Tabela 11. Tempo de retenção e precisão da área de pico

	Analito						
	Inositol	Sorbitol	Manitol	HMF	Glicose	Frutose	Sacarose
RSD do tempo de retenção	0,28	0,00	0,00	0,00	0,16	0,14	0,11
RSD da área de pico vs. dados de concentração	0,85	1,66	1,42	1,05	1,14	1,30	0,95

Referências

1. Wolever, T.; Vuksan, V.; Jenkins, A. L.; Campbell, J. Determination of glycemic index of: Organic 100% blue agave syrup and prebiotic 100% blue agave syrup; Final report for Glycemic Index Laboratories: Toronto, ON, November 2011.
2. Foster-Powell, K.; Holt, S.H.A.; Brand-Miller, J.C. International table of glycemic index and glycemic load values: *Am. J. Clin Nutr.* **2002**, *76*, 5–56.
3. NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAGARPA-2016.
4. Thermo Fisher Scientific Application Note 73132: Carbohydrate analysis of agave syrup using HPAE-PAD. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-73132-ic-hpae-pad-carbohydrate-agave-syrup-an73132-en.pdf>
5. Thermo Fisher Scientific Application Note 73896: Carbohydrate analysis of agave syrup using HPAE-PAD in dual eluent generation cartridge mode. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-73896-ic-hpae-pad-carbohydrates-agave-syrup-cartridge-mode-an73896-en.pdf>
6. Willems, J.L.; Low, N.H. Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2012** Sep 5, *60*(35), 8745–54. doi: 10.1021/jf3027342. Epub 2012 Aug 21.
7. Thermo Scientific Dionex ICS-6000 Ion Chromatography System Operator's Manual. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-22181-97002-ics-6000-man2218197002-en.pdf>
8. Thermo Scientific Electrochemical Detection User's Compendium, P/N 065340-02, April 2013. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065340-Electrochemical-Detection-Man065340-EN.pdf>
9. Thermo Scientific Dionex CarboPac PA200 Columns Product Manual P/N 065734-01, January 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-065734-carbopac-pa200-columns-dual-egc-man065734-en.pdf>
10. ICH Guideline Q2B, Validation of Analytical Procedures, Methodology (CPMP/ICH/281/95), Geneva, Switzerland, November 1996.

Saiba mais em [thermofisher.com/carbopac](https://www.thermofisher.com/carbopac)