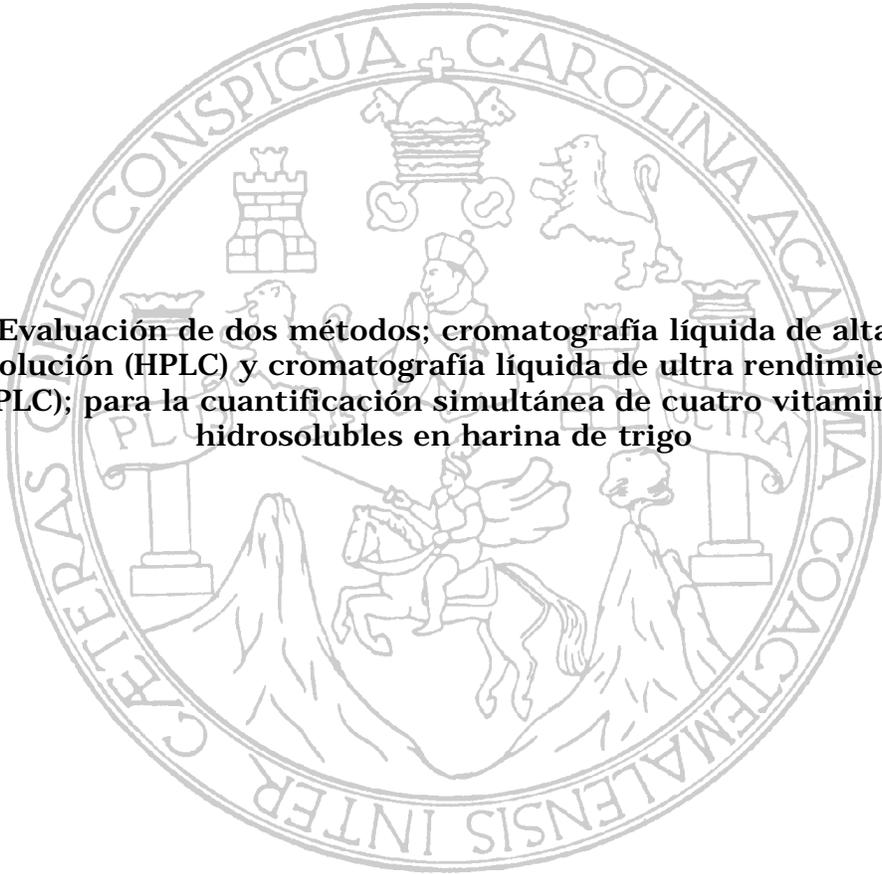


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



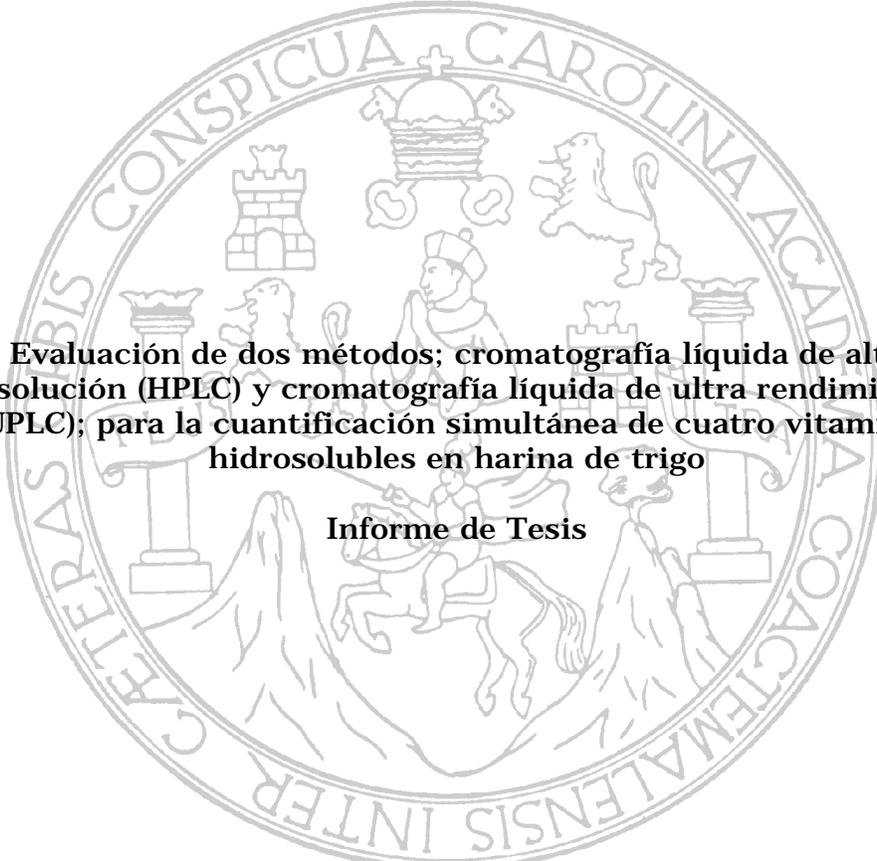
Evaluación de dos métodos; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC); para la cuantificación simultánea de cuatro vitaminas hidrosolubles en harina de trigo

María Gabriela Mencos De León

Química Farmacéutica

Guatemala, Septiembre de 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, likely a saint or historical figure, holding a staff. Above him is a crown and a cross. The seal is surrounded by Latin text: "SACRIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" and "SACRIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

**Evaluación de dos métodos; cromatografía líquida de alta
resolución (HPLC) y cromatografía líquida de ultra rendimiento
(UPLC); para la cuantificación simultánea de cuatro vitaminas
hidrosolubles en harina de trigo**

Informe de Tesis

Presentado por

María Gabriela Mencos De León

Para optar para al Título de
Química Farmacéutica

Guatemala, Septiembre de 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

Dios	Por llenarme de oportunidades y permitirme alcanzar mi meta.
Mi asesora	Licenciada Julia Amparo García, por su asesoría consejo y apoyo para cumplir mi meta.
Licenciada Feby López	Por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional y amistad.
Licenciada Carolina Valdez	Por su apoyo, entusiasmo y amistad.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser el centro de enseñanza que inculcó en mi la responsabilidad, el trabajo y la dedicación.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia	Porque ella me guió a ser la persona Profesional que soy y en ella dejé grandes recuerdos de mi vida.
Laboratorio Nacional de Salud, Licenciada Indira Marroquín y Licenciado Víctor Hugo Jiménez	Por todo su apoyo y colaboración en la realización de mi tesis.

DEDICATORIA

Dedico este acto a:

- | | |
|--|--|
| Dios | Por guiar siempre mi camino, por llenar de bendiciones mi vida y por ayudarme a alcanzar una de mis más grandes metas y deseos como éste. |
| Mi mamá | Marta De León, por brindarme su amor y apoyo incondicional, por ser el ejemplo más grande de superación que tengo y puedo llegar a tener en la vida. |
| Mi papá | Jorge Mario Mencos, por su amor, apoyo y estar junto a mí en los momentos buenos y malos. |
| Mis Hermanos | Alejandro, Hugo y Felix, por su ayuda, compañía y por mantenernos unidos. |
| Mi Novio | Juan Carlos Sicán, por ser mi compañía, por comprenderme, brindarme su amor y estar junto a mí en todo momento. |
| Mis amigas del Laboratorio Nacional de Salud | Principalmente por su cariño, amistad, por sus enseñanzas, por darme el más grande apoyo para alcanzar mi meta. |
| Mi familia en general | Por las muestras de apoyo con inmenso cariño. |

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	
3.1 Las vitaminas	5
3.2 Harina de trigo	9
3.3 Cuantificación de vitaminas en los alimentos	17
3.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	17
3.3.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	22
4. Justificación	24
5. Objetivos	
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivo específico	25
6. Hipótesis	26
7. Materiales y métodos	
7.1 Universo	27
7.2 Medios	27
7.2.1 Recursos humanos	27
7.2.2 Recursos institucionales	27
7.2.3 Recursos materiales	27
7.3 Diseño de la investigación	29
7.4 Procedimiento	30
7.4.1 Procedimiento analítico: Técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	30
7.4.2 Procedimiento analítico: Técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	34
8. Resultados	

8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	40
8.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	43
9. Discusión	
9.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
9.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	50
10. Conclusiones	
10.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	54
10.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	55
11. Recomendaciones	56
12. Referencias	57
13. Anexos	
Anexo No. 1: Cromatograma del estándar de niacina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	64
Anexo No. 2: Cromatograma del estándar de tiamina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	64
Anexo No. 3: Cromatograma del estándar de ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	64
Anexo No. 4: Cromatograma del estándar de riboflavina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	65
Anexo No. 5: Cromatograma de la mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	65
Anexo No. 6: Cromatograma de la tercera modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	65

Anexo No. 7: Cromatograma de la quinta modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	66
Anexo No. 8: Cromatograma de la sexta modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	66
Anexo No. 9: Cromatograma de harina de trigo por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	67
Anexo No. 10: Cromatograma del estándar de riboflavina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)	67
Anexo No. 11: Cromatograma del estándar de niacina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).	67
Anexo No. 12: Cromatograma del estándar de tiamina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).	68
Anexo No. 13: Cromatograma del estándar de ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).	68
Anexo No. 14: Cromatograma de la mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de de ultra rendimiento (UPLC).	68
Anexo No. 15: Cromatograma de una muestra de harina de trigo fortificada por la técnica de cromatografía líquida de de ultra rendimiento (UPLC).	69

Anexo No. 16: Tabla del rango del porcentaje de recuperación aceptado, estimado en función de la concentración del analito.	69
Anexo No. 17: Tabla con datos desviación estándar estimada en función de la concentración de analito	70

1. RESUMEN

En general la población guatemalteca tiene una alimentación deficiente, de los 22 departamentos del país, 20 registran algún tipo de desnutrición. Por ello los alimentos fortificados son de gran importancia para ayudar a mejorar la alimentación de la población. En Guatemala existen leyes que establecen que la harina de trigo debe ser fortificada para que pueda ser distribuida a la población, sin embargo las autoridades de Salud Pública no cuentan con datos provenientes de monitoreos periódicos respecto al nivel de fortificación de harinas de trigo con vitaminas hidrosolubles, tales como de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico.

Actualmente laboratorios de análisis químico analizan las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico por separado, pero se necesita una metodología analítica que permita obtener resultados en menor tiempo y costo. El propósito de la presente investigación fue evaluar dos métodos para la determinación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico en harina de trigo, un método utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otro por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).

Las pruebas realizadas para evaluar ambos métodos consintieron en inyectar los estándares de las cuatro vitaminas por separado para identificar los tiempos de retención de cada una de las vitaminas, para luego proceder a inyectar una mezcla de los cuatro estándares. Por último se realizó adición estándar de las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico a 10 muestras de harina de trigo libre de

vitaminas, para calcular el porcentaje de recuperación, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las vitaminas adicionadas.

Al analizar la mezcla de los cuatro estándares por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), no se obtuvieron los resultados esperados que permitieran la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, niacina, riboflavina) y ácido fólico, debido a que el ácido fólico y la riboflavina eluyeron al mismo tiempo y no fueron posibles de separar. Con el propósito de solucionar el problema se realizaron modificaciones al método en la proporción de buffer-metanol y pH de la fase móvil, tratando de encontrar las condiciones cromatográficas que permitieran la cuantificación simultánea de vitaminas, pero éstas no produjeron resultados aceptables. Por lo tanto el método escogido por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no permitió la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico.

En el caso del método realizado por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), este proporcionó porcentajes de recuperación aceptables para la riboflavina, niacina y tiamina, siendo un método preciso para estas tres vitaminas. Por lo contrario el porcentaje de recuperación obtenido para el ácido fólico no está dentro del rango aceptado.

Se espera que con los resultados de la investigación las Autoridades de Salud Pública puedan evaluar y mejorar el monitoreo de las harinas de trigo.

2. INTRODUCCIÓN

La población guatemalteca tiene en general una alimentación deficiente, Guatemala posee el índice más alto de desnutrición de Latinoamérica, y el sexto del mundo.

Los alimentos fortificados, representan una medida para combatir las deficiencias de alimentación, por lo que en Guatemala como en otros países, existen leyes que establecen que la harina de trigo debe ser fortificada para que pueda ser distribuida a la población. Las autoridades de Salud Pública desconocen el éxito e impacto de los alimentos fortificados, debido a que no se cuenta con datos recientes ni periódicos con respecto al nivel de fortificación de vitaminas del complejo B y ácido fólico en dichos alimentos, como es el caso de las harinas de trigo.

Lo que buscó la presente investigación fue evaluar dos métodos para determinar si éstos permiten la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico en harina de trigo.

Existen laboratorios que analizan por medio de diversas técnicas con principios analíticos diversos, tales como método fluorométrico, colorimétrico, espectrofotométrico y microbiológico, cada una de las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico por separado en muestras de alimentos, pero se requiere de metodología analítica que permita obtener datos precisos en menor tiempo y a un costo más bajo. Por lo que se ha propuesto la utilización de un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y un método por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), para determinar éstos componentes en harina de trigo. De los métodos evaluados, para HPLC fue escogido el método reportado por Ekinci y Kudakal, quienes lograron

analizar muestras de Tahana, un cereal tradicional turco, con una metodología que les permite cuantificar vitaminas del complejo B, así como también vitamina C. Para UPLC el método elegido fue el propuesto por SCANCO de Guatemala, el cual con la utilización de una columna BEH AMIDE permite la cuantificación de ocho vitaminas hidrosolubles.

Con los resultados de la investigación las autoridades del Departamento de Regulación y Control de Alimentos (DRCA) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) podrá evaluar y mejorar el monitoreo de las harinas de trigo, establecer lineamientos de control y disponer de una metodología confiable.

3. ANTECEDENTES

3.1 Las Vitaminas:

En el año 1912, el científico Casimir Funk aisló del arroz una sustancia que curaba el beriberi, y debido a que el Sr. Funk atribuía a este compuesto propiedades de amina, lo llamó Vitamina (vital amine), es decir, amina necesaria para la vida y así se generalizó este término para este conjunto de sustancias vitales para la salud. (West, 1969)

Las vitaminas son sustancias orgánicas, no relacionadas estructuralmente entre sí, necesarias en pequeñas cantidades dentro de la dieta, esenciales para el crecimiento y, en general, para el buen funcionamiento del organismo. Las vitaminas participan en la generación de células sanguíneas, la producción de hormonas, enzimas y neurotransmisores. (West, 1969)

Normalmente se utilizan en el interior de las células como precursoras de coenzimas, a partir de las cuales se elaboran los miles de enzimas que regulan las reacciones químicas de las que viven las células. (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

Las vitaminas deben ser aportadas a través de la alimentación, puesto que el cuerpo humano no puede sintetizarlas. Una excepción es la vitamina D, que se puede formar en la piel con la exposición al sol, y las vitaminas K, B₁, B₁₂ y ácido fólico, que se forman en pequeñas cantidades en la flora intestinal. (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

Las vitaminas no pertenecen a un grupo específico de compuestos, no hay relación química entre ellas y además, poseen una estructura

química muy compleja. Por lo cual, solo se han clasificado de acuerdo a su solubilidad, es decir, en vitaminas hidrosolubles y liposolubles.

Las vitaminas liposolubles son compuestos con grupos hidrófobos en su estructura química, básicamente formadas por unidades que poseen características terpénicas, por ende, son solubles en compuestos apolares y en grasas. A este grupo de vitaminas pertenecen las vitaminas A, D, E y K. Las vitaminas hidrosolubles son compuestos orgánicos con grupos polares en su estructura química, se caracterizan porque se disuelven en agua. A diferencia de las vitaminas liposolubles, su capacidad de almacenamiento en el organismo es casi nula y su deficiencia causa enfermedades, entre las que se puede mencionar el beri-beri, deficiencia en la dieta de vitamina B1 (tiamina). Esto ocasiona que deban ser ingeridas en la dieta regularmente y sólo se pueda prescindir de ellas durante algunos días. La vitamina C y las vitaminas del complejo B pertenecen a este grupo. (Ekinsi, 1990; Fennema 1985; Fortificación de Alimentos, 2009)

3.1.1 Tiamina (Vitamina B1): También es llamada antineurítica, ayuda a las células del organismo a convertir carbohidratos en energía. También es esencial para el funcionamiento del corazón, los músculos y el sistema nervioso. (Enciclopedia Lifespan, 2009)

Una carencia importante de esta vitamina puede dar lugar al beriberi (enfermedad de tipo nervioso que se caracteriza por debilidad muscular y parálisis). Si la carencia no es tan radical, se manifiesta en forma de trastornos cardiovasculares (brazos y piernas "dormidos", sensación de opresión en el pecho, etc.), cansancio, pérdida de concentración, irritabilidad

o depresión. (Enciclopedia Lifespan 2009; Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

El tabaco y el alcohol reducen la capacidad de asimilación de esta vitamina, por lo que las personas que beben, fuman o consumen mucha azúcar necesitan más vitamina B₁. (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

3.1.2 Riboflavina (Vitamina B₂): La vitamina B₂ participa en los procesos de respiración celular, desintoxicación hepática, desarrollo del embrión y mantenimiento de la envoltura de los nervios. También ayuda al crecimiento y la reproducción, y mejora el estado de la piel, las uñas y el cabello. (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

La riboflavina es un nutriente esencial que mantiene las funciones del metabolismo en condiciones normales, actuando como cofactor de reacciones enzimáticas, principalmente en el sistema de transporte de electrones relacionado con la conversión de las oxidaciones de sustratos en energía utilizable. (Delgadillo, 2003)

La riboflavina está presente en los tejidos de los mamíferos bajo las formas de Flavín Mononucleótido (FMN) y Flavín Adenin Dinucleótido (FAD) actuando como parte de las enzimas denominadas flavoproteínas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. (Delgadillo, 2003)

Estudios realizados, sobre deficiencia de riboflavina en humanos manifiestan síntomas como debilidad, fatiga, dolor y sensibilidad en la boca; sensación de quemazón y prurito en

los ojos. En la deficiencia más avanzada ocasiona rigidez en la comisura labial y alteraciones en la piel, queilosis, estomatitis angular así como lesiones oculares. (Delgadillo, 2003)

3.1.3 Niacina (Vitamina B3): La niacina interviene en el funcionamiento del sistema digestivo, piel y nervios. También es importante en la conversión de los alimentos en energía. Tiene efectos reductores sobre el colesterol.^(8, 9)

Es poco frecuente encontrarse con estados carenciales, ya que nuestro organismo es capaz de producir una cierta cantidad de niacina a partir del triptófano, aminoácido que forma parte de muchas proteínas que se toman en una alimentación mixta. (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

La deficiencia de niacina causa pelagra, enfermedad caracterizada por dermatitis, diarrea y demencia (las tres D de la pelagra). (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

3.1.4 Ácido fólico: El folato actúa para ayudar en la formación de glóbulos rojos y es necesario para la producción del ADN, que controla el crecimiento tisular y la función celular.

Las necesidades aumentan durante el embarazo (desarrollo del feto). Por este motivo se prescribe de forma preventiva a las embarazadas. Actúa conjuntamente con la vitamina B₁₂ y su carencia se manifiesta de forma muy parecida a la de ésta (debilidad, fatiga, irritabilidad, etc.). Se le llama ácido fólico por encontrarse principalmente en las hojas de los vegetales (en latín *folia* significa hoja). (Vitaminas Hidrosolubles, 2009)

La actividad insuficiente de folato al momento de la concepción y en el primer trimestre de embarazo puede producir defectos congénitos del tubo neural. En el adulto la deficiencia de folato produce una forma característica de anemia (megaloblástica). (Consumer Eroski 2005; Malouf y Grimley, 2008)

3.2 Harina de Trigo

Es el producto elaborado con granos de trigo común, *Triticum aestivum* L. o trigo ramificado, *Triticum compactum* Host, o combinaciones de ellos por medio de procedimientos de trituración o molienda en los que se separa parte del salvado y del germen, y el resto se muele hasta darle un grado adecuado de finura.^(11, 12)

El procesamiento del trigo entero a harina de trigo generalmente se concentra en unos pocos molinos grandes. La harina producida se usa para fabricar pan, galletas, pastas y otros productos. Debido a su amplia distribución geográfica, aceptación, estabilidad y versatilidad, la harina de trigo es un vehículo apropiado para suministrar micronutrientes a la población de cualquier país. (Consumer Eroski, 2005; Fortificación de Alimentos 2009)

3.2.1 Clasificación:

De acuerdo a la variedad de trigos utilizados, la harina de trigo fortificada se clasifica en:

Harina tipo A: Es la harina obtenida de las variedades de trigo fuerte (duro), que tiene alto contenido de proteínas y gluten.

Harina tipo B: Es la harina obtenida de una mezcla de trigos fuertes con suaves.

Harina tipo C: Es la harina obtenida de las variedades de trigos suaves.

Harina tipo D: Es la harina obtenida de las variedades de trigos suaves la cual ha sido tratado con un agente modificador de gluten. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2009)

3.2.2 Tecnología para Fortificar Harina de Trigo:

El proceso se inicia por medio de la preparación de una premezcla de los micronutrientes que se desean agregar. Esto presenta la ventaja de que existan mayores posibilidades de asegurar la concentración adecuada así como una distribución uniforme de micronutrientes. (Fortificación de Alimentos, 2009)

El proceso se logra agregando micronutrientes a través de un alimentador volumétrico ubicado hacia el final del proceso de molienda. El alimentador que se usa con mayor frecuencia está formado por un tornillo alimentador giratorio que es operado por un motor de velocidad variable. El tornillo gira dentro de una cámara que contiene la premezcla e impulsa ésta, a través de una descarga, la cual puede ser impulsada por gravedad o por convección de aire usando un sistema neumático. (Fortificación de Alimentos, 2009)

La concentración de la premezcla que se agrega a la harina se puede calcular pesando la cantidad de premezcla depositada por el alimentador en un minuto, dividido por el volumen del flujo que pasa por debajo durante el mismo período de

tiempo. La homogeneidad de los micronutrientes en la harina fortificada depende en gran medida de la ubicación del alimentador. Es muy importante que los micronutrientes se mezclen bien con la harina. En el sistema que opera por gravedad, la experiencia ha demostrado que el lugar más apropiado para agregar los micronutrientes es alrededor del punto medio del transportador de tornillo sin fin que recoge la harina de todos los pasos del molino, justo antes del almacenamiento a granel. (Fortificación de Alimentos, 2009)

3.2.3 Nutrientes que Comúnmente se Agregan a la Harina de Trigo

En los países desarrollados, la harina de trigo generalmente es fortificada con vitaminas B1, B2, niacina y hierro. En algunos países se agrega también calcio y folato, vitaminas A y D. Actualmente Guatemala se rige por lo establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.15:07, este determina los niveles de micronutrientes en la fortificación y establece que las harinas deben ser fortificadas con Hierro, tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico. (Fortificación de Alimentos, 2009; Reglamento Técnico Centroamericano, 2009)

Los niveles de tiamina, niacina y hierro que se agregan a la harina de trigo con frecuencia son equivalentes a la cantidad que se pierde durante la molienda, por lo que la harina es enriquecida. En el caso de otros micronutrientes tales como la riboflavina, la cantidad que se agrega es superior a la cantidad pérdida durante la molienda, por lo tanto, la harina es fortificada. (Fortificación de Alimentos, 2009)

3.2.4 Estabilidad de los Micronutrientes

En los alimentos, la estabilidad de las vitaminas es más precaria que la de los minerales porque las vitaminas son más sensibles al calor, la oxidación y los agentes reductores, la luz y otros tipos de estímulos físicos y químicos. Las vitaminas son estables en la harina como tal, aún cuando la humedad y temperaturas altas, juntas, afectan adversamente la vitamina A.

El uso de formas encapsuladas de vitamina A ayudará a superar el problema. Se ha comprobado que se produce la pérdida de cantidades menores de otras vitaminas durante el almacenamiento de la harina.

La mayor parte de las pérdidas de vitaminas se produce durante el horneado, que es el proceso más común para preparar los productos a base de harina de trigo. A pesar de que las temperaturas de horneado son altas (sobre 200°C), la temperatura en el interior del producto es significativamente más baja, y más del 70 por ciento de las vitaminas permanecen inalteradas. Similarmente, entre el 65 y 85 por ciento de las vitaminas permanecen intactas después de cocinar las pastas. (Fortificación de Alimentos, 2009)

3.2.5 Fortificación de Harina en Guatemala

Guatemala ha sido pionero en el mundo en desarrollo, en adoptar la adición de Hierro y vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) a la harina de trigo. El reglamento original data de los años 60. Sin embargo, los niveles de adición eran únicamente para restaurar estos

nutrientes a los niveles originales existentes en el grano de trigo. (SESAN, 2009)

3.2.6 Necesidad de Fortificar La Harina de Trigo en Guatemala:

La población guatemalteca tiene en general una alimentación deficiente en carbohidratos, proteínas, vitaminas, hierro, folatos y yodo, especialmente en los estratos socioeconómicos pobres, tanto urbanos como rurales. Según un estudio de Unicef, Guatemala tiene el índice más alto de desnutrición de Latinoamérica, y el sexto del mundo.

El último monitoreo efectuado el tres de abril del 2008, por la Secretaría de Seguridad Alimentaria y Nutricional (SESAN), afirma que 6,147 comunidades en todo el país presentan algún grado de riesgo y registran casos de niños con desnutrición. De los 22 departamentos del país, 20 registran algún tipo de desnutrición

Unicef no duda en afirmar que Guatemala muestra los peores indicadores de desnutrición de América, pese a no ser el país más empobrecido. Supera incluso el promedio de África, de 35.2% de su población, y de Asia, de 29.6%.

Los alimentos fortificados son un recurso importante para ayudar a mejorar la alimentación de la población, pero no existe un control por parte del Ministerio de Salud Pública, en cuanto a la verificación del cumplimiento de los niveles de fortificación de vitaminas del complejo B y ácido fólico en los alimentos fortificados.

3.2.7 Legislación de Fortificación de Harinas en Guatemala

La fortificación obligatoria de la harina está aumentando a nivel mundial.

En Guatemala, un importante avance en la fortificación de alimentos fue la promulgación de una Ley General de Fortificación, Enriquecimiento y Equiparación de Alimentos en 1992 (Decreto No. 44-92); así como la aprobación el 24 de septiembre 1993 del Reglamento para la Fortificación de la Harina de Trigo con Hierro, ácido fólico y vitaminas del Complejo B (ACUERDO NÚMERO 498- 93). (SESAN, 2009)

Con la promulgación de la Ley General de Enriquecimiento de Alimentos (Decreto No. 44-92), se inicia también la adición de ácido fólico, convirtiéndose Guatemala y El Salvador, en los primeros países en el mundo en reconocer la importancia de este nutriente en la salud humana.

Al mismo tiempo esta Ley General conformó la Comisión Nacional de Fortificación, Enriquecimiento y Equiparación de Alimentos (CONAFOR), la cual desde 1993 ha desarrollado una importante labor. (Acuerdo Gubernativo, 2001; David, 2004; SESAN, 2009)

El Decreto No. 44-92 en Artículo 9 establece que, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, deberá verificar y supervisar que en la fabricación de alimentos incluidos en esta Ley, se realice el proceso de fortificar los alimentos de conformidad con los reglamentos específicos de esta Ley. (David, 2004)

El 25 de abril de 2001 fue publicado el Acuerdo Gubernativo 44-2001, en este se deroga el ACUERDO NÚMERO 498-93,

Reglamento de la Fortificación de la Harina de Trigo, emitido el 24 de septiembre de 1993. (Acuerdo Gubernativo, 2001)

3.2.7.1 Acuerdo Gubernativo 44-2001:

Las disposiciones del acuerdo Gubernativo 44-2001 se aplican a toda la Harina de Trigo y Premezclas de Harina o Harinas Preparadas, cuyo ingrediente principal es la Harina de Trigo, que se utilizan en el país para consumo humano, sean de producción nacional, importación o donación. (Acuerdo Gubernativo, 2001)

Establece que la harina de trigo y la premezclas de harina o harinas preparadas que se utilicen en el país deberán estar enriquecidas con tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) y niacina y fortificada con ácido fólico y Hierro. Los niveles son los siguientes:

NOMBRE	CANTIDAD MÍNIMA (mg/kg)	CANTIDAD MÁXIMA (mg/kg)
Mononitrato de Tiamina	4.00	6.00
Riboflavina	2.50	3.50
Niacina como niacinamida	35.00	40.00
Ácido fólico	0.35	0.45
Hierro	55.00	65.00

Fuente Teórica: Acuerdo Gubernativo 44-2001

3.2.7.2 Resolución No. 201-2007 del Consejo de Ministros de Integración Económica (COMIECO-XLV)

Mediante la Resolución número 201-2007 (COMIECO-XLV) de fecha 27 de Julio de 2007, el Consejo de Ministros de Integración Económica aprobó el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.15:07 Harinas. Harina de Trigo Fortificada, y sus especificaciones. (COMIECO XLV, 2007)

3.2.7.3 Reglamento Técnico Centroamericano RTCA

67.01.15:06:

El objetivo de este reglamento técnico establece las características y especificaciones que debe cumplir la harina de trigo fortificada.

Este reglamento se aplica a la harina de trigo fortificada para el consumo humano, elaborada con trigo común, *Triticum aestivum* L. o con trigo ramificado, *Triticum compactum* Host, o una mezcla de los mismos, a granel o preenvasada y que está lista para la venta al consumidor o está destinada para utilizarla en la elaboración de otros productos alimenticios. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2006)

Los niveles mínimos de micronutrientes para la fortificación de la harina de trigo son los señalados en la tabla siguiente:

MICRONUTRIENTES	NIVEL MÍNIMO A ALCANZAR (mg/kg de harina)
Hierro	55.0
Tiamina (vitamina B1)	6.2
Riboflavina (vitamina B2)	4.2
Niacina	55.0
Ácido fólico	1.8

Fuente Teórica: RTCA 67.01.15:06

3.3 Cuantificación de Vitaminas en los alimentos:

La metodología para la cuantificación de vitaminas del complejo B en alimentos incluye diversas técnicas con principios analíticos diversos, tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrofotometría, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y análisis microbiológico, el cual es considerado como estándar de oro para la mayoría de vitaminas de este grupo.

3.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):

Los trabajos de investigación utilizando la técnica de HPLC para la cuantificación de tiamina y riboflavina en alimentos se remonta a los años setenta, entre los cuales destaca el de Van der Weerhof y colaboradores, quienes describieron un procedimiento utilizando una columna de sílica gel para separar riboflavina y tiamina, por medio de la oxidación de la tiamina hacia Tiocromo después de su separación, y posterior cuantificación de riboflavina y Tiocromo con un detector de fluorescencia. Sin embargo reportaron la desventaja de disminuir la vida media de las columnas hasta pocos días de uso. Asimismo, Toma y Tabekia, describieron la separación simultánea de riboflavina, tiamina y niacina en productos derivados de arroz fortificados utilizando cromatografía de

intercambio iónico y una columna de fase reversa, obteniendo recuperaciones por encima del 90%.

Posteriormente, en el año 1980, Ang y Moseley, desarrollaron un procedimiento con detector de fluorescencia, altamente sensible para la separación de riboflavina, como Lumiflavina, y tiamina como tiocromo, reportando límites de detección de hasta 0.05 y 0.2ng respectivamente. (Agustin, 1984; Ang y Moseley, 1980)

En ese mismo año, Kamman y colaboradores desarrollaron un método para la separación de tiamina y riboflavina utilizando detectores UV visible, por medio de la cual la separación de la tiamina y riboflavina era exitosa, únicamente en alimentos fortificados. En estas matrices, los resultados eran comparables a los métodos aprobados por AOAC. (Agustin, 1984; Kamman, Labuza y Warthesen, 1980)

Posteriormente, Kamman y colaboradores, así como otros muchos autores, comenzaron a investigar la cinética de degradación de ciertas vitaminas en determinadas matrices de acuerdo a su almacenamiento y enriquecimiento, reportando una diferencia significativa en la velocidad de degradación de cada vitamina de acuerdo a factores como temperatura, intensidad de luz y actividad de agua, entre otros. (Berghlund, Dick y Dreher, 1987; Kamman, Labuza y Warthesen, 1981; Woodcock, Warthesen y Labuza, 1982)

Hasta ese momento, los trabajos de investigación habían arrojado las siguientes posibles hipótesis:

- La determinación simultánea de tiamina y riboflavina utilizando detectores UV, al parecer era de baja sensibilidad,

por lo cual era sólo aplicable a alimentos con altas concentraciones de vitaminas.

- La utilización de detectores de fluorescencia, presentaba mayor sensibilidad que la técnica con UV, pero requería de la derivatización de tiamina a Tiocromo y riboflavina a Lumicromo.

Por lo anteriormente expuesto, Fellman y colaboradores desarrollaron un método que incluía los dos tipos de detectores, para lo cual, hicieron varias combinaciones de métodos obteniendo buenos resultados. (Fellman, 1982)

Por otro lado, el estudio de las vitaminas hidrosolubles, así como otros compuestos relacionados iba paralelamente en avance en busca de metodologías analíticas sensibles, rápidas y económicas. Para lo cual la cromatografía líquida, también era el centro de investigación desarrollando así metodologías para la determinación de Ácido Pantoténico, Biotina, vitamina B6 y B12. Estas vitaminas eran difíciles de cuantificar debido a que los métodos convencionales de HPLC con detectores UV, presentaban interferencias en los cromóforos al ser leídos por el detector o por coeluir con otras vitaminas.^(23,24) Esto también originó la inclusión de estos compuestos en una avalancha de trabajos de investigación en preparados farmacéuticos o multivitamínicos, donde la separación de más compuestos resulta aparentemente más sencilla, debido a que los efectos de matriz se minimizan y las altas concentraciones de vitaminas, hacen el trabajo un poco más fácil. (Klejdus et al., 2004; Lam, Holcomb y Fusari, 1984; Maeda et al., 1989)

La evolución de los métodos de análisis del ácido fólico, es similar a la de todos los compuestos anteriormente

mencionados, cuyos orígenes se remontan a finales de los años setenta, con los estudios de Reed y col, Clifford y col y Chapman y col. Así como con las demás vitaminas hidrosolubles, el método microbiológico es el método de referencia para la cuantificación de folatos en alimentos. Sin embargo, la determinación de folatos, así como otras vitaminas del complejo B, representa un problema analítico, debido a la existencia de derivados o precursores que poseen diversos estados de oxidación, varios grupos sustituyentes y una cadena de poliglutamilo de longitud variable. A pesar de que la determinación del largo de la cadena de poliglutamilo es de aplicación nutricional y bioquímica, el análisis a menudo se simplifica por medio del análisis de folatos en su forma de monoglutamilo después de deconjugación enzimática. (Gregory, 1984)

Otro aspecto que dificulta el análisis de los folatos en alimentos son la baja concentración de este compuesto de manera natural y la inestabilidad relativa hacia el calor, ácidos fuertes y oxígeno, generando una subestimación del analito debido a pérdidas en los alimentos. Por todo lo anteriormente expuesto, los métodos para el análisis de folatos naturales, requieren una extracción del compuesto proveniente de la matriz, seguido de deconjugación de los derivados del poliglutamato hacia los respectivos monoglutamatos al utilizar conjugasas provenientes del páncreas o riñones. (Gregory, 1984; Pfeiffer y Rogers, 1997; Vahteristo et al., 1996)

En los años noventa e inicios del nuevo milenio, a medida que las técnicas cromatográficas iban perfeccionándose y diversificándose, surgían nuevas combinaciones de métodos

para cuantificar tiamina, riboflavina, niacina y Piridoxina, de manera individual o simultánea en diversas matrices, obteniendo resultados prometedores de acuerdo a cada estudio en particular. Las matrices a evaluar fueron, soya, tofu, pollo, salchichas, fórmulas infantiles, entre otras. (Chase et al., 1992; Fernando y Murphy, 1990; Hagg, 1994; Olds, Vanderslice y Brochetti, 1993; Valls et al., 1999)

Después de este recorrido de investigaciones para optimizar los métodos de análisis de vitaminas del complejo B en alimentos, la tendencia en el nuevo milenio, continúa esforzándose para evaluar nuevas matrices y lograr incluir la mayor cantidad de compuestos de forma simultánea en una sola inyección.

De esta variedad de métodos evaluados, fue escogido el método reportado por Ekinici y Kudakal, quienes según su reporte científico, lograron analizar muestras de Tahana, un cereal tradicional turco, con una metodología que les permite cuantificar vitaminas del complejo B, así como también vitamina C.

Este método utiliza un procedimiento de HPLC en fase reversa para la determinación de vitaminas hidrosolubles: vitamina C, niacina, Ácido Pantoténico (vitamina B5), Piridoxina (vitamina B6), tiamina (vitamina B1), ácido fólico y riboflavina (vitamina B2) en la matriz de cereal. El procesamiento de la muestra incluye una extracción de fase sólida con cartuchos Sep - Pak C₁₈. Las vitaminas hidrosolubles son analizadas con una columna Discovery C-18 de 150mm x 4.6mm con fase móvil KH₂PO₄ 0.1M (pH 7.0) - Metanol (90:10) con un flujo de 0.7mL/min por medio de una bomba isocrática. La identificación de los compuestos fue lograda luego de comparar

los tiempos de retención y los espectros UV de las muestras con los espectros de los estándares. Los límites de detección oscilaron entre 0.1 y 0.5mg/L. La recuperación se mantuvo alrededor de 96.51% - 99.4%. (Ekinci, y Kudakal 2005)

3.3.2 Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC):

Introducido en 2004 y utilizando los mismos principios que el HPLC, UPLC mejora en tres áreas: resolución cromatográfica, la velocidad del análisis y la sensibilidad.

El UPLC se basa en el uso de fase estacionaria consiste en partículas de menos de 2 micras (las columnas de HPLC son típicamente de partículas de 3 de 5 micras). La curva de Van Deemter, que se rige por una ecuación con tres componentes, muestra que el margen de caudal utilizable para una buena eficacia con un diámetro de la partícula es mucho mayor que para los diámetros más grandes. Por lo tanto, es posible aumentar el rendimiento y la velocidad de análisis, sin alterar el rendimiento cromatográfico.

Una desventaja es que el aumento de la presión requiere más mantenimiento y reduce la vida útil de las columnas de este tipo. Hasta la fecha un rendimiento similar e incluso superior se ha demostrado con fases estacionarias de alrededor de 2 micras de tamaño de partícula sin los efectos nocivos de la alta presión. Además, las fases de menos de 2 micrones, no son regenerables y por lo tanto tienen un uso limitado.

Actualmente no existen estudios previos de cuantificación de vitaminas hidrosolubles por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC). El único método reportado es el que se realizará en la presente investigación, propuesto por SCANCO

de Guatemala. Este método se encuentra publicado en las aplicaciones de la columna Acquity BEH AMIDE de la corporación Waters.

Este método permite la determinación de nicotinamida, piridoxina, riboflavina, niacina, tiamina, ácido ascórbico, cianocobalamina y ácido fólico. El método utiliza fase móvil de Acetonitrilo/Acetato de amonio 10Mm, con flujo de 0.3mL/min y detector UV/VIS a 265nm. La extracción de las vitaminas se realiza con una solución de Acetonitrilo/Metanol (75:25) con 0.2% de ácido fórmico.

4. JUSTIFICACIÓN

La población guatemalteca tiene en general una alimentación deficiente. Guatemala tiene el índice más alto de desnutrición de Latinoamérica, y el sexto del mundo. La Secretaría de Seguridad Alimentaria y Nutricional (SESAN), afirma que de los 22 departamentos del país, 20 registran algún tipo de desnutrición. El consumo de alimentos fortificados, tiene un papel protagónico en el combate de las deficiencias, pero se desconoce por parte de las autoridades de Salud Pública su éxito e impacto debido a que no se cuenta con datos recientes ni periódicos con respecto al nivel de fortificación de vitaminas del complejo B y ácido fólico en los alimentos fortificados, como es el caso de las harinas de trigo.

Existen laboratorios que analizan cada una de las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico por separado en muestras de alimentos, pero se requiere de metodología analítica por medio de la cual se puedan obtener datos precisos en menor tiempo y menor costo. Por lo que en este trabajo se propuso la utilización de dos métodos, uno con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otro con la técnica cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), para determinar éstos componentes en la harina de trigo. El proyecto es de impacto debido a que con dichos resultados las autoridades del Departamento de Regulación y Control de Alimentos (DRCA) perteneciente al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) podrán: evaluar y mejorar los planes de monitoreo de las harinas de trigo a nivel nacional, dirigir sus esfuerzos para controlar los tipos de harinas de trigo con mayor deficiencia a nivel de fortificación, establecer los lineamientos para controlar de una manera eficiente varias vitaminas en particular, y disponer de una metodología analítica que provea de resultados precisos y confiables en menor tiempo posible.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Evaluar dos métodos para determinación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico en harina de trigo, un método utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otro por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).

5.2 Objetivos Específicos:

- Desarrollar el procedimiento descrito por Ekinci y Kudakal, en el artículo titulado Determination of Seven Water-Soluble Vitamins in Tarhan, a Traditional Turkish Cereal Food, By High-Performance Liquid Chromatography, utilizando como matriz harina de trigo.
- Desarrollar el procedimiento cromatográfico sugerido por SCANCO de Guatemala, que aplica la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), para la cuantificación simultánea de ocho vitaminas hidrosolubles.
- Evaluar y comparar los resultados obtenidos con ambos métodos respecto a su efectividad para la determinación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico en harina de trigo.

6. HIPÓTESIS

Tanto el método descrito por Ekinci y Kudakal, en el artículo titulado *Determination of Seven Water-Soluble Vitamins in Tarhan, a Traditional Turkish Cereal Food, By High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, como el método sugerido por SCANCO de Guatemala por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), permiten la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico en harina de trigo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo:

Harina de trigo

Muestra: Harina de trigo sin vitaminas

7.2 Medios:

7.2.1 Recursos Humanos:

- § Autor: Br. María Gabriela Mencos De León.
- § Asesor: Licda. Julia Amparo García Bolaños
- § Revisora: Licda. Hada Marieta Alvarado, M.Ad.Ed.

7.2.2 Recursos Institucionales:

- § Laboratorio Nacional De Salud
- § Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.3 Recursos Materiales:

7.2.3.1 EQUIPO Y MATERIALES DE LABORATORIO:

- § Cromatógrafo líquido de alta resolución con bomba isocrática, detector de UV/VIS con arreglo de haz de diodos, y software adecuado.
- § Cromatógrafo líquido de ultra rendimiento con bomba binaria, detector de UV/VIS, y software adecuado.
- § Balanza analítica sensibilidad 0.1mg
- § Balones aforados actínicos de 100mL
- § Balones aforados actínicos de 50mL
- § Balones aforados actínicos de 25mL
- § Pipetas de 17.6mL

- § Pipetas de 12mL
- § Pipetas de 10mL
- § Pipetas de 9mL
- § Pipetas de 7mL
- § Pipetas de 6mL
- § Pipetas de 5mL
- § Pipetas de 4mL
- § Pipetas de 3mL
- § Pipetas de 2mL
- § Pipeta automática de 5uL – 50uL.
- § Pipeta automática de 20uL – 200uL.
- § Pipeta automática de 250uL – 1000uL.
- § Potenciómetro
- § Embudos
- § Papel filtro Whatman No. 2
- § Espátula
- § Columna: C-18 o RP-18 5 μ m, 15cm x 4.6mm
Discovery (Supelco)
- § Columna: BEH AMIDE 1.7 μ m, 1mm x 100mm
(Waters)
- § Cartucho Sep Pak C-18
- § Dispositivo de filtración sobre membrana Millipore
- § Membranas de 0.45 μ m
- § Baño ultrasónico
- § Tubos cónicos para centrifuga
- § Centrífuga
- § Viales ámbar de 2mL para HPLC
- § Viales ámbar de 2mL para UPLC

7.2.3.2 REACTIVOS

- § Estándares almacenados con deshidratante adecuado: riboflavina (hidrocloruro), tiamina (hidrocloruro), niacina, Acido Fólico
- § Solución de ácido clorhídrico 0.005M
- § Solución de fosfato monobásico de potasio 0.1M pH 7.0.
- § Solución de agua calidad HPLC acidificada pH 4.2
- § Metanol HPLC
- § Fase móvil de KH_2PO_4 0.1M - metanol 90:10 (pH:7)
- § Acetonitrilo
- § Acetato de amonio
- § Hidróxido de amonio
- § Ácido fórmico
- § Agua HPLC

7.3 Diseño de Investigación:

La investigación reúne las características de un análisis descriptivo.

- De la concentración de cada vitamina se sacó un promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.
- Se calcularon intervalos de confianza del 95% para estimar la media poblacional de los porcentajes de recuperación de cada vitamina. Los intervalos fueron comparados con el rango de aceptación.

7.4 Procedimiento:

7.4.1 Procedimiento Analítico: Técnica cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

7.4.1.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO:

Fase Móvil de KH_2PO_4 0.1M (pH 7.0)-Metanol, 90:10

- § Pesar 13.6282g de KH_2PO_4 y disolver con agua HPLC
- § Trasvasar la solución a un balón aforado de 1000mL.
- § Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.
- § Llevar la solución a pH 7.0 con NaOH 8N.

7.4.1.2 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES:

Solución madre de niacina (550ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 100mL, exactamente 55mg de estándar de niacina.
- § Agregar 50mL de agua HPLC.
- § Agitar hasta que la niacina se disuelva por completo.
- § Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de tiamina (100ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 100mL, exactamente 10mg de estándar de tiamina.
- § Agregar 50mL de agua HPLC.

§ Agitar hasta que la tiamina se disuelva por completo.

§ Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de ácido fólico (50ppm):

§ Pesar en un balón actínico aforado de 100mL, exactamente 5mg de estándar de ácido fólico.

§ Agregar 50mL de agua HPLC.

§ Agitar hasta que el ácido fólico se disuelva por completo.

§ Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de riboflavina (100ppm):

§ Pesar en un balón actínico aforado de 100mL, exactamente 10mg de estándar de riboflavina.

§ Agregar 50mL de agua HPLC.

§ Agitar hasta que la riboflavina se disuelva por completo.

§ Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución de mezcla de estándares (niacina 55ppm, tiamina 6ppm, ácido fólico 2ppm, Riboflavina 4ppm):

§ Las alícuotas para preparar la mezcla de estándares deben tomarse de las soluciones madres de estándares.

§ En un balón actínico aforado de 100mL agregar: 10mL de niacina, 6mL de tiamina, 4mL de ácido fólico y 4mL de riboflavina.

§ Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

7.4.1.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

- Pesar 5 gramos de harina de trigo en un balón actínico de 100mL y diluirlo en 60mL de agua HPLC.
- § Sonicar la muestra por 10 minutos.
- § Llevar la muestra a volumen con agua desionizada.
- § Centrifugar la muestra por 20 minutos.

Extracción por fase sólida (Sep Pak C₁₈):

- § Preparar agua acidificada (pH 4.2), mediante la adición de una solución 0.005M de HCl, gota a gota, sin dejar de agitar hasta alcanzar el pH predeterminado.
- § Activar la fase sólida con 10mL de metanol y luego 10mL de agua acidificada (pH 4.2).
- § Cargar la fase sólida con 10mL del sobrenadante del centrifugado de la muestra.
- § Lavar con 5mL de agua acidificada (pH 4.2).
- § Eluir con 10mL de metanol. (caudal de 1mL/min)
- § Recolectar la elución e inyectarla

7.4.1.4 ADICIÓN ESTANDAR DE VITAMINAS A MUESTRA DE HARINA LIBRE DE VITAMINAS.

- § Pesar 5g de harina de trigo libre de vitaminas en un balón actínico de 100mL.
- § Adicionarle 10mL de la solución madre de niacina, 6mL de la solución madre de tiamina, 4mL de la solución madre de ácido fólico y 4mL de la solución madre de riboflaviana.

- § Seguir el procedimiento de preparación de muestra del inciso 7.4.1.3

7.4.1.5 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Estabilizar el equipo con fase móvil y programar el equipo bajo las siguientes condiciones:

- § Fase móvil: Fase móvil KH_2PO_4 0.1M (pH 7) – metanol 90:10
- § Flujo o caudal: 0.7mL/min
- § Inyección: 20 μ L
- § Columna: Supelco Discovery C – 18 fase reversa (150mm x 4.6mm, 5 μ m) # 504955
- § Temperatura de columna 25°C
- § Detector: UV/VIS con arreglo de diodos: 234nm para la tiamina, 266nm para la riboflavina, 261nm para la niacina y 282nm para el ácido fólico.

7.4.1.6 PRUEBAS REALIZADAS:

- § Inyectar las soluciones madre de los estándares por separado, para identificar los tiempos de retención de cada una de las vitaminas.
- § Inyectar la solución de mezcla de estándares (niacina 55ppm, tiamina 6ppm, ácido fólico 2ppm, Riboflavina 4ppm)
- § Realiza la adición Estándar de vitaminas a muestra de harina de trigo libre de vitaminas. (debe realizarse diez veces a muestras de la misma harina).
- § Inyectar las diez muestras.

- § Realizar análisis: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y % de recuperación de las concentraciones de vitaminas adicionadas.
- § Calcular intervalos de confianza del 95% para estimar la media poblacional de los porcentajes de recuperación de cada vitamina. Los intervalos serán comparados con el rango de aceptación. Si algún intervalo contiene valores por fuera del rango serán rechazados.
- § Verificar el tiempo de retención del pico, comparado con el de referencia, comparar Área vs Concentración

$$\text{mg/Kg} = \frac{c \times v}{a}$$

Donde c = concentración en µg/mL.

v= volumen

a = masa de la muestra en gramos

7.4.2 Procedimiento Analítico: Técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)

7.4.2.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO:

Solución A1: 50% acetonitrilo/ 50% agua HPLC 10mM de acetato de amonio, pH = 9.00

- § Medir 100mL de acetonitrilo

- § Pesar 154.16gm de acetato de amonio, disolverlo con agua HPLC y luego trasvasar a un balón de 100mL y aforar con agua HPLC
- § Mezclar con el acetonitrilo
- § Llevar a pH = 9.0 con hidróxido de amonio.

Solución B1: 90% acetonitrilo/10% agua HPLC 10mM de Acetato de amonio, pH = 9.00

- § Medir 225mL de acetonitrilo
- § Pesar 192.7mg de acetato de amonio, disolverlo con agua HPLC y luego trasvasar a un balón de 25mL y aforar con agua HPLC
- § Mezclar con el acetonitrilo
- § Llevar a pH = 9.0 con hidróxido de amonio

Solvente lavado débil: 95% acetonitrilo/5% agua HPC

- § Medir 190mL de acetonitrilo
- § Agregar 10mL de agua HPLC.
- § Mezclar

Solvente lavado fuerte: 75% acetonitrilo/25% agua HPC

- § Medir 150mL de acetonitrilo
- § Agregar 50mL de agua HPLC.
- § Mezclar

Diluyente de muestras: 75% acetonitrilo/25% Agua HPC

- § Medir 375mL de acetonitrilo
- § Agregar 125mL de agua HPLC.
- § Agregar 1mL de ácido fórmico y mezclar.

7.4.2.2 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES:

Solución madre de niacina (550ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 25mL, exactamente 13.75mg de estándar de niacina.
- § Agregar 12mL de agua HPLC.
- § Agitar hasta que la niacina se disuelva por completo.
- § Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de tiamina (100ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 25mL, exactamente 2.5mg de estándar de tiamina.
- § Agregar 12mL de agua HPLC.
- § Agitar hasta que la tiamina se disuelva por completo.
- § Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de ácido fólico (50ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 25mL, exactamente 1.25mg de estándar de ácido fólico.
- § Agregar 12mL de agua HPLC.
- § Agitar hasta que el ácido fólico se disuelva por completo.
- § Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución madre de riboflavina (100ppm):

- § Pesar en un balón actínico aforado de 25mL, exactamente 2.5mg de estándar de riboflavina.
- § Agregar 12mL de agua HPLC.
- § Agitar hasta que la riboflavina se disuelva por completo.

§ Llevar a volumen con agua HPLC y agitar.

Solución de mezcla de estándares (niacina 55ppm, tiamina 6ppm, ácido fólico 2ppm, Riboflavina 4ppm):

§ Las alícuotas para preparar la mezcla de estándares deben tomarse de las soluciones madres de estándares.

§ En un balón actínico aforado de 50mL agregar: 5mL de niacina, 3mL de tiamina, 2mL de ácido fólico y 2mL de riboflavina.

§ Llevar a volumen con la solución diluyente de muestra y agitar.

7.4.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

§ Pesar 17 gramos de harina de trigo en un balón actínico de 50mL y diluirlo con 25mL de la solución diluyente de muestras.

§ Sonicar la muestra por 10 minutos.

§ Llevar la muestra a volumen con la solución diluyente de muestras.

§ Centrifugar la muestra por 20 minutos.

§ Filtrar por filtros de disco de 0.45µm.

§ Recolectar el filtrado en viales

7.4.2.4 ADICIÓN ESTANDAR DE VITAMINAS A MUESTRA DE HARINA LIBRE DE VITAMINAS.

§ Pesar 17g de harina de trigo libre de vitaminas en un balón actínico de 50mL.

§ Adicionarle 5mL de la solución madre de niacina, 3mL de la solución madre de tiamina, 2mL de la

solución madre de ácido fólico y 2mL de la solución madre de Riboflavina.

- § Seguir el procedimiento de preparación de muestra del inciso 6.4.2.3

7.4.1.5 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Estabilizar el equipo con fase móvil y programar el equipo bajo las siguientes condiciones:

- § Flujo o caudal: 0.3mL/min
- § Gradiente: 0.0min:0.1% A1/99.9% B2
6.5min: 70% A1/30% B2
6.51min: 0.1% A1/99.9% B2
- § Detector: UV/VIS
- § Longitud de onda: 265nm
- § Columna: Acquity UPLC BEH AMIDE 1.7µm
1.0mm x 1000mm

7.4.1.6 PRUEBAS REALIZADAS:

- § Inyectar las soluciones madre de los estándares por separado, para identificar los tiempos de retención de cada una de las vitaminas.
- § Inyectar la solución de mezcla de estándares (niacina 55ppm, tiamina 6ppm, ácido fólico 2ppm, Riboflavina 4ppm)
- § Realiza la adición Estándar de vitaminas a muestra de harina de trigo libre de vitaminas. (debe realizarse diez veces a muestras de la misma harina.
- § Inyectar las diez muestras.

- § Realizar análisis: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y % de recuperación de las concentraciones de vitaminas adicionadas.
- § Calcular intervalos de confianza del 95% para estimar la media poblacional de los porcentajes de recuperación de cada vitamina. Los intervalos serán comparados con el rango de aceptación. Si algún intervalo contiene valores por fuera del rango serán rechazados.
- § Verificar el tiempo de retención del pico, comparado con el de referencia, comparar Área vs Concentración

$$\text{mg/Kg} = \frac{\text{c} \times \text{v}}{\text{a}}$$

Donde c = concentración en $\mu\text{g/mL}$.

v= volumen

a = masa de la muestra en gramos

8. RESULTADOS

8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

8.1.1 Tiempos de retención de vitaminas por separado utilizando estándares

Tabla No. 1: Estándares de niacina, tiamina, ácido fólico y riboflavina inyectados por separado.

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Niacina	4.374	4.452	4.304	4.373	4.365	4.374
Tiamina	6.951	6.693	6.754	6.843	6.794	6.807
Ácido Fólico	13.731	13.460	13.614	13.722	13.497	13.605
Riboflavina	13.557	13.884	13.972	13.780	13.806	13.800

Fuente: Datos experimentales

8.1.2 Tiempo de Retención de la Mezcla de Estándares

Tabla No. 2: Mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Niacina	4.313	4.770	4.430	4.329	4.469	4.462
Tiamina	5.350	5.882	5.480	5.424	5.398	5.507
Ácido Fólico *	13.281*	13.625*	13.133*	13.310*	13.290*	13.328*
Riboflavina *	13.281*	13.625*	13.133*	13.310*	13.290*	13.328*

Fuente: Datos experimentales

*Poseen igual tiempo de retención y sus picos se traslapan.

8.1.3 Modificación del Método:

Tabla No. 3: Primera modificación, fase móvil: KH_2PO_4 0.1M – metanol 97:3, pH = 7.00

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)				
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5
Niacina	ND	ND	ND	ND	ND
Tiamina	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Fólico	ND	ND	ND	ND	ND
Riboflavina	ND	ND	ND	ND	ND

Fuente: Datos experimentales

ND: No detectado

Tabla No. 4: Segunda modificación, fase móvil KH_2PO_4 0.1M – metanol 97:3, pH = 4.00

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)				
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5
Niacina	ND	ND	ND	ND	ND
Tiamina	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Fólico	ND	ND	ND	ND	ND
Riboflavina	ND	ND	ND	ND	ND

Fuente: Datos experimentales

ND: No detectado

Tabla No. 5: Tercera modificación, fase móvil: KH_2PO_4 0.1M – metanol 70:30, pH = 7.00

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Niacina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiamina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Fólico	13.427	13.640	13.402	13.387	13.496	13.470
Riboflavina	18.045	18.256	18.021	18.106	18.097	18.105

Fuente: Datos experimentales

ND: No detectado

Tabla No. 6: cuarta modificación, fase móvil: KH_2PO_4 0.1M – metanol 70:30, pH = 4.00

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)				
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5
Niacina	ND	ND	ND	ND	ND
Tiamina	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Fólico	ND	ND	ND	ND	ND
Riboflavina	ND	ND	ND	ND	ND

Fuente: Datos experimentales

ND: No detectado

Tabla No. 7: Quinta modificación, fase móvil KH_2PO_4 0.1M, pH = 7.00 + Ácido hexanosulfónico de sodio 0.025M, gradiente de solventes:

Tiempo	Buffer	Metanol
0-5	98%	2%
5-25	75%	25%

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	Promedio
Niacina	1.953	1.932	1.946	1.950	1.944	1.945
Tiamina	3.506	3.489	3.511	3.520	3.504	3.506
Ácido Fólico	15.259	15.217	15.264	15.226	15.248	15.243
Riboflavina	23.898	23.863	23.899	23.870	23.864	23.879

Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 8: Sexta modificación: fase móvil KH_2PO_4 0.1M, pH = 4.00 + Ácido hexanosulfónico de sodio 0.025M, gradiente de solventes:

Tiempo	Buffer	Metanol
0-5	98%	2%
5-25	75%	25%

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Niacina	2.513	2.496	2.508	2.518	2.510	2.509
Tiamina	17.390	17.376	17.383	17.397	17.386	17.386
Ácido Fólico	21.466	21.444	21.450	21.471	21.462	21.459
Riboflavina	23.567	23.549	21.462	23.578	23.566	23.144

Fuente: Datos experimentales

8.2 Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

8.2.1 Tiempos de retención de vitaminas por separado utilizando estándares

Tabla No. 9: Estándares de riboflavina, niacina, tiamina y ácido fólico inyectados por separado.

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Riboflavina	0.894	0.895	0.893	0.893	0.894	0.894
Niacina	1.077	1.077	1.079	1.077	1.078	1.078
Tiamina	1.699	1.700	1.720	1.725	1.737	1.716
Ácido Fólico	4.355	4.363	4.359	4.361	4.361	4.360

Fuente: Datos experimentales

8.2.2 Tiempo de retención de la mezcla de estándares

Tabla No. 10: Mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico.

Estándar	Tiempo de Retención (minutos)					Promedio
	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	
Riboflavina	0.970	0.974	0.974	0.985	0.986	0.978
Niacina	1.168	1.171	1.175	1.187	1.188	1.178
Tiamina	1.810	1.809	1.830	1.851	1.856	1.831
Ácido Fólico	4.306	4.307	4.295	4.283	4.381	4.314

Fuente: Datos experimentales

8.2.3 Porcentaje de recuperación:

Tabla No. 11: Porcentaje de recuperación en muestras de harina de trigo, fortificadas con vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico.

Muestras	% de Recuperación Vitaminas			
	Riboflavina	Niacina	Tiamina	Ácido Fólico
Muestra A	100.0000	95.4215	104.9772	64.2257
Muestra B	96.4750	93.3210	98.1265	65.7763
Muestra C	95.0250	91.7183	94.9928	74.0796
Muestra D	97.6500	94.4569	96.4596	75.2301
Muestra E	98.9750	92.3072	96.8263	67.0768
Muestra F	98.9250	91.9772	106.9274	58.9236
Muestra G	95.8250	97.2539	95.0428	59.7239
Muestra H	95.1500	91.3081	97.5764	61.6246
Muestra I	94.8250	95.4835	98.5932	74.5798
Muestra J	97.0250	96.3915	106.3940	72.2289
Promedio	96.9875	93.9639	99.5916	67.3469
Desviación estándar	1.8481	2.1238	4.6618	6.3044
% Coeficiente de variación	1.9055	2.2602	4.6809	9.3611

Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 12: Intervalo de confianza del 95% para la media del porcentaje de recuperación por vitaminas, rango de aceptación por vitamina y conclusión.

Vitaminas	IC95%		Rango de aceptación	Conclusión
	Límite inferior	Límite superior		
Riboflavina	95.67%	98.31%	80% - 110%	Cumple
Niacina	92.44%	95.48%	90% - 107%	Cumple
Tiamina	96.26%	102.92%	80% - 110%	Cumple
Ácido fólico	62.84%	71.86%	80% - 110%	No cumple

Fuente: Datos experimentales, análisis elaborado en EPIDAT 3.1

9. DISCUSIÓN

9.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se desarrollaron las condiciones cromatográficas descritas por Ekinci y Kudakal para la determinación de vitaminas hidrosolubles.

Se realizaron inyecciones de los estándares de vitaminas del complejo B (tiamina, niacina y riboflavina) y ácido fólico por separado, para establecer los tiempos de retención (ver Tabla No. 1). Los picos de cada cromatograma fueron de una adecuada resolución. La primera vitamina en eluir fue la niacina con un tiempo de retención promedio de 4.374 minutos (ver Anexo No. 1), la segunda vitamina en eluir fue la tiamina con un tiempo de retención promedio de 6.80 minutos (ver Anexo No. 2), mientras que la riboflavina y el ácido fólico presentaron igual tiempo de retención al eluir en 13 minutos (ver Anexos No. 3 y 4).

Las inyecciones de cada estándar por separado también sirvieron para establecer el tiempo de corrida necesario para proceder a inyectar la mezcla de los cuatro estándares, la cual se estableció sería de 22 minutos, tomando en cuenta que los últimos dos picos tienen un tiempo de retención de 13 minutos.

Al analizar cada cromatograma se evidenció que efectivamente la mejor absorción para la tiamina es la longitud de onda de 234nm. Esto en comparación con las áreas de los picos que se observaron en las demás longitudes de onda a las que se realizó el análisis. Se determinó que la longitud de onda en la que la niacina presentó mayor absorción es a 266nm. Esta longitud de onda no coincide con la que reporta el método como la longitud de onda a la cual la niacina

tiene mayor absorción, ellos reportan 261nm. Con respecto al ácido fólico y riboflavina ambos analitos presentaron mayor absorción a longitud de onda de 282nm, por lo que la riboflavina tampoco concuerda con la longitud de onda de mayor absorción reportada en el método de 266nm.

Al analizar la mezcla de los cuatro estándares según la Tabla No. 2, se determinó que existe una interferencia entre el ácido fólico y la riboflavina (ver Anexo No.5), esto debido a que ambos presentaron igual tiempo de retención, por lo que los picos se traslaparon, teniendo como consecuencia una sumatoria de sus áreas, lo que hizo imposible poder establecer las cantidades presentes de cada uno de estos analitos.

Con las pruebas obtenidas de la mezcla de los cuatro estándares, se estableció que al desarrollar el método descrito por Ekinci y Kudakal para la determinación de vitaminas hidrosolubles, no se obtienen los resultados esperados que permitan cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, niacina, riboflavina) y ácido fólico. Debido a que el ácido fólico y la riboflavina eluyen al mismo tiempo y no son posibles de separar.

Con el propósito de solucionar el problema se realizaron modificaciones al método en la proporción de buffer-metanol y pH de la fase móvil, tratando de encontrar las condiciones cromatográficas que permitieran la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, niacina, riboflavina) y ácido fólico. Todas las modificaciones del método se trabajaron a 265nm, esta longitud de onda es adecuada para identificar a las cuatro vitaminas.

La primera modificación que se realizó fue cambiar la proporción de la fase móvil. Se aumentó la proporción del buffer y disminuyó la del metanol, la fase móvil utilizada fue KH_2PO_4 0.1M (pH 7) – metanol 97:3. Esto debido a que la riboflavina es relativamente hidrofóbica y el resto de las vitaminas trabajadas son hidrofílicas, se esperaba retrasar la elución de la riboflavina con menos proporción de metanol, logrando separarla del ácido fólico. Pero los resultados no fueron buenos, el aumento de proporción de buffer hizo que las vitaminas eluyeran demasiado rápido y no se logró la identificación (ver Tabla No. 3).

La siguiente prueba se hizo con la misma proporción de fase móvil KH_2PO_4 0.1M – metanol 97:3, pero se cambió el pH de neutro a pH ácido de 4.0 para protonar las vitaminas y determinar si esto producía una separación adecuada de las vitaminas, pero de la misma manera que a pH 7 las vitaminas no fueron posibles de identificar (ver Tabla No. 4).

Observando los resultados de las primeras dos modificaciones se decidió cambiar nuevamente la proporción de fase móvil – metanol, disminuyendo la proporción del buffer y aumentando la de metanol, la fase móvil utilizada fue KH_2PO_4 0.1M (pH 7) – metanol 70:30. Con estas condiciones se esperaba que al disminuir la proporción de buffer las vitaminas tardaran más en eluir y se separaran de forma adecuada. Los resultados fueron favorables para el ácido fólico que eluyó en el minuto 13 y la riboflavina que eluyó en el minuto 18. Desafortunadamente la niacina y tiamina no se lograron identificar (ver Tabla No. 5 y Anexo No. 6).

La siguiente prueba se hizo con la misma proporción de fase móvil KH_2PO_4 0.1M – metanol 70:30, pero se cambió a pH ácido de 4.0

para evaluar si al protonarse las vitaminas con la fase móvil se lograba la adecuada separación de las vitaminas, pero no fue posible identificar ninguna de las cuatro vitaminas (ver Tabla No. 6).

Según el comportamiento de los estándares se observó que a mayor proporción de metanol se logró la separación del ácido fólico y la riboflavina, pero no de la niacina y tiamina. Por lo que se decidió modificar el método utilizando un gradiente de fase móvil donde A= KH_2PO_4 0.1M y B = metanol. De 0 minutos - 5 minutos se aumentó linealmente el gradiente A - B (98% - 2%), de 5 minutos - 27 minutos se aumentó linealmente el gradiente A - B (75% - 25%). A la fase móvil se le agregó ácido hexanosulfónico de sodio 0.025M, este es un reactivo de par iónico que atrapa mejor los iones a la columna, aumentando el tiempo de retención, también ayuda a definir mejor los picos. Esta modificación de gradiente se realizó a pH 7 y pH 4. En ambos casos como se observa en las Tablas No. 7 y 8 se obtuvo la separación e identificación de las cuatro vitaminas (ver Anexos No. 7 y 8). El problema se presentó al trabajar con las muestras de harina, como se observa en el cromatograma del Anexo No. 9, en un inicio de la corrida cromatográfica salen gran cantidad de impurezas siendo imposible identificar a la niacina que posee un tiempo de retención de 2.509 minutos. Como se observa en el cromatograma el resto de la corrida no permite identificar de manera adecuada el resto de las vitaminas, por lo tanto ésta modificación tampoco produjo resultados que permitieran la adecuada identificación simultánea de las cuatro vitaminas. Es importante tomar en cuenta que la harina de trigo es una matriz muy compleja por la gran cantidad de componentes químicos que contiene y por esto no se obtuvieron los mismos resultados q se obtuvieron con los estándares de las vitaminas.

9.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC):

Se desarrollaron las condiciones cromatográficas descritas en el método sugerido por SCANCO de Guatemala, que permite la cuantificación de ocho vitaminas hidrosolubles.

Se realizaron inyecciones de los estándares vitaminas del complejo B (tiamina, niacina y riboflavina) y ácido fólico por separado, para establecer los tiempos de retención de los mismos (ver Tabla No. 9).

La primera vitamina en eluir fue la riboflavina con un tiempo promedio de retención de 0.894 minutos (ver Anexo No. 10), la segunda vitamina en eluir fue la niacina con un tiempo de retención promedio de 1.078 minutos (ver Anexo No. 11), la tercera vitamina en eluir fue la tiamina con un tiempo promedio de retención de 1.716 minutos (ver Anexo No. 12) y por último eluyó el ácido fólico con un tiempo promedio de retención de 4.360 minutos (ver Anexo No. 13).

Al analizar la mezcla de los cuatro estándares se evidenció que se obtiene una adecuada separación de cada vitamina (ver Anexo No. 14), demostrando que el método permite la identificación simultánea de las vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico. Se observó que las cuatro vitaminas eluyen antes del minuto 4.5 (ver Tabla No. 10), pero es necesario que el tiempo de corrida sea de 6.51 minutos para poder llevar el gradiente de solventes a sus condiciones iniciales antes de realizar la siguiente inyección.

Para evaluar la precisión del método se realizó adición estándar a diez muestras de harina de trigo que no contenían nada de vitaminas (ver Anexo No. 15) y se calculó el porcentaje de recuperación de cada estándar. El rango de aceptación del porcentaje de recuperación en el

que se basa este estudio es tomado del manual de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para el programa de validación de métodos⁽⁴²⁾, el rango del porcentaje de recuperación aceptable es estimado en función de la concentración del analito (ver Anexo No. 16). Las diez muestras de harinas fueron fortificadas con 55ppm de niacina, 6ppm de tiamina, 4ppm de riboflavina y 2ppm de ácido fólico. Para la niacina el rango aceptable es de 90% - 107%, para la tiamina, riboflavina y ácido fólico el rango aceptable es 80% - 110%. Según la Tabla No. 11 el promedio del porcentaje de recuperación de la riboflavina fue 96.99%, el promedio del porcentaje de recuperación de la niacina fue 93.96%, el promedio del porcentaje de recuperación de la tiamina fue 99.59% y el promedio del porcentaje de recuperación del ácido fólico fue 67.35%. Por lo tanto se puede establecer que el método proporciona porcentajes de recuperación aceptables para la riboflavina, niacina y tiamina, siendo un método preciso para estas tres vitaminas. Por lo contrario el porcentaje de recuperación no es aceptable para el ácido fólico por lo que no es un método preciso para esta vitamina.

Del porcentaje de recuperación obtenido de las diez muestras de harina de trigo también fueron calculadas la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada vitamina (ver Tabla No. 11).

El manual de la AOAC para el programa de validación de métodos incluye una tabla con datos desviación estándar estimada en función de la concentración de analito (ver Anexo No. 17) Según la Tabla No. 11 la desviación estándar de la riboflavina fue 1.8481, la desviación estándar de la niacina fue 2.1238, la desviación estándar de la tiamina fue 4.6618 y la desviación estándar del ácido fólico fue 6.3044. En base al manual de la AOAC para el programa de

validación de métodos, la desviación estándar obtenida de cada vitamina se encuentra en un rango aceptable.

Con respecto a los coeficientes de variación calculados del porcentaje de recuperación obtenido de cada vitamina, se observa una variabilidad aceptable de los datos obtenidos, la riboflavina presentó un coeficiente de variación de 1.9055%, la niacina presentó un coeficiente de variación de 2.2602%, la tiamina presentó un coeficiente de variación de 4.6809% y el ácido fólico un coeficiente de variación de 9.3611%. Los resultados de la tiamina y ácido fólico fueron los que mayor variabilidad presentaron, es importante tomar en cuenta que en muestras alimentarias, la precisión depende en gran medida del tipo matriz de la muestra y la concentración de la sustancia analizada. La harina de trigo es una matriz difícil de trabajar por su gran cantidad de componentes químicos, ésta contiene: almidón, azúcares, ácidos grasos y materias minerales. En el caso del ácido fólico las muestras se fortificaron con una baja concentración de 2ppm.

El siguiente paso del diseño estadístico fue calcular intervalos de confianza del 95% de los porcentajes de recuperación obtenidos de cada vitamina, para estimar la media poblacional de los porcentajes de recuperación de las vitaminas. Los intervalos de confianza obtenidos se compararon con el rango de aceptación anteriormente mencionado para cada vitamina. Si algún intervalo contenía valores que estuvieran por fuera del rango aceptado, este sería rechazado. En la Tabla No. 12 se observa que el intervalo de confianza de la riboflavina fue 95.67% - 98.31%, el intervalo de confianza de la niacina fue 92.44% - 95.48%, el intervalo de confianza de la tiamina fue 96.26% - 102.92% y el intervalo de confianza del ácido fólico fue 62.84% - 71.86%.

Por lo tanto se concluye que por el método de la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento, los porcentajes de recuperación de la riboflavina, la niacina y la tiamina cumplen, pues obtuvieron intervalos de confianza dentro del rango del porcentaje de recuperación aceptado para estas vitaminas. En el caso del ácido fólico no cumple pues el intervalo de confianza estimado está por afuera del rango del porcentaje de recuperación aceptado para ésta vitamina.

10. CONCLUSIONES

10.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

10.1.1 El artículo de Ekinci y Kudakal, reporta que la adecuada longitud de onda para la identificación de niacina es 261nm y para la riboflavina es 266nm, esto no coincide con los resultados obtenidos experimentalmente, donde la mejor longitud de onda para la niacina fue 261nm y para la riboflavina fue 282nm.

10.1.2 Al desarrollar el procedimiento cromatográfico descrito por Ekinci y Kudakal para la determinación de siete vitaminas hidrosolubles, no se obtuvieron los resultados reportados, debido a que existe una interferencia entre el ácido fólico y la riboflavina, ambos presentaron igual tiempo de retención, por lo que los picos se traslaparon.

10.1.3 El procedimiento cromatográfico descrito por Ekinci y Kudakal por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no permite la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico.

10.1.4 Las modificaciones en proporción de buffer - metanol y pH realizadas al método descrito por Ekinci y Kudakal, con el propósito de lograr la cuantificación simultánea de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina) y ácido fólico, no produjeron resultados aceptables.

10.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC)

10.2.1 El resultado de la mezcla de los cuatro estándares obtenida por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) evidenció que se obtiene una adecuada separación de cada vitamina, demostrando que el método permite la determinación simultánea de las vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico.

10.2.2 EL método realizado por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento, proporciona porcentajes de recuperación aceptables para la riboflavina, niacina y tiamina, siendo un método preciso para estas tres vitaminas. Por lo contrario el porcentaje de recuperación obtenido para el ácido fólico no está dentro del rango aceptado.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1** Debido a que se está trabajando con vitaminas que son degradadas por la luz, es importante que en las áreas de análisis se utilice luz amarilla y viales color ámbar para evitar la degradación de las vitaminas trabajadas.
- 11.3** Continuar realizando pruebas para mejorar el porcentaje de recuperación del ácido fólico, debido a que este se encuentra por debajo del rango aceptado para esta vitamina.

12. REFERENCIAS

1. Acuerdo Gubernativo 144-2001. (2001). Consultado el 11 de abril de 2009, de http://www.sgp.gob.gt/PaginaWeb/Acuerdos/2001/min_salud/AG144-2001.pdf
2. Agustin J. (1984). Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Foods Liquid Chromatography. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 67:1012 – 1015.
3. Análisis de la Situación de la Seguridad Alimentaria Nutricional de Guatemala. (n.d.). Consultado el 27 de abril de 2009, de www.ops.org.gt/ADS/San/Cap%20IV.pdf
4. Ang, C.Y.W., Moseley, F.A. (1980). Determination of Thiamin and Riboflavin in Meat Products by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 483 – 486.
5. Berglund, P.T., Dick, J.W y Dreher, M.L. (1987). Effect of Form of Enrichment and Iron on Thiamin, riboflavin and Niacinamide, and Cooking Parameters of Enriched Spaghetti. *Journal of Food Science*, 52:1367 – 1371.
6. Chase, G.W., et al. (1992). Liquid Chromatographic Determination of Thiamine, Riboflavine and Pyridoxine in Infant Formula. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 75:561 – 565.

7. Consumer Eroski. (2005). La vitamina B2 juega un papel importante en la obtención de la energía que el organismo necesita. Consultado el 8 de febrero de 2009, de http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/complementos_dieteticos/2005/02/24/117338.php
8. Curso de Alimentación y Salud. (n.d.). Vitaminas Hidrosolubles. Consultado el 11 de abril de 2009, de <http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica I/guia/guianutr/compo42.htm#principio>
9. David, L. (2004). Fortificación de Harina de Trigo en América Latina y Región del Caribe [versión electrónica]. *Revista chilena*, Santiago, v. 31, n. 3. Consultada el 26 de junio de 2009, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000300009&lng=es&nrm=iso>.
10. Delgadillo, J.R., et al. (2003). El desarrollo histológico del tejido óseo en carencia de riboflavina. Consultado el 7 de febrero de 2009, UNMSM. Facultad de Odontología. 6 (12): 30-36, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2003_n12/desarrollo.htm
11. Doherty, R.F., y Beecher, G.R. (2003). A Method for the Analysis of Natural and Synthetic Folate in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 354 - 361.
12. Ekinçi, R., y Kudakal, C. (2005). Determination of Seven Water-Soluble Vitamins in Thrhana, a Traditional Turkish Cereal Food, by High Performance Liquid Chromatography. *Acta Chromatographica* 15: 289 - 297.

13. Enciclopedia Lifespan A - Z. (n.d.). Enciclopedia de Información de Salud. Consultado el 7 de febrero de 2009, de <http://www.lifespan.org/adam/spanishhealthillustratedencyclopedia/5/002399.html>
14. Eskin, N.A.M. (1990). *Biochemistry of Foods*. New York: Academic Press Inc
15. Esteve, M.J., et al. (2001). Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Mushrooms by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1450 - 1454.
16. Fellman, J.K., et al. (1982). Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Selected Foods by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 47:2048 - 2051.
17. Fennema, O.R., (1985). *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc.
18. Fernando, S.M., y Murphy, P.A. (1990). HPLC Determination of Thiamin and Riboflavin in Soybeans and Tofu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:163 - 167.
19. Fortificación de Alimentos. (n.d.). Consultado el 26 de abril de 2009, de www.mostproject.org/Updates_Feb05/Trigo.pdf
20. Gregory III, J.F. (1984). Determination of Folic Acid in Foods and Other Biological Materials. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 67:1015 - 1019.

21. Hagg, M. (1994). Effect of Various Commercially Available Enzymes in The Liquid Chromatographic Determination with External Standarization of Thiamine and Riboflaven in Foods. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 77:681 – 686.
22. Huber, L. (n.d.). Validation of Analytical Methods and Procedures. Consultado el 27 de febrero de 2011, de www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm.
23. Hudson, T.S., Subramanian, S., y Allen, R. (1984). Determination of Pantothenic Acid, Biotin and Vitamin B12 in Nutritional Products. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 67:994 – 998.
24. Kamman, J.F., Labuza T.P., y Warthesen, J.J. (1981). Kinetecs of Thiamin and Riboflvin Loss in Pasta as a Function of Constant and Variable Storage Conditions. *Journal of Food Science*, 46: 1454 – 1461.
25. Kamman, J.F., Labuza, T.P., y Warthesen, J.J. (1980). Thiamin and Riboflavin Analisis by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 45: 1497 – 1499.
26. Klejdus B., et al. (2004). Simultaneous Determination of Water and Fat-Soluble Vitamins in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Diode Array Detection. *Analytica Chimica Acta*, 520:57 – 67.
27. Lam, F.L., Holcomb, I.J., y Fusari, S.A. (1984). Liquid Chromatographic Assay of Ascorbic Acid, Niacinamide, Pyridoxine, Thiamine and Riboflavine in Multivitamin-Mineral Preparations. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 67:1007 – 1012.

28. Maeda, Y., et al. (1989). Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Water-Soluble Vitamins, Caffeine, and Preservative in Oral Liquid Tonics. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 72:244 - 247.
29. Malouf, R., Grimley, J. (2008). Ácido fólico con o sin vitamina B12 para la cognición y la demencia. Consultado el 8 de febrero de 2009, Biblioteca Cochrane Plus, Oxford: <http://www.cochrane.org/reviews/es/ab004514.html>
30. Niacina. (2007). Consultado el 7 de febrero de 2009, University of Maryland Medical Center: http://www.umm.edu/esp_ency/article/002409all.htm
31. Olds, S.J., Vanderslice, J.T., y Brochetti, D. (1993). Vitamin B6 in Raw and Fried Chicken by HPLC. *Journal of Food Science*, 58:505 - 508.
32. Pfeiffer, C.M., Rogers, L.M., y Gregory III, J.F. (1997). Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:407 - 413.
33. Presoto, A.E.F., Rios, M.D.G., y Almeida-Muradian, L.B. (2004). Simultaneous High Performance Liquid Chromatography Analysis of Vitamins B1, B2, and B6 in Royal Jelly. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15: 136 - 139

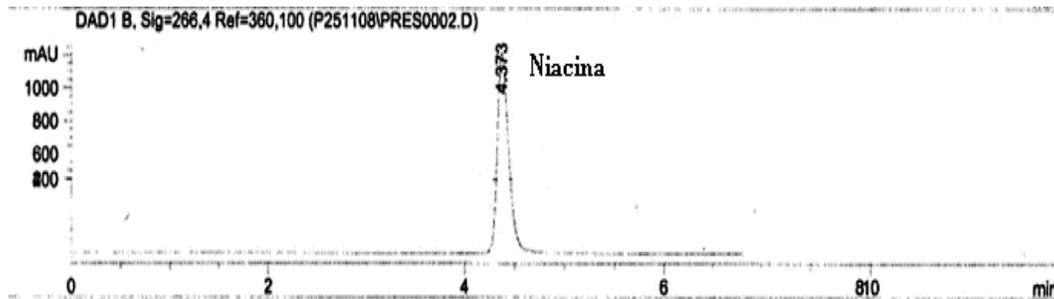
34. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.15:06. (2006). Consultado el 26 de abril de 2009, de [http://dace.mineco.gob.gt/Protempore/upload/RTCA%2067.01.15.06%20Harina%20de%20Trigo%20Fortificada%20\(revision%20de%20co.doc](http://dace.mineco.gob.gt/Protempore/upload/RTCA%2067.01.15.06%20Harina%20de%20Trigo%20Fortificada%20(revision%20de%20co.doc).
35. Resolución No. 2012007 Del Consejo De Ministros De Integración Económica (COMIECO XLV). (2007). Consultado el 11 de abril de 2009, de www.congreso.gob.gt/archivos/acuerdos/.../gtamx0324-2007.pdf
36. Vahteristo, L.T., et al. (1996). Improvements in the Analysis of Reduced Folate Monoglutamates and Folic Acid in Food by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:477 - 482.
37. Valls, F., et al. (1999). Determination of Total Riboflavin in Cooked Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1067 - 1070.
38. Valls, F., et al. (2001). Determination of Vitamin B6 in Cooled Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 38 - 41.
39. Vanderslice, J.T., Brownlee, S.R., y Cortissoz, M.E. (1984). Liquid Chromatographic Determination of Vitamin B6 in Foods. *Association of Official Analytical Chemists Journal*, 67:944 - 998.
40. West, E.S. (1969). *Bioquímica Médica*. México: Nueva Editorial Interamericana. S.A. de C.V.

41. Woodcock, E.A., Warthesen, J.J., y Labuza, T.P. (1982). Riboflavin Photochemical Degradation In Pasta Measured by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 47: 545 – 549.

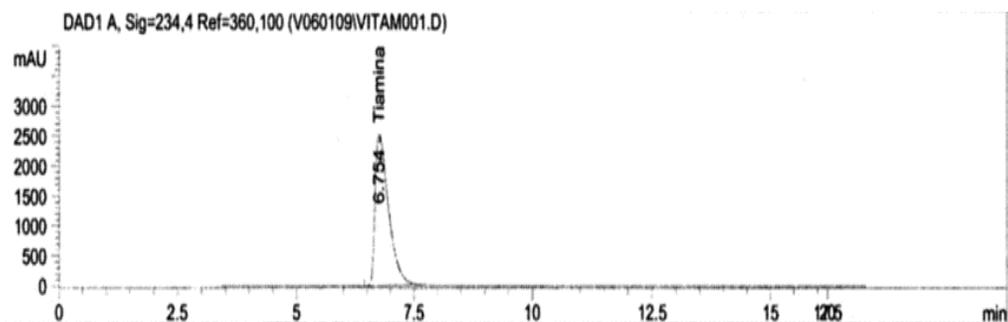
42. Zafra-Gómez, A., et al. (2006). Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Supplemented Foods by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4531 – 4536

13. ANEXOS

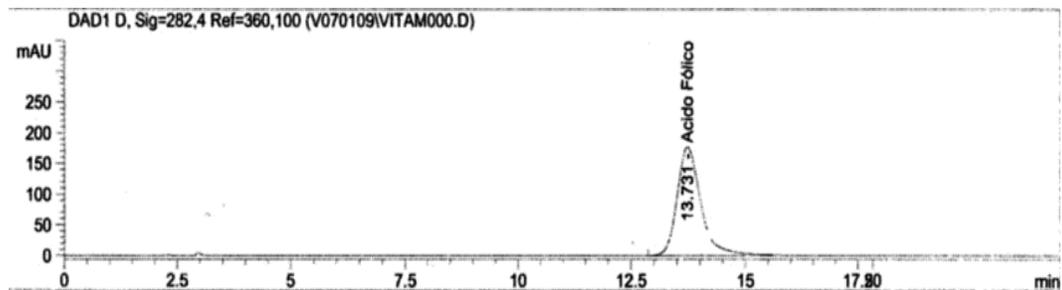
Anexo No. 1: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de niacina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



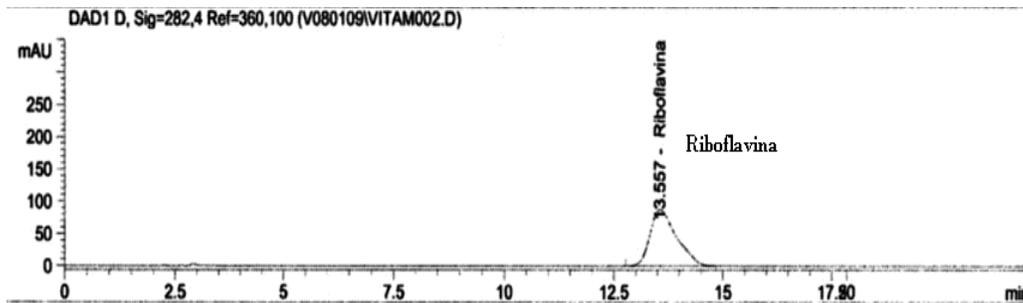
Anexo No. 2: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de tiamina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



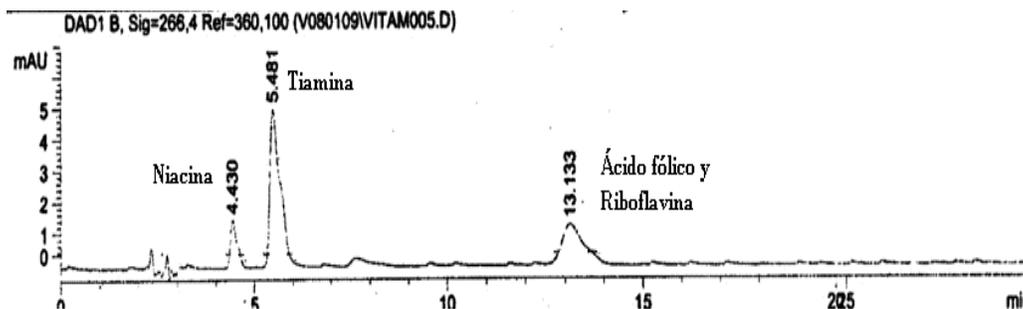
Anexo No. 3: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



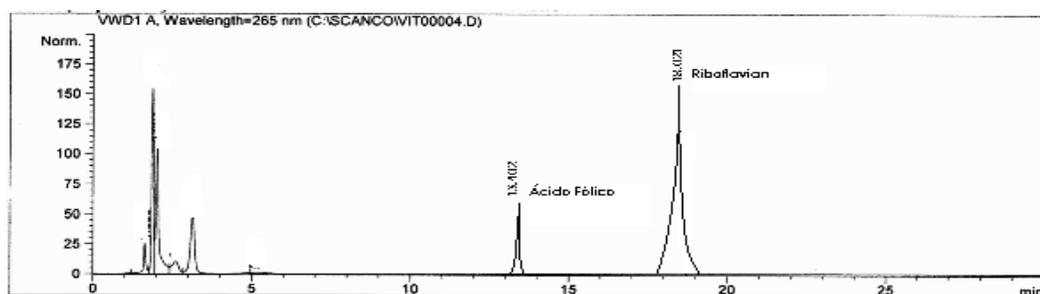
Anexo No. 4: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de riboflavina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



Anexo No. 5: Cromatograma del tiempo de retención de la mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

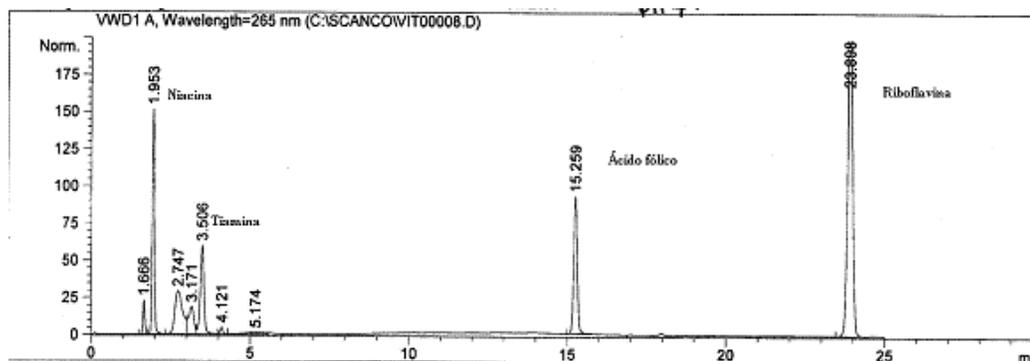


Anexo No. 6: Cromatograma de la tercera modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fase móvil: KH_2PO_4 0.1M – metanol 70:30, pH = 7.00



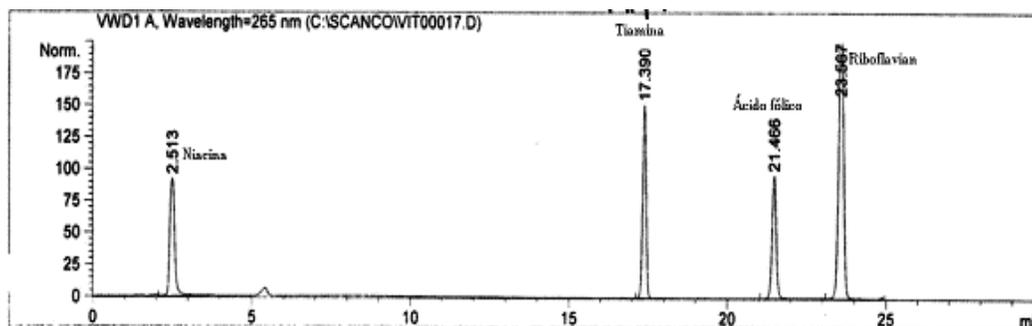
Anexo No. 7: Cromatograma de la quinta modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fase móvil KH_2PO_4 0.1M, pH = 7.00 + Ácido hexanosulfónico de sodio 0.025M, gradiente de solventes:

Tiempo	Buffer	Metanol
0-5	98%	2%
5-25	75%	25%

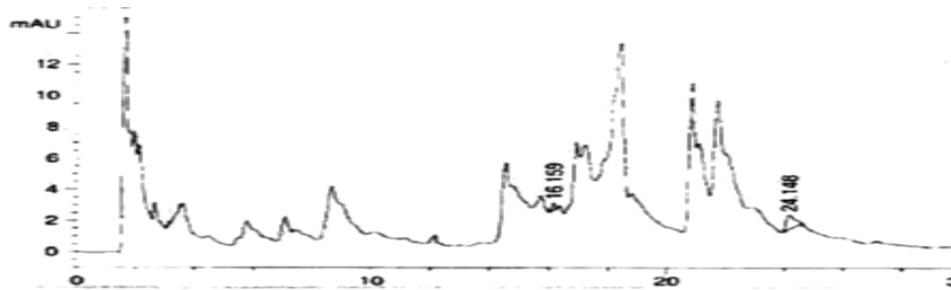


Anexo No. 8: Cromatograma de la sexta modificación al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): fase móvil KH_2PO_4 0.1M, pH = 4.00 + Ácido hexanosulfónico de sodio 0.025M, gradiente de solventes:

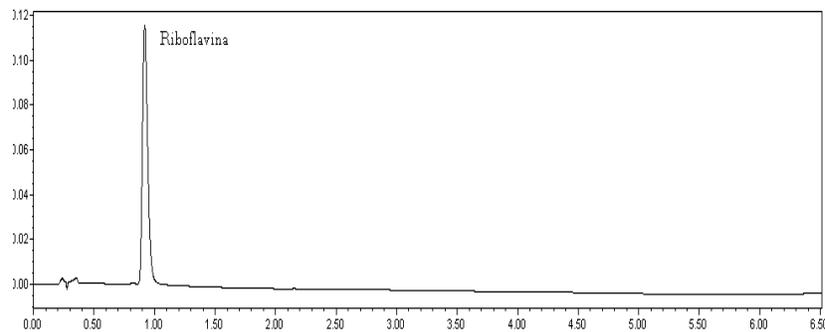
Tiempo	Buffer	Metanol
0-5	98%	2%
5-25	75%	25%



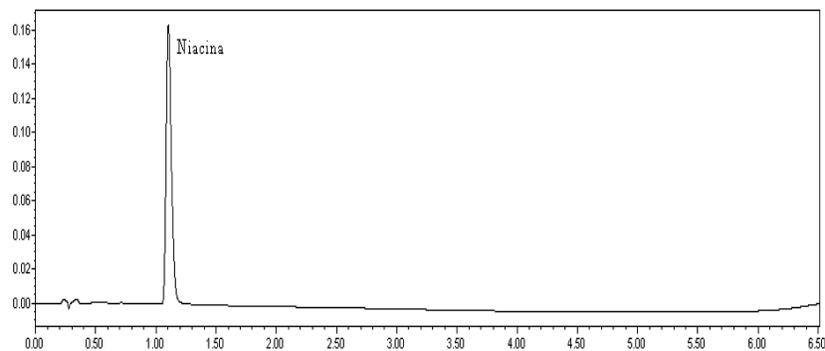
Anexo No. 9: Cromatograma de harina de trigo por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



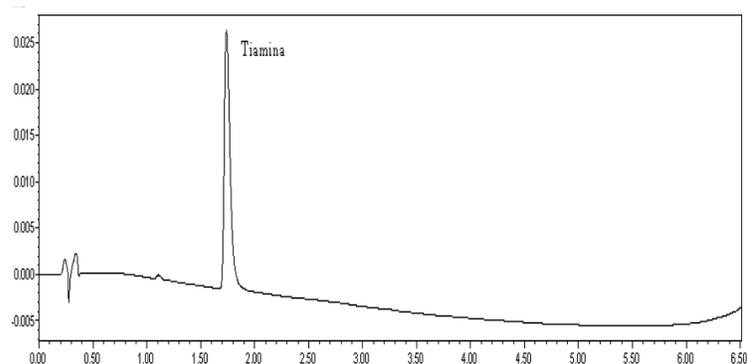
Anexo No. 10: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de riboflavina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).



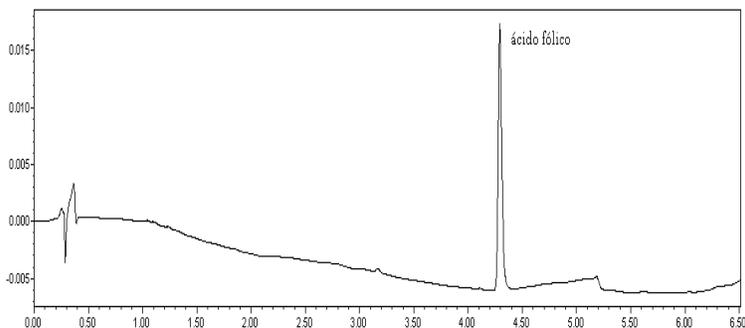
Anexo No. 11: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de niacina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).



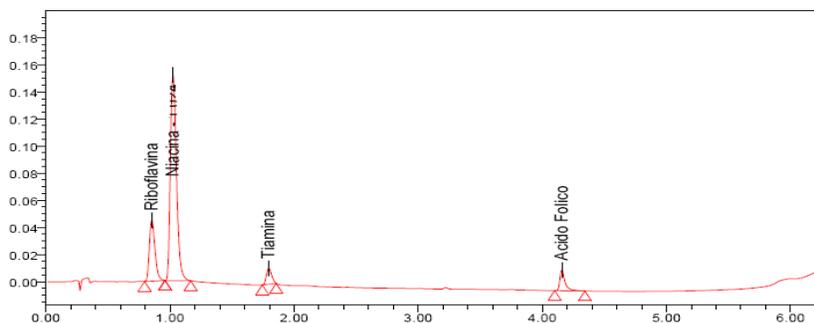
Anexo No. 12: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de tiamina por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).



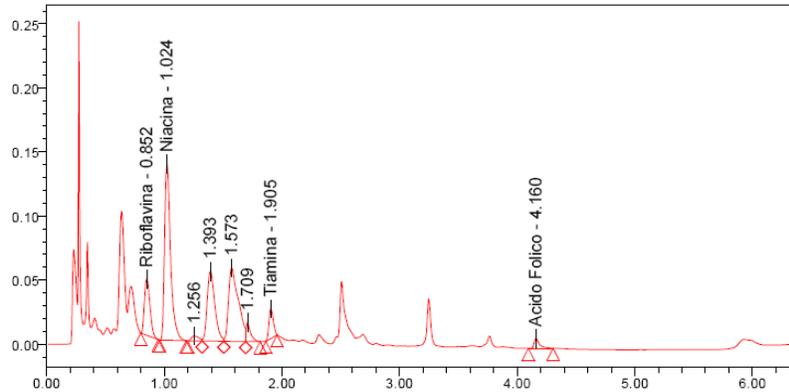
Anexo No. 13: Cromatograma del tiempo de retención del estándar de ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).



Anexo No. 14: Cromatograma del tiempo de retención de la mezcla de estándares de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina, riboflavina) y ácido fólico por la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).



Anexo No. 15: Cromatograma de una muestra de harina de trigo fortificada por la técnica de cromatografía líquida de de ultra rendimiento (UPLC).



Anexo No. 16: Tabla del rango del porcentaje de recuperación aceptado, estimado en función de la concentración del analito.

Unidad	% de Recuperación
100%	98 - 102
10%	98 - 102
1%	97 - 103
0.1 %	95 - 105
100 ppm	90 - 107
10 ppm	80 - 110
1 ppm	80 - 110
100 ppb	80 - 110
10 ppb	60 - 115
1 ppb	40 - 120

Fuente: Manual de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para el programa de validación de métodos

Anexo No. 17: Tabla con datos desviación estándar estimada en función de la concentración de analito.

Unidad	DSR (%)
100%	1.3
10%	2.8
1%	2.7
0.1 %	3.7
100 ppm	5.3
10 ppm	7.3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

Fuente: Manual de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para el programa de validación de métodos



Br. María Gabriela Mencos De León

Autora



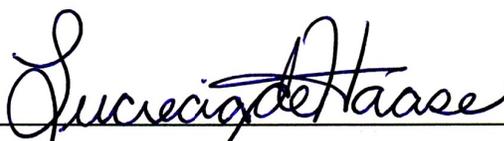
Licda. Julia Amparo García Bolaños

Asesora



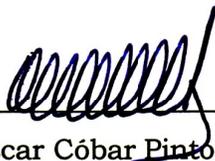
Licda. Mada Marieta Alvarado Beteta M.Ad. Ed.

Revisora



Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela



Oscar Cobar Pinto, Ph.D.

Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia