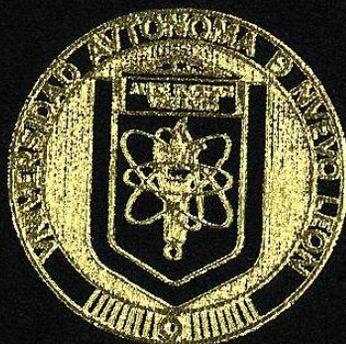


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS

VALIDACION DE UN METODO PARA LA CUANTIFICACION
DE ACIDO FOLICO EN HARINA DE MAIZ VITAMINADA Y
PRODUCTOS DERIVADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

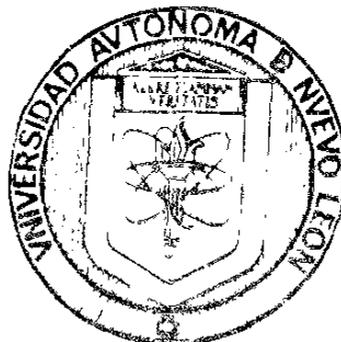
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica

PRESENTA
CARMEN JULIA GUERRERO QUIROZ



1020148981

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

VALIDACION DE UN METODO PARA LA CUANTIFICACION
DE ACIDO FOLICO EN HARINA DE MAIZ VITAMINADA Y
PRODUCTOS DERIVADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica

PRESENTA
CARMEN JULIA GUERRERO QUIROZ

CD. UNIVERSITARIA

DICIEMBRE 2002

97-332

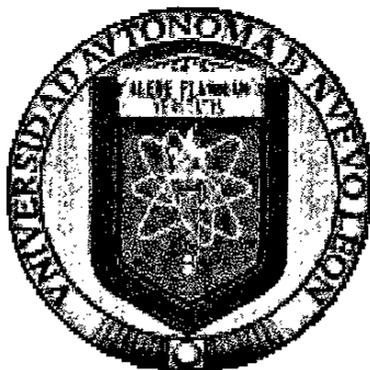
TH
Z5521
F00
2002
.E8



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE MAÍZ VITAMINADA Y PRODUCTOS
DERIVADOS EMPLEANDO CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN**

Por

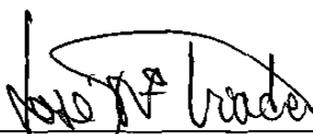
CARMEN JULIA GUERRERO QUIROZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica**

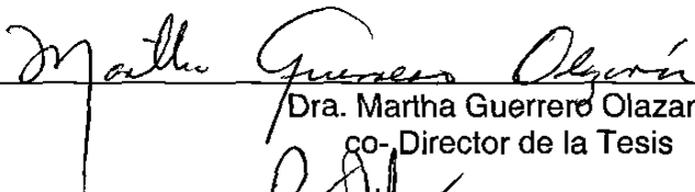
Diciembre 2002

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE ÁCIDOFÓLICO EN HARINA DE MAÍZ VITAMINADA
Y PRODUCTOS DERIVADOS EMPLEANDO
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN**

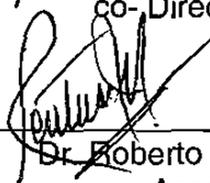
Aprobación de la Tesis:



Dr. Jose M. Viader Salvadó
Director de la Tesis



Dra. Martha Guerrero Olazarán
co-Director de la Tesis



Dr. Roberto Contreras Medellín
Asesor Externo

MC. Ma. Isabel Saenz Tavera
Vocal

Dr. Juan M. Barbarín Castillo
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Ma. Viader Salvadó, a la Dra. Martha Guerrero Olazaran, al Dr. Roberto Contreras Medellín, así como a la M.C. Ma. Isabel Saenz Tavera, por todas sus sugerencias e interés en la realización y revisión de este trabajo.

A la empresa Constructora Industrial y Agropecuaria (GRUMA), por el apoyo económico para la realización de mis estudios y de mi tesis.

A los Doctores Roberto Contreras Medellín y Alfredo Morales Díaz, por permitirme el uso de las instalaciones del Laboratorio Central y por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al Q.B.P. Alejandro Lozada Alton y a mis hermanos por el apoyo moral que siempre me han brindado.

*Dedico este trabajo con amor y gratitud
a mi querida Hermana.*

Claudia Noemi Guerrero Quiroz

CONTENIDO

Capitulo	Pagina
1. Introducción	
1.1 Características generales del ácido fólico1
1.2 Adición de nutrimentos en harina de maíz3
1.3 Objetivo general8
1.4 Objetivos específicos8
2. Materiales, Reactivos y Equipo	
2.1 Materiales9
2.2 Reactivos10
2.3 Equipo11
3. Preparación de Reactivos	
3.1 Preparación de la fase móvil de trabajo y soluciones para la extracción del AF en la muestra.12
3.2 Preparación de reactivos para el acoplamiento de FBP-Affigel 1013
3.3 Preparación de reactivos para la purificación y concentración por cromatografía de afinidad .14	
4. Metodología	
4.1 Optimización de los parámetros cromatográficos para el análisis de AF por CLAR17
4.2 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo de AF por CLAR19
4.3 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cuantitativo de AF por CLAR20
4.4 Evaluación de la linealidad del método de análisis del AF por CLAR20
4.5 Optimización de la metodología de extracción de AF en harina de maíz.21
4.5.1 Pruebas iniciales para la extracción del AF en harina de maíz vitaminada y sin vitaminas22
4.5.1.1 Procedimiento de extracción en solución alcalina diluida de hidróxido de amonio22
4.5.1.2 Procedimiento de extracción en solución buffer a pH alcalino23

4.5.2 Purificación y concentración del extracto de harina de maíz23
4.5.2.1 Purificación en SPE C18.23
4.5.2.2 Purificación en SPE SAX.24
4.5.2.2.1 Procedimiento de prueba-1 de SPE SAX.25
4.5.2.2.2 Procedimiento de prueba-2. Análisis de las fracciones de SPE SAX.25
4.5.2.2.3 Procedimiento de prueba-2a Análisis de las fracciones de SPE SAX26
4.5.2.2.4 Procedimiento-2b. Porcentaje de recuperación con estándar de AF27
4.5.2.2.5 Procedimiento-2c. Porcentaje de recuperación con estándar de AF28
4.5.2.2.6 Procedimiento-2d. Balance de materia en las fracciones obtenidas por SPE SAX29
4.5.2.3 Purificación y concentración de AF por cromatografía de afinidad30
4.5.2.3.1 Acoplamiento de la FBP a Affigel 10.30
4.5.2.3.2 Preparación de columnas de afinidad31
4.5.2.3.3 Evaluación de los porcentajes de recuperación de AF por cromatografía de afinidad31
4.5.2.3.4 purificación y concentración de extractos harina de maíz por cromatografía de afinidad33
4.6 Evaluación de la exactitud del método de análisis de AF en muestras de concentración conocida.34
4.7 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método de análisis de AF en harina de maíz34
4.8 Evaluación del límite práctico de cuantificación35
4.9 Evaluación del límite de detección36

4.10	Aplicación del método cromatográfico en muestras de harina, tortillas y tostadas de maíz36
4.11	Comparación estadística de la concentración de AF en muestras de harina, tortillas y tostadas de maíz38
5.0	Resultados	
5.1	Condiciones cromatográficas en CLAR40
5.2	Repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo45
5.3	Repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cuantitativo.46
5.4	Linealidad del método de análisis cromatográfico.	.47
5.5	Metodología de extracción del AF en harina de maíz47
5.5.1	Pruebas iniciales en extractos alcalinos de harina de maíz con y sin vitaminas. . .	.47
5.5.2	Análisis de extractos purificados por SPE C1850
5.5.3	Análisis de extractos purificados por SPE SAX51
5.5.4	Porcentajes de recuperación de AF por cromatografía de afinidad61
5.5.5	Análisis de los extractos purificados por cromatografía de afinidad63
5.6	Exactitud del método con el uso de cromatografía de afinidad65
5.7	Repetibilidad y reproducibilidad del método de análisis65
5.8	Límite práctico de cuantificación y límite de detección.66
5.9	Análisis de AF en harina de maíz vitaminada tortillas y tostadas67
5.10	Comparación estadística de los resultados obtenidos en las muestras de harina de maíz vitaminada, tortillas y tostadas69
5.10.1	Análisis de varianza y comparación múltiple de Tukey en harina y tortillas de maíz69
5.10.2	Prueba de t-Student en Harina, tortillas y tostadas de maíz72
6.	Discusión de resultados76
7.	Conclusiones y recomendaciones	83
	REFERENCIAS86
	APÉNDICES	
	APÉNDICE A.89
	APÉNDICE B.92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Ensayos en condiciones de elución isocráticas para la optimización de los parámetros cromatograficos en CLAR18
II. Ensayos en condiciones de elución en gradiente para la optimización de los parámetros cromatograficos en CLAR18
III. Optimización de los parámetros cromatográficos en condiciones de elución isocráticas40
IV. Optimización de los parámetros cromatográficos en condiciones de elución en gradiente42
V. Repetibilidad en el análisis cualitativo45
VI. Reproducibilidad en el análisis cualitativo45
VII. Repetibilidad en el análisis cuantitativo46
VIII. Reproducibilidad en el análisis cuantitativo46
IX. Balance de materia en las fracciones de extractos de harina de maíz con y sin vitaminas purificadas y concentradas por SPE SAX y analizadas por CLAR59
X. Balance de materia en las fracciones de extractos de harina de maíz con y sin vitaminas purificadas y concentradas por SPE SAX y analizadas por CLAR60

XI.	Porcentajes de recuperación de un estándar de ácido fólico de 25 ng/ml en columnas de afinidad63
XII.	Repetibilidad y reproducibilidad del método para AF en harina de maíz por CLAR65
XIII.	Datos para la determinación del L.P.C66
XIV.	Concentración de ácido fólico en harina de maíz tortillas y tostadas68
XV.	Concentración de ácido fólico en harina de maíz y tortillas de diferentes formulaciones68
XVI.	Comparación múltiple de Tukey en harina de maíz de un mismo Tipo69
XVII.	Comparación múltiple de Tukey en harina de maíz de un mismo tipo y de diferentes formulaciones70
XVIII.	Comparación múltiple de Tukey en tortillas elaboradas con harina de maíz de un mismo tipo y de diferentes formulaciones71
XIX.	Comparación de medias por la prueba de t-student para harina y tortilla L-173
XX.	Comparación de medias por la prueba de t-student para harina y tortilla F-1.73

XXI.	Comparación de medias por la prueba de t-student para harina y tortilla F-274
XXII.	Comparación de medias por la prueba de t-student para harina y tortilla F-3.74
XXIII.	Comparación de medias por medio de la prueba de t-student para harina de maíz y tostadas L-275

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructuras de los folatos	2
2. Estrategia experimental16
3. Estrategia experimental de la metodología de de extracción del AF21
4. Estrategia de muestreo para la aplicación del método por CLAR en muestras reales36
5. Estrategia para el análisis estadístico38
6. Cromatograma ensayo 4 en condiciones isocráticas41
7. Cromatograma ensayo 7 en condiciones en gradiente44
8. Curva de calibración de ácido fólico47
9. Co-inyección de un extracto de harina de maíz sin vitaminas con un estándar de ácido fólico48
10. Cromatogramas de extractos de harina de maíz detección a 280 y 350 nm49
11. Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por SPE C1852
12. Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por SPE SAX54
13. Cromatogramas de las fracciones obtenidas por SPE SAX de un extracto de harina de maíz sin vitaminas55

14.	Cromatogramas de las fracciones obtenidas por SPE SAX según procedimiento-2c57
15.	Cromatogramas de reactivos de elución62
16.	Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por cromatografía de afinidad64
17.	Grafíco para determinación del L.P.C.66
18.	Curva de calibración y nivel de ruido para determinar el L.D.67
19.	Curvas de calibración para deteminar la concentración de ácido fólico en los extractos purificados por SPE C18 y SAX93
20.	Curvas de calibración para deteminar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2a y 2b94
21.	Curvas de calibración para deteminar la concentración ácido fólico en el procedimiento-2c y 2d95
22.	Curvas de calibración para deteminar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2d y por cromatografía de afinidad96
23.	Espectro de absorción de ácido fólico97
24.	Fotografías de los sistemas SPE SAX y afinidad98

NOMENCLATURA

AA	Ácido ascórbico
AF	Ácido fólico
Affigel 10	Soporte de sefarosa para cromatografía en gel
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados centígrados
C18	Octadecil Silano
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetro
conc	Concentración
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de arreglo de diódos
F	Formulación
F	Prueba F (razón de dos varianzas)
FBP	Proteína de unión a folato
g	Gramos
GRUMA	Grupo Industrial MASECA
H	Altura del pico cromatográfico
HA	Análisis de harinas
HCl	Ácido clorhídrico
HP	Hewlett Packard

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
H ₂ O	Agua
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
K´	Factor capacidad
kg	Kilogramo
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
KOH	Hidróxido de potasio
LD	Límite de detección
LPC	Límite práctico de cuantificación
mg	Miligramo
m	Promedio
M	Concentración molar
mAu	Miliunidades de absorbancia
MeOH	Metanol
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
n	Número de repeticiones
N	Concentración normal
N	Número de platos teóricos
NaCl	Cloruro de sodio

NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
NaOAc	Acetato de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
N ₂	Nitrógeno gas
p	Probabilidad
pH	Potencial de hidrógeno
PtoP	Valor de ruido del máximo pico al mínimo valor de pico
r ²	Coefficiente de correlación
s	Desviación estándar
SAX	Intercambio aniónico fuerte
SPE	Extracción en fase sólida
TFA	Ácido trifluoro acético
t _R	Tiempo de retención
μl	Microlitro
μg	Microgramo
μm	Micra, micrometro
UV	Ultravioleta
x	Media

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentaje
#	Número
±	Más menos que
<	Menor que
>	Mayor que
α	Alfa
γ	Gamma

RESUMEN

Carmen Julia Guerrero Quiroz

Fecha de Graduación: Diciembre, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE MAÍZ VITMINADA Y PRODUCTOS DERIVADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Número de páginas: 98

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Analítica

Area de Estudio: Ciencias Químicas

Propósito y Método del Estudio: El ácido fólico es una vitamina del complejo B, la cual se adiciona a la harina de maíz (0.59 mg/kg) con la finalidad de restaurar las concentraciones de AF que se pierden durante el proceso de nixtamalización. Actualmente los métodos oficiales para cuantificar esta vitamina son los microbiológicos, los cuales son muy tardados y no diferencian el AF adicionado de los folatos endógenos que para fines de control de calidad, los valores obtenidos de AF por estos métodos no representan un dato real de las concentraciones de AF que se adicionan en proceso. En el presente estudio se desarrolló y validó un método por CLAR de fase reversa para cuantificar el AF en harina de maíz, tortillas y tostadas, usando un sistema de elución en gradiente y detección en el UV a 280 nm. La extracción del ácido fólico adicionado se realizó con buffer de fosfatos a pH 8.5, seguida de una hidrólisis enzimática con una amilasa bacteriana para facilitar el paso de filtración y posterior purificación por cromatografía de afinidad. Se realizó una comparación estadística de las concentraciones obtenidas de AF en harina, tortilla y tostada con la finalidad de evaluar el porcentaje de pérdida de AF al procesar la harina de maíz para la elaboración de tortillas y tostadas.

Contribuciones y Conclusiones: El método desarrollado por CLAR empleando cromatografía de afinidad en el paso de purificación del extracto, presentó un L.D. de 20 ng/ml usando un loop de 20 μ l, un $r^2 > 0.9998$ en un intervalo de concentraciones de 0.05 μ g/ml - 1 000 μ g/ml, se obtuvo un L.P.C. de 0.16 mg/kg en la muestra. El tiempo de análisis cromatográfico fue de 12 min usando un sistema de elución en gradiente. Los porcentajes de recuperación de AF en harina de maíz fueron mayores al 89% con un CV < 5%, mientras que los porcentajes de recuperación del AF en columnas de afinidad fueron > 99%. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AF en harina y tortilla de diferente formulación pero sí en harina y tostada, esto debido al proceso de freído. El método desarrollado ofrece ventajas sobre los ya reportados, sobre todo en cuanto al tiempo de análisis y sólo es aplicable para medir el AF adicionado.

Firma del Director

Dr. Jose M. Viader Salvadó

Firma del Co-Director

Dra. Martha Guerrero Olazaran

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del ácido fólico

El nombre de ácido fólico (ácido pteroil-L-glutámico) fue usado por primera vez por el grupo de Snell en estudios de factores de crecimiento para *Lactobacillus casei* y *Streptococcus lactis*, su nombre se deriva del latín "folium" por hoja. Químicamente el ácido fólico está constituido por ácido glutámico unido covalentemente por el grupo α -amino al grupo carboxilo del ácido para-aminobenzoico y éste a su vez unido covalentemente al 2-amino-4-hidroxipteridina. Los términos folato y ácido fólico son usados para pteroilglutamato y ácido pteroilglutámico respectivamente (recomendación 2.4 IUPAC-IUB). El término genérico "folato" se refiere a la clase de compuestos heterocíclicos que tienen como base la estructura del ácido pterico conjugado con uno ó más L-glutamatos unidos a través del enlace covalente γ -carboxílico del aminoácido y además tienen actividad nutricional similar a la del ácido fólico (ver figura 1).

El ácido fólico existe en la naturaleza solamente en cantidades de trazas, la mayoría de las formas de folato se encuentran en vegetales, leguminosas, animales y fuentes microbiológicas. El ácido fólico es la forma sintética más

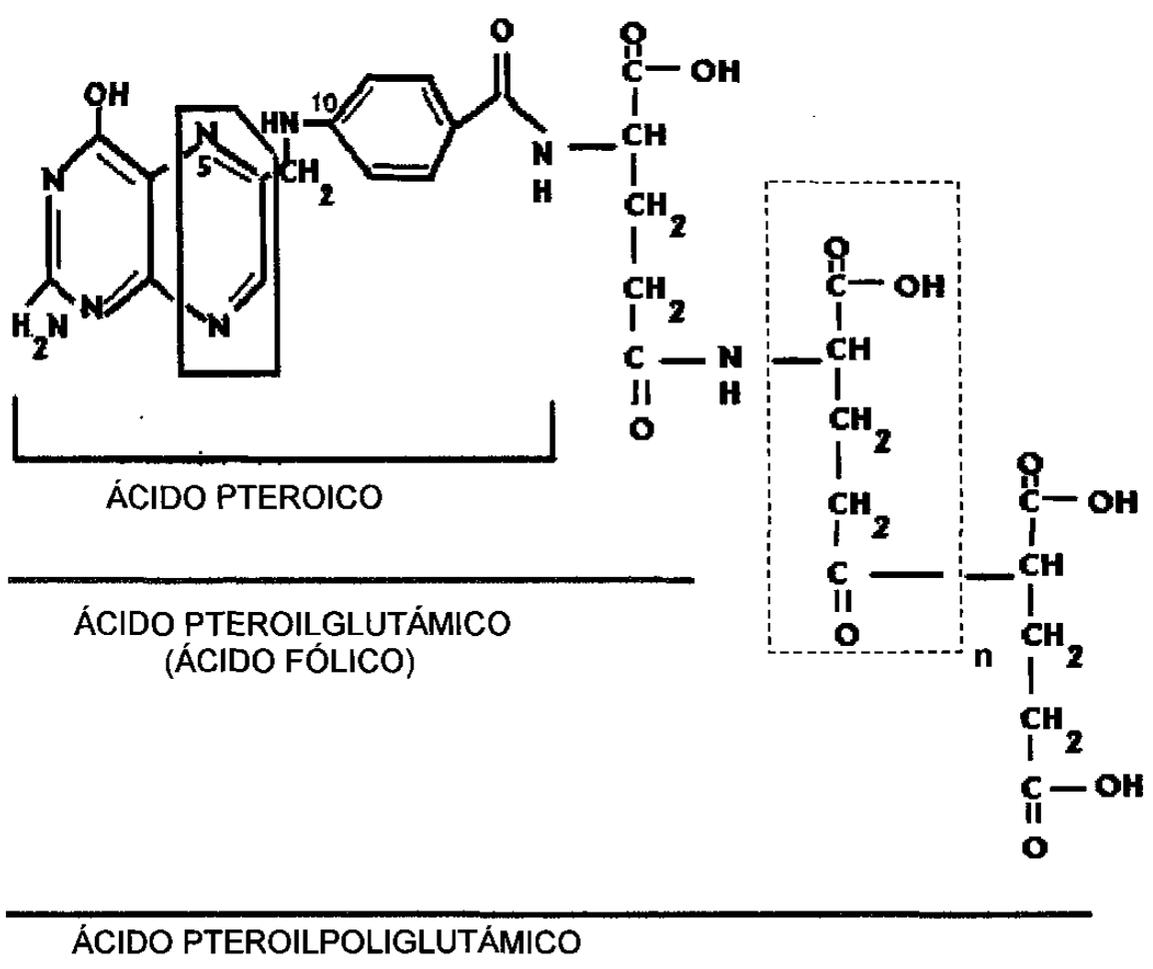


Figura 1. Estructuras de los folatos.

comúnmente usada para la fortificación de alimentos y preparaciones farmacéuticas.

El ácido fólico fue identificado como un agente eficaz en el tratamiento de la anemia megaloblástica ocurrida en 1945. Desde entonces la deficiencia del folato es reconocida como una de las más prevalentes deficiencias vitamínicas que ocurren comúnmente en todo el mundo. La deficiencia marginal produce síntomas generales como fatiga, irritabilidad y disminución del apetito.

Deficiencias severas producen anemia megaloblástica o la producción de células rojas inmaduras. La deficiencia antes y después de la pregnancy provoca nacimientos prematuros o defectos de nacimiento, la deficiencia antes del parto causa defectos del tubo neural y estudios recientes demostraron que el consumo de ácido fólico previene enfermedades coronarias.

1.2 Adición de nutrimentos en harina de maíz

La fortificación de cereales fue iniciada en EUA en enero de 1988 para contrarrestar la deficiencia vitamínica. Los productos de cereales enriquecidos son adicionados con 140 µg/100 g. El nivel de adición es estimado para incrementar la dosis entre mujeres de 19 - 50 años de edad a niveles ligeramente bajos de la Dosis Diaria Recomendada (RDI) de 400 µg. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en EUA aprobó ese nivel de adición, ya que posiblemente dosis más altas de folato, en la población en general, podría enmascarar la deficiencia de la vitamina B12. En México la deficiencia marginal de algunas vitaminas, dentro de las cuales se incluye el

ácido fólico y minerales, afecta la salud y la funcionalidad de un número elevado de mexicanos, aunque las consecuencias de dichas deficiencias no son evidentes desde el punto de vista clínico; sin embargo son importantes en la funcionalidad de los individuos y se manifiestan en un retraso en el crecimiento, una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades o en una disminución de la capacidad neurocognoscitiva. La Secretaria de Salud en colaboración con el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, iniciaron un programa para promover la adición de nutrimento a la harina de trigo y maíz, los cuales son productos que se incluyen en la canasta básica de los mexicanos y de hecho a diferencia de EUA, el maíz constituye la base de la alimentación y la principal fuente de energía de la población mexicana. El objetivo primordial de la adición de nutrimentos es restaurar las vitaminas y minerales que se pierden durante el procesamiento de los granos para la obtención de las harinas de trigo y maíz.

Además de los nutrimentos incluidos en la restauración, se consideró benéfica la adición de ácido fólico en la harina de trigo a un nivel de 2 mg/kg (NOM-147-SSA1, 1996), considerado como el más adecuado para contribuir a prevenir el riesgo de defectos del cierre del tubo neural. Este nivel de ácido fólico sería excesivo para la harina de maíz dado que se consume como tortilla, en general, en mucho mayor cantidad. Por lo tanto el nivel propuesto fue de 0.5 mg/kg. A causa de su baja concentración en la harina de maíz fue necesario implementar una metodología lo suficientemente sensible y rápida con la cual se pudiera cuantificar la cantidad de ácido fólico adicionada, ya que para fines de control de calidad del producto es importante verificar que la dosificación durante el proceso sea real y eficiente.

Existen varios métodos de análisis para la cuantificación de ácido fólico. A la fecha la mayoría de los laboratorios de servicio en México y EUA realizan el análisis tradicional microbiológico (NOM-131-SSA1, 1995 (8) - AOAC 944.12, 1997; AOAC 992.05 (9)) con los cuales aparentemente se estima sólo el contenido de ácido fólico, sin embargo se obtienen valores por arriba del nivel de adición, a pesar de que en estos métodos no se involucran tratamientos trienzimáticos (aprobados por la FDA; SOP N/AM/4/0/94). En el método de la NOM sólo se emplea una enzima (amilasa) y en el método de la AOAC se emplea sólo una conjugasa. De cualquier forma, en el caso específico de la harina de maíz y productos derivados se obtiene una sobreestimación de los niveles del ácido fólico, que para fines de control de calidad no son válidos.

Los métodos químicos y fisicoquímicos son usados para determinar principalmente el ácido fólico en preparaciones farmacéuticas y pmezclas vitamínicas, particularmente en las cuales el ácido fólico es el principal ingrediente activo y se encuentra en altas concentraciones, siempre y cuando no haya interferencias por aminas aromáticas.

Las técnicas potencialmente disponibles para medición de folatos en alimentos incluyen: Bioensayos, métodos microbiológicos, cromatografía de líquidos, enlace-ligando, radioinmunoensayos, espectrofotométricos y métodos polarográficos.

Desde finales de los 70's a la fecha se han realizado numerosos estudios para optimizar las metodologías que involucran el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), sobre todo cuando se pretende distinguir entre las diferentes formas de folatos presentes en los alimentos (Seyoum,

Selhub (5)) o entre el ácido fólico adicionado y los folatos endógenos, ya que con los métodos microbiológicos se detentan todas las formas de folatos (L.D. 2 ng/ml), consumen mucho tiempo de análisis, la precisión es muy pobre (Gregory *et al.* (3,4); Reingold and Picciano. 1982) y requiere de analistas con mucha experiencia. Los ensayos microbiológicos están basados en los requerimientos nutricionales de microorganismos como *Lactobacillus casei*, *Pediococcus cerevisiae* y *Streptococcus hiriae*. El microorganismo más usado es *Lactobacillus casei* que responde a todas las formas de folatos presentes en alimentos (AOAC 992.05). Por lo tedioso del análisis microbiológico y su falta de especificidad nace el gran interés de desarrollo y validación de métodos rápidos, como lo son los cromatográficos.

En la actualidad los estudios publicados que involucran CLAR para determinar las distintas formas de folatos en cereales involucran extracciones en soluciones buffer con agentes estabilizantes, pretratamientos enzimáticos y purificación del extracto que requieren largos periodos de incubación.

La adición de agentes estabilizantes es importante durante el procedimiento de extracción ya que los folatos son sensibles a la oxidación, calor, ácidos fuertes, presencia de metales como Cu^{2+} y a la luz. Esto hace que existan pocos métodos por CLAR disponibles que puedan ser aplicados de forma general al análisis de alimentos. En general los procedimientos de extracción que involucran tratamientos trienzimáticos, que la mayoría de los investigadores usan con el objetivo de obtener los folatos totales, consumen mucho tiempo y son laboriosos para ser usados como procedimientos de rutina.

Por estudios anteriores realizados en el Laboratorio Central de Constructora Industrial y Agropecuaria (CIASA) se tenía la certeza de que el ácido fólico se podía cuantificar perfectamente por CLAR de fase reversa, con elución isocrática y detección en el UV, pero sería necesario optimizar las condiciones de extracción del ácido fólico y concentrarlo ya que la detección por ultravioleta es suficientemente sensible solamente en productos fortificados a altos niveles de ácido fólico. Rouseff (1979) demostró que el ácido fólico contrario a los reportes publicados no fluoresce, se tiene que realizar una oxidación post-columna con hipoclorito, para ser convertido a un derivado pterin fluorescente. Solo las formas reducidas (di- y tetrahidrofolatos) pueden ser detectadas por su fluorescencia nativa cuyos límites de detección están en el intervalo 0.3 - 2.3 pmol/ml. Gregory *et al.* (4). Day *et al.* (1) en su metodología emplearon derivatización post-columna con hipoclorito de calcio, procedimiento que a la fecha no es muy usado ya que se requiere de un aditamento extra entre la salida de la columna analítica y el detector, para el paso de derivatización, lo cual hace más laborioso el método.

En el presente estudio se realizó una adaptación de otras metodologías usadas por varios investigadores para cuantificar folatos endógenos y se validó el método desarrollado.

1.3 Objetivo general

Validar un método para la cuantificación de ácido fólico en harina de maíz vitaminada y productos derivados empleando cromatografía de líquidos de alta resolución.

1.4 Objetivos específicos

1. Optimizar los parámetros cromatográficos del análisis de ácido fólico por CLAR
2. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo de ácido fólico por CLAR
3. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cuantitativo de ácido fólico por CLAR.
4. Evaluar la linealidad del método de análisis de ácido fólico por CLAR.
5. Optimizar la metodología de extracción de ácido fólico en harina de maíz.
6. Evaluar la exactitud del análisis en muestras de harina de maíz de concentración conocida de ácido fólico.
7. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad en muestras de harina de concentración conocida de ácido fólico.
8. Aplicar el método desarrollado de ácido fólico a muestras reales
9. Comparar estadísticamente los resultados obtenidos de ácido fólico en las muestras reales.

CAPITULO 2

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

2.1 Materiales

Frascos actínicos con tapón de 100 ml

Embudos de filtración de plástico de 6 - 7 mm de diámetro

Matraces de aforación actínicos de 1000 ml, 500 ml, 100 ml, 10 ml

Matraces de aforación Pyrex de 5 ml

Pipetas volumétricas Pyrex de 20 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml, 0.5 ml

Pipetas automáticas con capacidad de 50-5000 μ l y 1-10 μ l

Papel filtro Whatman No. 41 libre de cenizas

Pipetas graduadas de 10 ml

Probetas graduadas de 100 ml, 50 ml

Econocolumnas de vidrio de 10 x 0.7 cm (Biorad)

Embudos (Econofunnels) de plástico de 250 ml

Unidades de filtración Millipore Millex Hydrophilic PVDF de 0.45 μ m

Membranas Durapore (Millipore) de 0.45 μ m.

Papel aluminio

Papel encerado comercial

Jeringa de 3 ml de plástico

Aguja para inyector manual con punta plana

Vasos de precipitado de 100 ml

Sopòrte para columnas

Barras magnéticas para agitación.

2.2 Reactivos

Acido clorhídrico 1 N, para análisis

Fosfato de potasio dibásico para análisis (J.T. Baker,Xalostoc, Méx.)

Fosfato de potasio monobásico para análisis (J.T. Baker,Xalostoc, Méx.)

Fosfato de potasio dibásico grado HPLC (Fluka, St. Louis Mo, USA.)

Fosfato de potasio monobásico grado HPLC (Fluka, St. Louis Mo, USA.)

Hidróxido de sodio en lentejas para análisis

Acido fosfórico para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácido trifluoroacético para espectroscopía (Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácido ascórbico para análisis (Productos Químicos Monterrey)

Carbonato ácido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)

Acetato de sodio anhidro (J.T. Baker, Xalostoc, Méx.)

Etanolamina (Merck, Darmstadt, Alemania)

Affigel 10 (Biorad, Hercules CA. USA.)

Proteína de unión a folato FBP (USP, Sigma Aldrich Co, St.Louis Mo.,USA)

Azida de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)

Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácido Fólico (USP, Sigma Aldrich Co, St.Louis Mo., USA)

Alfa amilasa de *Bacillus subtilis* (ICN Pharmac.,Inc., Ca., USA)

Metanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania)

Agua grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania)

2.3 Equipo

Balanza analítica Sartorius

Planchas de calentamiento con agitación magnética

Estufa de convección a vacío

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Hewlett Packard SERIE 1100

Detector de arreglo de diodos DAD G1315A, Hewlett Packard

Columna Hypersil C18, 3 μm , 100 mm x 2.1 mm

Columna de guardia Hypersil C18, 3 μm , 20 mm x 2.1 mm

Unidad de filtración Millipore

Potenciómetro

CAPITULO 3

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

3.1 Preparación de la fase móvil de trabajo y soluciones para la extracción del AF en la muestra

Fase móvil A: Se pesaron 2.4400 g de fosfato de potasio dibásico y 4.9000 g de fosfato de potasio monobásico grado HPLC en un vaso de precipitado de 1000 ml, se mezclaron con agua grado HPLC hasta disolución completa, el pH se ajustó a 6.8, se transvasó cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 ml, y se aforó hasta la marca. Posteriormente, se mezcló perfectamente y filtró a través de una unidad de filtración Millipore, utilizando una membrana Durapore de 0.45 μm . La solución se transvasó a un frasco Schott de 1000 ml, el cual estaba completamente limpio.

Fase móvil B: Metanol grado HPLC.

Solución de extracción de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8.5 con ácido ascórbico 0.1%: En un vaso de precipitado se pesaron 17.4180 g de fosfato de potasio dibásico y se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Posteriormente se pesaron 10.0000 g de ácido ascórbico y se adicionaron a la solución buffer, el pH se ajustó a 8.5, la solución se transvasó a un matraz volumétrico actínico de 1000 ml, y se aforó hasta la marca con agua destilada. La solución se preparó siempre al momento de usarse.

Solución de hidróxido de sodio 4 M: En un vaso de precipitado se pesaron 56.1100 g de hidróxido de sodio, se disolvieron completamente con agua destilada transfiriéndose cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 ml, y se aforó con agua destilada. La solución se mezcló y se guardó en un recipiente de plástico Nalgene (polietileno de alta densidad) en un lugar fresco por un período no mayor a quince días.

3.2 Preparación de reactivos para el acoplamiento de FBP-Affigel 10

Solución de acetato de sodio 10 mM, pH 4.5: En un vaso de precipitado de 100 ml se pesaron 0.0820 g de acetato de sodio anhidro ($\text{CH}_3\text{COO Na}$) y se disolvieron completamente con 80 ml de agua destilada. El pH de la solución se ajustó a 4.5 con HCl 1 N, posteriormente se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. La solución se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Etanolamina 1 M, pH 8: Se pesaron 6.1000 g de Etanolamina en un vaso de precipitado de 100 ml, se adicionaron 80 ml de agua destilada y se mezcló hasta disolución completa. El pH se ajustó a 8.0 con KOH 4 M. La solución se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con agua destilada, la solución se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Solución de carbonato ácido de sodio 0.1 M, pH 6.5: En un vaso de precipitado se pesaron 0.8400 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se adicionaron 80 ml de agua destilada, la solución se agitó hasta disolución completa, posteriormente el pH de la solución se ajustó a 6.5 con HCl 1 N,

transfiriéndose cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml y aforando con agua destilada hasta la marca, la solución se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Reconstitución de la proteína de unión a folato (FBP) de leche de bovino: 4 mg de FBP se reconstituyeron en 4 ml de agua destilada (1mg/ml). Una vez en solución se agitó cuidadosamente y se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

3.3 Preparación de reactivos para la purificación y concentración por cromatografía de afinidad

Buffer de fosfato de potasio monobásico 0.1 M: En un vidrio de reloj se pesaron 6.8045 g de KH_2PO_4 y se disolvieron completamente en 400 ml de agua destilada, la solución se transvasó a un matraz volumétrico de 500 ml y se aforó con agua destilada.

Buffer de fosfato de potasio dibásico 0.1 M: En un vidrio de reloj se pesaron 8.7090 g de K_2HPO_4 y se disolvieron completamente en 400 ml de agua destilada, la solución se transvasó a un matraz volumétrico de 500 ml y se aforó con agua destilada.

Buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.0: Se mezclaron 50 ml de la solución de KH_2PO_4 con 80 ml de la solución K_2HPO_4 y el pH se ajustó a 7.0 con KOH 4 M y HCl 4 M.

Buffer de fosfatos 0.025 M, pH 7.0 conteniendo NaCl 1 M. De la solución de buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.0, se tomaron 25 ml, se diluyeron en 100 ml de agua destilada y el pH de la solución se ajustó a 7.0 con KOH 4 M y HCl 4 M.

Posteriormente se adicionaron 5.8500 g de NaCl a los 100 ml de buffer de fosfato pH 7.0.

Buffer de fosfato 0.025 M, pH 7.0: De la solución de buffer de fosfato 0.1M, pH 7.0, se tomaron 25 ml, se diluyeron en 100 ml de agua destilada y el pH de la solución se ajustó a 7.0 con KOH 4 M y HCl 4 M.

Solución de ácido trifluoroacético (TFA) 0.02 M: En un matraz volumétrico actínico de 100 ml, se colocaron 50 ml de agua grado HPLC y se adicionaron 153 μ l de ácido trifluoroacético concentrado y se aforó a la marca con agua grado HPLC.

Solución de ácido ascórbico (AA) al 10%: En un vaso de precipitado de 50 ml, se pesaron 2.500 g de ácido ascórbico, se adicionaron 20 ml de agua grado HPLC, agitando hasta disolución completa, la solución se transvasó cuantitativamente aun matraz de aforación de 25 ml y se aforó con agua grado HPLC. Posteriormente la solución se transvasó a un frasco ambar con tapa y se guardó en refrigeración hasta su uso. La solución no se almacenó, se preparó antes de usarse.

CAPITULO 4

METODOLOGÍA

Validar Método

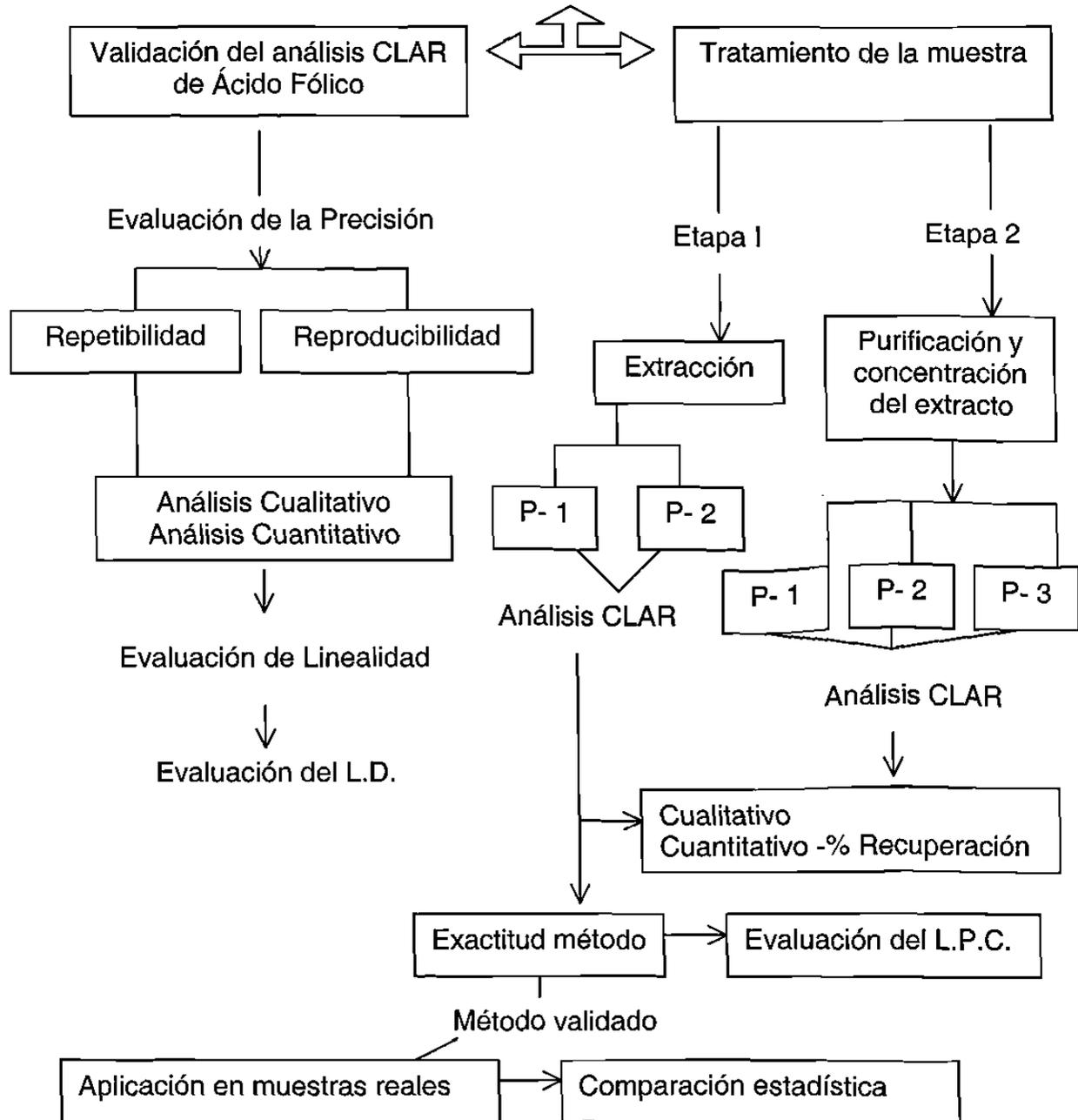


Figura 2. Estrategia experimental. P: Procedimiento; L.D: Límite de detección; L.P.C.: Límite práctico de cuantificación.

4.1 Optimización de los parámetros cromatográficos para el análisis de AF por CLAR

Para optimizar las condiciones cromatográficas, se realizaron pruebas en condiciones isocráticas (ver TABLA I) y en gradiente (ver TABLA II), en el primer caso se modificaron el flujo y la proporción de la fase móvil A y B, siendo la fase móvil A: Buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 y la fase móvil B: Metanol. Se utilizó una columna de fase reversa Hypersil de C18 de 2.1 x 100 mm, 3 μ m, la columna de guardia con las mismas características de 2.1 x 20 mm, un loop de inyección de 20 μ l, temperatura ambiente y detección en el UV a 280 nm. Los flujos a prueba fueron de 0.2 y 0.3 ml/min. Para las pruebas de elución en gradiente, se mantuvo un flujo de 0.2 ml/min y se modificó la proporción de la fase móvil B desde un 5% - 40% como se indica en la tabla II. La proporción de B se mantuvo constante de 1-2 min para regresar a las condiciones originales de un 100% de la fase móvil A. En pruebas posteriores y con la finalidad de reducir el tiempo de análisis, el flujo se aumentó al doble es decir 0.4 ml/min, manteniendo la proporción de B en un 40%. La elección de las mejores condiciones se realizó en base a la simetría, ancho del pico cromatográfico y el tiempo de análisis.

TABLA I

Ensayos en Condiciones de Elución Isocráticas para la Optimización de los Parámetros Cromatográficos en CLAR

Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil A:B
1	0.2	90:10
2	0.3	92:8
3	0.3	93:7
4	0.2	92:8
5	0.2	91:9

TABLA II

Ensayos en Condiciones de Elución en Gradiente para la Optimización de los Parámetros Cromatográficos en CLAR

Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil %B	Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil %B
1	0.2	0	2	0.2	0
		0-5			0-10
		5-10			10
		10			10-0
		10-5			10-15
		5-0			
3	0.2	0	4	0.2	0
		0-20			0-25
		20			25
		20-0			25-0
5	0.2	0	6	0.2	0
		0-28			0-40
		28			40
		28-0			40-0
7	0.4	0			
		0-40			
		40			
		40-0			

4.2 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo de AF por CLAR

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas se procedió a evaluar la precisión del método en el análisis cualitativo, evaluando los coeficientes de variación de los tiempos de retención generados a partir de la elución por triplicado de tres soluciones estándar con concentraciones de 200 ng/ml, 100 ng/ml y 50 ng/ml preparadas a partir de un stock de ácido fólico de 100 μ g/ml, el cual se preparó pesando 10 mg de un estándar de ácido fólico de 99% de pureza, mantenido en refrigeración libre de humedad, posteriormente se disolvió en 80 ml buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.5 conteniendo 1% de AA y el pH se ajustó 6.8 con H_3PO_4 concentrado (conc) y KOH 4 M. La solución se transvasó a un matraz volumétrico actínico y se aforó a 100 ml con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. A partir de este stock se tomó una alícuota de 1 ml y se transvasó a un matraz volumétrico actínico de 100 ml, aforando hasta la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. A partir de este estándar se tomó una alícuota de 2 ml y se vertió sobre un matraz volumétrico actínico de 10 ml, aforando hasta la marca con el buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, a partir de este estándar se tomó una alícuota de 5 ml y se vertió en otro matraz volumétrico actínico de 10 ml, aforando a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. De cada uno de los estándares preparados se tomó 1 ml con una jeringa de plástico de 3 ml y se adaptó una unidad de filtración de 0.45 μ m, posteriormente cada estándar se cargo en el inyector manual con un loop de 20 μ l y el análisis se realizó bajo las condiciones descritas en el ensayo 7 (TABLA II). La evaluación de la repetibilidad se realizó de los tiempos de retención

obtenidos por la elución por triplicado de cada una de las tres soluciones estándar preparadas en un sólo día. La reproducibilidad se evaluó en tres días diferentes por elución de las tres soluciones estándar, preparadas de la forma antes mencionada. Los cálculos del promedio de los datos obtenidos, la desviación estándar y el coeficiente de variación se realizaron por medio del paquete computacional Excel.

4.3 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cuantitativo de AF por CLAR

La evaluación de la repetibilidad del método en el análisis cuantitativo se realizó de la elución por triplicado de tres soluciones estándar de diferentes concentraciones en un sólo día, éstas se prepararon de igual manera que en el análisis cualitativo y se evaluaron las áreas y alturas obtenidas de cada nivel de concentración. La reproducibilidad se evaluó de la elución por triplicado de tres soluciones estándar de diferentes concentraciones preparadas en tres días diferentes a los niveles de concentración indicados en el análisis cualitativo y se evaluaron los coeficientes de variación de las áreas y alturas de cada nivel de concentración. La media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las áreas y alturas se calcularon en la hoja de cálculo de Excel.

4.4 Evaluación de la linealidad del método de análisis de AF por CLAR

De los estándares de tres niveles de concentración preparados para evaluar la precisión en el análisis cualitativo y cuantitativo, se graficó cada nivel de concentración del estándar de AF contra áreas y alturas correspondientes y se

determinó el coeficiente de correlación (r^2) de cada curva de calibración. El cálculo fue realizado por medio del HP chemstation del equipo cromatográfico.

4.5 Optimización de la metodología de extracción de AF en harina de maíz

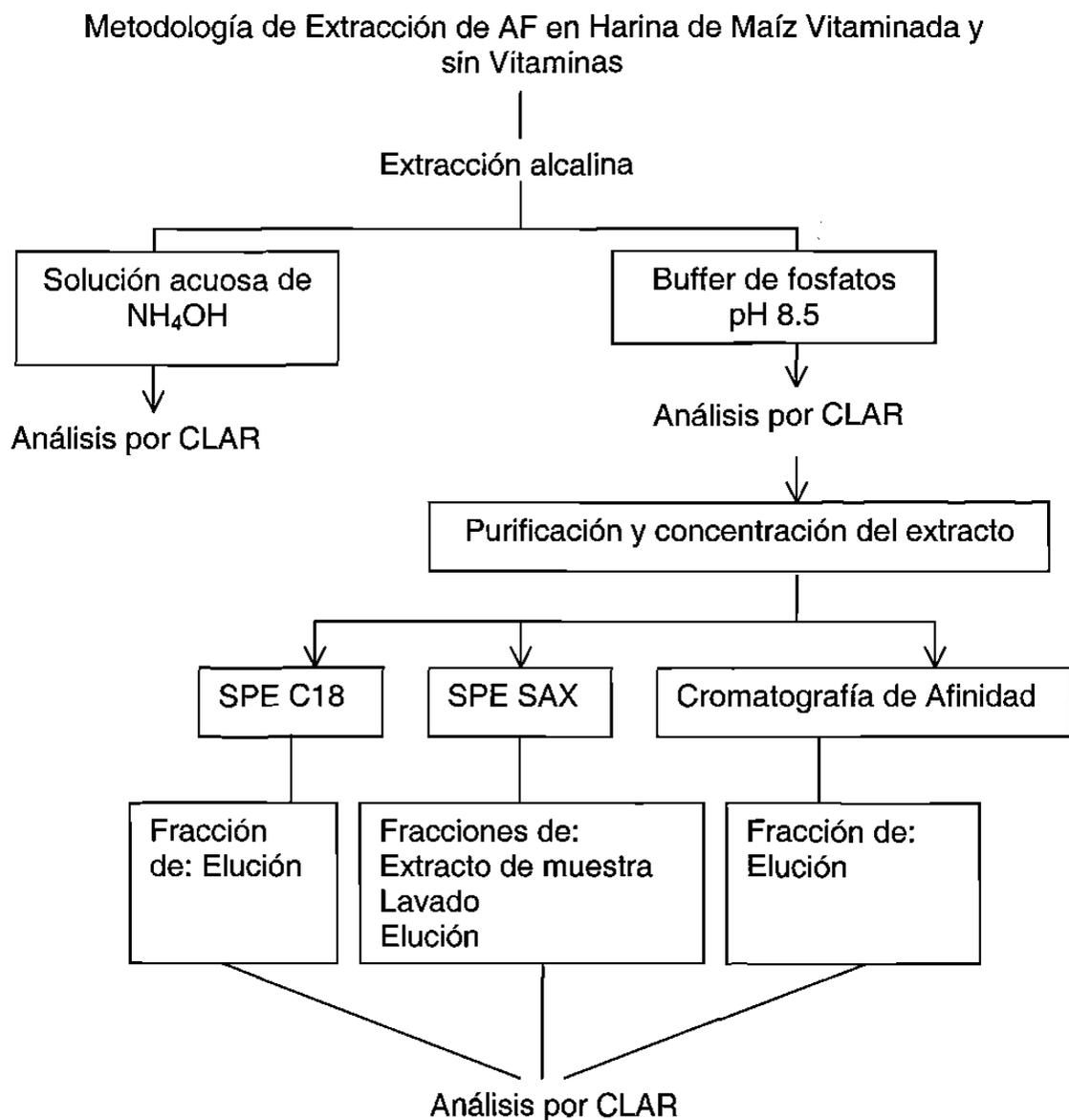


Figura 3. Estrategia experimental de la metodología de extracción del AF. SPE: Extracción en fase sólida; C18: Octadecil silano; SAX: Intercambio aniónico fuerte.

4.5.1 Pruebas iniciales para la extracción del AF en harina de maíz vitaminada y sin vitaminas.

4.5.1.1 Procedimiento de extracción en solución alcalina diluida de hidróxido de amonio

Como prueba preliminar se utilizó una modificación del procedimiento de extracción empleado en el método microbiológico turbidimétrico (6). En el método se pesaron 2.0000 ± 0.0003 g de muestra y se adicionaron 60 ml de agua destilada, 1.8 ml de NH_4OH conc y 0.6 ml de ascorbato de sodio al 2%. La muestra se homogenizó en baño de agua con agitación a 45°C durante 45 min.

El pH se ajustó a 4.5 con HCl 1 N. Posteriormente se adicionaron 5 ml de la enzima claradiastasa al 10% en agua y se incubó a 45°C durante 1 h. El pH de la solución se ajustó a 7.0 con NaOH 1 N y se filtró en papel Whatman # 41 libre de cenizas sobre un matraz volumétrico actínico 100 ml, aforando con agua destilada. El extracto obtenido se pasó por una unidad de filtración Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ y se inyectó en el equipo cromatográfico. La evaluación de la concentración del AF en el extracto se realizó por el método de estándar externo con una curva de calibración de tres niveles de concentración siendo estos: $1.00 \mu\text{g/ml}$, $0.10 \mu\text{g/ml}$ y $0.01 \mu\text{g/ml}$. Los cuales se prepararon a partir de un stock de ácido fólico de $100 \mu\text{g/ml}$. La elaboración de la curva de calibración se realizó graficando la altura de cada estándar contra el nivel de concentración correspondiente por medio del HP chemstation del cromatógrafo.

4.5.1.2 Procedimiento de extracción en solución buffer a pH alcalino.

El segundo procedimiento involucró la extracción del AF en 5.0000 ± 0.0003 g de muestra, a los cuales se adicionaron 60 ml de K_2HPO_4 0.1 M, pH 6.8, posteriormente la suspensión se colocó sobre una plancha con agitación magnética durante 30 min. El pH se ajustó a 6.9 con H_3PO_4 conc. y KOH 4 M, para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, adicionando 0.5000 ± 0.0003 g de α -amilasa bacteriana e incubando en baño de agua a 42°C durante 30 min, enseguida la temperatura se subió gradualmente a 90°C para inactivar la enzima, posteriormente el extracto se retiró del baño de incubación se enfrió con agua de la llave y posteriormente en baño de hielo durante 5 min. El pH del extracto hidrolizado se ajustó a 7.5 con KOH 4 M y H_3PO_4 conc. Posteriormente se filtró en papel plisado Whatman # 41 libre de cenizas, y el filtrado se recogió directamente sobre un matraz de aforación actínico de 100 ml, y se aforó a 100 ml con agua destilada y se mantuvo a la temperatura ambiente por no más de 3 h hasta el paso de purificación.

4.5.2 Purificación y concentración del extracto de harina de maíz

4.5.2.1 Purificación en fase sólida (SPE) de C18

Los cartuchos de SPE se adaptaron a una jeringa de plástico de 3 ml y éstas a su vez se adaptaron a un soporte para columnas para su fácil manejo. Se preparó un estándar de AF de 25 ng/ml, el cual se elaboró a partir de un stock de 100 µg/ml y las diluciones se realizaron según lo descrito en el punto 4.2,

excepto que a partir del estándar de 1.00 µg/ml de AF se tomaron 2.5 ml y se colocaron en un matraz volumétrico actínico de 100 ml aforando con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8.

Se realizaron pruebas por triplicado para determinar la proporción de los solventes de elución que proporcionaran buenos porcentajes de recuperación de AF en los cartuchos SPE C18, usando una proporción de 90:10, 80:20 y 70:30 de los solventes de elución (buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 : MeOH). Los cartuchos SPE C18 primeramente se acondicionaron con 2 ml de MeOH, 2 ml de agua, 2 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, se adicionaron 2 ml del estándar de AF, posteriormente el cartucho se lavó con 1 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 y se eluyó con la proporción de solventes a prueba, el eluato se recogió en un matraz volumétrico de 1 ml y se aforó a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, posteriormente se pasó a través de un cartucho de filtración Millipore de 0.45 µm y se *inyectó* en el sistema cromatográfico, tanto en condiciones de elución isocráticas según ensayo 4 (TABLA I) como en gradiente, ensayo 5 (TABLA II). El cálculo de las concentraciones de AF se realizó por el método de estándar externo. Los porcentajes de recuperación se calcularon según la formula 2 (APÉNDICE A). Una vez determinada la proporción de solvente de elución se aplicó la misma metodología de purificación y condiciones cromatográficas a un extracto de harina de maíz con vitaminas y sin vitaminas, siguiendo el procedimiento de extracción del AF descrito en el punto 4.5.1.2.

4.5.2.2 Purificación en fase sólida (SPE) SAX

4.5.2.2.1 Procedimiento de prueba-1 de SPE SAX. Como primera prueba se siguió el procedimiento descrito por Osseyi *et al.* (7) haciendo una modificación, en el acondicionamiento de los cartuchos, en lugar de usar hexano se usaron 3 ml MeOH como paso inicial, enseguida se adicionaron 5 ml de K_2HPO_4 0.1 M, pH 8-9 conteniendo 0.05% de AA, posteriormente se adicionaron 4 ml del extracto de harina de maíz con vitaminas diluido en 2 ml de buffer de fosfatos 20 mM, pH 8.5, enseguida el cartucho se lavó con 2 ml de K_2HPO_4 20 mM, pH 8.5 y la elución se realizó adicionando 4 ml de NaOAc 0.1 M, pH 4.5, conteniendo 5% de Na_2HPO_4 y 0.05% de AA. El eluato se recibió en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó con buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8. El eluato se purificó en una unidad de filtración de 0.45 μ m, para posteriormente ser analizado en el sistema cromatográfico bajo las condiciones establecidas en el ensayo 6 (TABLA II). El mismo procedimiento se aplicó a un extracto de harina de maíz con vitaminas.

4.5.2.2.2 Procedimiento de prueba-2. Análisis de las fracciones de SPE SAX.

Los cartuchos de SPE SAX se acondicionaron con 20 ml de H_2O grado HPLC, enseguida se adicionaron 4 ml del extracto de harina de maíz sin vitaminas diluidos en 2 ml de H_2O grado HPLC, a esta fracción obtenida después de pasar la muestra por el cartucho SPE SAX se le llamo eluato (E1) y se colectó en un tubo de ensayo para su análisis cromatográfico, posteriormente el cartucho se lavó con 6 ml de K_2HPO_4 20 mM pH 7.5, a esta fracción de lavado se le denominó eluato (E2) y se colectó en un tubo de

ensayo para su análisis cromatográfico. La elución del analito se realizó sólo con NaOAc 0.1 M, pH 4.5, a esta fracción se le llamó eluato (E3), se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, posteriormente se analizó por CLAR.

Todas las fracciones fueron analizadas bajo las condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 7 (TABLA II). La evaluación de las concentraciones obtenidas se realizó por el método de estándar externo por medio de una curva de calibración de tres niveles de concentración contra las alturas correspondientes a cada estándar elaborada por medio del software del cromatógrafo de líquidos.

4.5.2.2.3 Procedimiento de prueba-2a. Análisis de las fracciones de SPE SAX. Los cartuchos de SPE-SAX se acondicionaron con 20 ml de H₂O grado HPLC, enseguida se adicionaron 4 ml del extracto de harina de maíz sin vitaminas diluidos en 2 ml de H₂O grado HPLC, el eluato obtenido se colectó en un tubo de ensayo para su análisis cromatográfico, posteriormente el cartucho se lavó tres veces con porciones de 6 ml de K₂HPO₄ 20 mM, pH 7.5, a cada fracción de lavado obtenida se le denominó E2a, E2b y E2c, cada una de las fracciones se colectó en un tubo de ensayo para su análisis cromatográfico. La elución del analito se realizó con 4 ml de NaOAc 0.1 M, pH 4.5 denominándose E3. Esta fracción se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. Enseguida se realizó una segunda elución con 4 ml NaOAc 0.1 M, pH 4.5. Posteriormente ambos eluatos con el analito se analizaron por CLAR. Todas las fracciones fueron analizadas bajo las

condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 7 (TABLA II). La evaluación de las concentraciones obtenidas se realizó por el método de estándar externo graficando la concentración contra la altura correspondiente de cada estándar, elaborada por medio del software del cromatógrafo de líquidos. El mismo procedimiento se aplicó a un estándar de ácido fólico de 0.997 µg/ml, pero aplicando un volumen de 3 ml del estándar y siguiendo las mismas condiciones de acondicionamiento y lavado del cartucho de SPE SAX. Este procedimiento se realizó para evaluar el porcentaje de recuperación de ácido fólico siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

4.5.2.2.4 Procedimiento-2b. Porcentaje de recuperación con estándar de AF.

Los cartuchos de SPE-SAX se acondicionaron con 20 ml de H₂O grado HPLC, enseguida se adicionaron 12 ml de un estándar de ácido fólico de 0.025 µg/ml preparado a partir de un stock de AF de 100 µg/ml, del stock se tomó 1 ml con pipeta volumétrica y se colocó en un matraz volumétrico actínico de 100 ml y se aforó a 100 ml con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 para obtener un estándar de 1.0 µg/ml, a partir del cual se tomó una alícuota de 2.5 ml y se vertió sobre un frasco de 100 ml actínico y se adicionaron 80 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8.50, el pH se ajustó a 7.5 con H₃PO₄ y KOH 4 M, posteriormente se transvasó a un matraz volumétrico actínico de 100 ml y se aforó a 100 ml con agua grado HPLC. El cartucho se lavó con 18 ml de K₂HPO₄ 20 mM, pH 7.5. La elución del analito se realizó con 4.5 ml de NaOAc 0.1 M, pH 4.5, se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó a la marca con

buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, posteriormente se analizó por CLAR, bajo las condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 7 (TABLA II).

El procedimiento se realizó por triplicado para evaluar los porcentajes de recuperación del ácido fólico. La evaluación de las concentraciones obtenidas se realizó por el método de estándar externo por medio de una curva de calibración de tres niveles de concentración contra las alturas de cada estándar, elaborada por medio del software del cromatógrafo de líquidos.

4.5.2.2.5 Procedimiento-2c. Porcentaje de recuperación con estándar de AF.

Los cartuchos de SPE-SAX se acondicionaron con 18 ml de K_2HPO_4 20 mM, pH 7.5, conteniendo 0.05% de AA, enseguida se adicionaron 12 ml de un estándar de ácido fólico de 0.025 $\mu\text{g/ml}$ preparado según el procedimiento descrito en el punto 4.5.2.2.4. El cartucho se lavó con 18 ml de K_2HPO_4 20 mM, pH 7.5. La elución del ácido fólico se realizó con 4.5 ml de NaOAc 0.1 M, pH 4.5 conteniendo 0.05% de AA. Se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 posteriormente se analizó por CLAR bajo las condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 7 (TABLA II). El procedimiento se realizó por triplicado para evaluar los porcentajes de recuperación del AF. La evaluación de las concentraciones obtenidas se realizó por el método de estándar externo por medio de una curva de calibración de tres niveles de concentración elaborada por medio del software del cromatógrafo de líquidos. El mismo procedimiento se aplicó a un extracto de harina de maíz sin vitaminas obtenido según el procedimiento descrito en el punto 4.5.1.2.

4.5.2.2.6 Procedimiento-2d. Balance de materia en las fracciones obtenidas por SPE SAX. Para evaluar la cantidad de interferencia que estaba co-eluyendo con el ácido fólico en el análisis cromatográfico de cada una de las fracciones obtenidas de la SPE SAX, tanto de los extractos de la muestra así como de un estándar de AF, además de evaluar que volumen de lavado sería requerido para eliminar las interferencias. Se analizaron directamente por CLAR extractos de harina de maíz con y sin vitaminas, obtenidos según el procedimiento descrito en el punto 4.5.1.2 y un estándar de AF de 0.30 $\mu\text{g/ml}$.

Posteriormente se analizaron cada una de las fracciones obtenidas por SPE SAX de los extractos de harina de maíz con y sin vitaminas y el estándar de AF. Para obtener las fracciones se realizó el siguiente procedimiento.

Los cartuchos SPE-SAX se acondicionaron con 2 ml de MeOH, 2 ml de H₂O grado HPLC y 18 ml de K₂HPO₄ 20 mM, pH 7.5, conteniendo 0.05% de AA, se adicionaron 5 ml de un extracto de harina de maíz sin vitaminas, el eluato obtenido (F-1) se colectó un tubo graduado y se completó a un volumen de 6 ml para su análisis por CLAR. El cartucho se lavó con porciones de 6 ml de K₂HPO₄ 20 mM, pH 7.5, repitiéndose n veces el número de lavados y colectándose cada fracción de lavado en tubos graduados para completar a un volumen medido, cada fracción de lavado se analizó por CLAR. La elución del analito en el cartucho se realizó con 4.5 ml de NaOAc 0.1 M, pH 4.5. Se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml y se aforó a la marca con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, posteriormente se analizó por CLAR bajo las condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 7 (TABLA II). El procedimiento antes

descrito también se aplicó a extractos de harina de maíz con vitaminas, además de repetirse el ensayo en extractos de 12 ml harina de maíz con y sin vitaminas y un estándar de AF. El procedimiento se realizó por duplicado, en el caso del estándar se adicionaron 1 ml de AF de 0.30 $\mu\text{g/ml}$, que equivale a los 12 ml de un estándar de AF de 25 ng/ml . La evaluación de las concentraciones obtenidas se realizó por el método de estándar externo por medio de una curva de calibración de tres niveles de concentración elaborada a través del software del cromatógrafo de líquidos. Cada una de las concentraciones obtenidas se multiplicó por el volumen de cada fracción para obtener la cantidad de materia presente en dicha fracción. En el caso del extracto analizado directamente por CLAR sin pasar por los cartuchos de SPE SAX, la concentración obtenida se multiplicó por el volumen de extracto (5 ml y 12 ml) usados en el procedimiento para el análisis de las fracciones.

4.5.2.3 Purificación y concentración de AF por cromatografía de afinidad

4.5.2.3.1 Acoplamiento de la FBP a Affigel-10. Una vez reconstituida la proteína de unión a folato (FBP) (ver procedimiento en el punto 3.2), 2 ml de la solución se mezclaron con 6 ml de NaHCO_3 0.1 M, pH 6.5 frío, en un frasco actínico de 100 ml, la solución se guardó en refrigeración hasta la combinación con Affigel-10, el cual se agitó cuidadosamente y se tomó 4 ml del gel para ser transferidos a un filtro Gooch adaptado a un sistema de vacío, para eliminar el solvente en el cual estaba suspendido el gel, éste se lavó con 12 ml de NaOAc 10 mM, pH 4.5 a 4°C, sin dejar secar el gel y con la ayuda de un agitador se transfirió cuantitativamente a la solución de FBP-NaHCO_3 en un lapso no mayor

a 20 min y se agitó hasta obtener una suspensión uniforme. Inmediatamente se incubó en un baño de agua con agitación constante, el cual se mantuvo a una temperatura entre 3-4°C durante 12 h. Posteriormente se adicionaron 0.4 ml de etanolamina 1 M, pH 8 y se continuó incubando por un período de 1 h a la misma temperatura. El gel unido a la proteína se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

4.5.2.3.2 Preparación de columnas de afinidad. Una vez completado el acoplamiento, 2 ml de Affigel-FBP se distribuyeron en cuatro columnas de vidrio para cromatografía. Cada columna se lavó dos veces con 5 ml de NaHCO_3 0.1 M, pH 6.5 y otras dos veces con 5 ml de buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.0. A las columnas se les adicionó buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 conteniendo 0.2% p/v de azida de sodio y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

4.5.2.3.3 Evaluación de los porcentajes de recuperación de AF por cromatografía de afinidad. Se preparó un estándar de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de ácido fólico a partir de un stock de AF de 100 $\mu\text{g/ml}$, del stock se tomó 1 ml con pipeta volumétrica, se colocó en un matraz volumétrico actínico de 100 ml y se aforó con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. Una de las columnas preparadas se equilibró con 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, se adicionaron 1 ml del estándar de AF, la columna se lavó con 5 ml de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 1 M, enseguida se adicionaron 5 ml de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0, se eluyó con 4.6 ml de una solución de TFA/ditiotreitol 20 mM y el eluato se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml que contenía 30 μl de KOH 4 M y 25 μl de AA al 10%, se aforó 5 ml con buffer de fosfatos 50 mM, pH

6.8. La solución obtenida se filtró en una unidad de filtración de 0.45 μm y posteriormente el filtrado obtenido se inyectó en el sistema cromatográfico, se analizó un blanco de reactivos de elución, un blanco de TFA y ditiotreitól por separado, bajo las condiciones descritas en el ensayo 6 (ver TABLA II).

Posteriormente se evaluaron los porcentajes de recuperación del ácido fólico en las columnas de afinidad. Se preparó un estándar de ácido fólico de 25 ng/ml a partir de un stock de AF de 100 $\mu\text{g/ml}$, del stock se tomó 1 ml con pipeta volumétrica y se colocó en un matraz volumétrico actínico de 100 ml y se aforó a 100 ml con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8 para obtener un estándar de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, a partir del cual se tomó una alícuota de 2.5 ml y se vertió sobre un frasco de 100 ml actínico y se adicionaron 80 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8.5, el pH se ajustó a 7.5 con H_3PO_4 y KOH 4 M. Posteriormente, se transvasó a un matraz volumétrico actínico de 100 ml y se aforó a 100 ml con agua grado HPLC. Las columnas se atemperaron y se equilibraron con 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 sin usar ningún sistema de bombeo, se adicionaron 20 ml del estándar de AF, las columnas se lavaron con 5 ml de buffer de fosfatos 0.25 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 1 M, enseguida se adicionaron 5 ml de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0, se eluyó con 4.6 ml de TFA 20 mM, el eluato se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml que contenía 30 μl de KOH 4 M y 25 μl de AA al 10% y se aforó con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. Las fracciones obtenidas en cada una de las columnas se filtraron en una unidad de filtración de 0.45 μm y posteriormente se inyectaron en el sistema cromatográfico. El procedimiento se realizó por triplicado para cada columna. La evaluación de la concentración obtenida se realizó por el método de estándar externo por medio

de una curva de calibración de tres niveles de concentración de 0.20 $\mu\text{g/ml}$, 0.10 $\mu\text{g/ml}$ y 0.05 $\mu\text{g/ml}$ contra alturas elaborada por medio del software del cromatógrafo de líquidos.

4.5.2.3.4 Purificación y concentración de extractos de harina de maíz por cromatografía de afinidad. La purificación y concentración de los extractos obtenidos según el procedimiento en buffer de fosfatos a pH alcalino, se llevó a cabo a temperatura ambiente en una muestra de harina de maíz vitamínada y sin vitaminas.

Las columnas de afinidad se equilibraron con 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0. Se adicionaron 20 ml del extracto de harina de maíz pH 7.5, la columna se lavó con 5 ml de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 1 M, enseguida se adicionaron 5 ml de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0, se eluyó con TFA 20 mM, el eluato se colectó en un matraz volumétrico de 5 ml que contenía 30 μl de KOH 4 M y 25 μl de AA al 10% y se aforó con buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8. La fracción obtenida se filtró en una unidad de filtración de 0.45 μm y posteriormente se inyectó en el sistema cromatográfico. La evaluación de la concentración obtenida se realizó por estándar externo por medio de una curva de calibración de tres niveles de concentración de 0.20 $\mu\text{g/ml}$, 0.10 $\mu\text{g/ml}$ y 0.05 $\mu\text{g/ml}$ elaborada a través del software del cromatógrafo de líquidos.

4.6 Evaluación de la exactitud del método de análisis de AF en muestras de concentración conocida

Para evaluar la exactitud del método se prepararon cinco muestras de harina de maíz sin vitaminas a las cuales se les adicionó una cantidad conocida de estándar de ácido fólico. La evaluación se realizó en un día y en cinco días diferentes. Se pesaron 5.0000 ± 0.0003 g de harina de maíz sin vitaminas por quintuplicado, a cada muestra se le adicionaron 2.5 ml de un estándar de AF de 25 ng/ml (preparado según el procedimiento descrito en el punto 4.5.2.2.4) y se siguió el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos pH 8.5 y el procedimiento de purificación del extracto por cromatografía de afinidad. La concentración de AF en cada extracto se obtuvo por el método de estándar externo a partir de una curva de calibración de 0.20 $\mu\text{g/ml}$, 0.10 $\mu\text{g/ml}$ y 0.05 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de AF en la muestra se calculó según la formula 1 (APÉNDICE A). Los porcentajes de recuperación se calcularon según formula 2 (APÉNDICE A).

4.7 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método de análisis de AF en harina de maíz

La repetibilidad y reproducibilidad se evaluó de las cinco muestras de concentración conocida preparadas en un día y en días diferentes según el procedimiento 4.5.1.2, y que se emplearon para evaluar la exactitud y a las que se les adicionó un estándar de concentración conocida de ácido fólico. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las concentraciones obtenidas, usando el paquete computacional Excel.

4.8 Evaluación del límite práctico de cuantificación

Para evaluar el Límite práctico de cuantificación (L.P.C.) se prepararon muestras a tres diferentes concentraciones de AF, 0.500 mg/kg, 0.250 mg/kg, 0.125 mg/kg y se analizaron por triplicado cada una de las muestras de concentración conocida. Todas las muestras se prepararon según el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos pH 8.5 y los extractos se purificaron por cromatografía de afinidad. Para preparar las muestras de 0.500 mg/kg, se adicionaron 2.5 ml de un estándar de AF de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a 5.0000 \pm 0.0003 g de harina de maíz sin vitaminas. Para preparar las muestras de 0.250 mg/kg, se adicionaron 1.250 ml de un estándar de AF de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a 5.0000 \pm 0.0003 g de harina de maíz sin vitaminas y para preparar las muestras de concentración de 0.125 mg/kg, se adicionaron 625 μl de un estándar de AF de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a 5.0000 \pm 0.0003 g de harina de maíz sin vitaminas y posteriormente se siguieron los procedimientos antes mencionados para la extracción y purificación de los extractos obtenidos.

Una vez obtenidas las concentraciones, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se realizó un gráfico de concentración de AF en mg/kg contra el coeficiente de variación. Se determinó la mínima concentración que puede ser cuantificable a un coeficiente de variación del 5% obtenido por la ecuación de la recta que pasa por dos puntos (ver ecuación 1 APENDICE A).

4.9 Evaluación del límite de detección

El límite de detección (L.D) se determinó evaluando el ruido del sistema analizando sólo la fase móvil, el dato se obtuvo directamente del software de cromatógrafo de líquidos, considerando el valor de ruido desde el máximo pico al mínimo pico (PtoP) obtenido en miliunidades de absorbancia (mAu), multiplicado por 2 y extrapolando el valor obtenido en una curva de calibración de cuatro niveles de concentración de 170.00 ng/ml, 84.70 ng/ml, 43.15 ng/ml, 7.54 ng/ml contra la altura obtenida de cada nivel.

4.10 Aplicación del método cromatográfico en muestras de harina, tortillas y tostadas de maíz

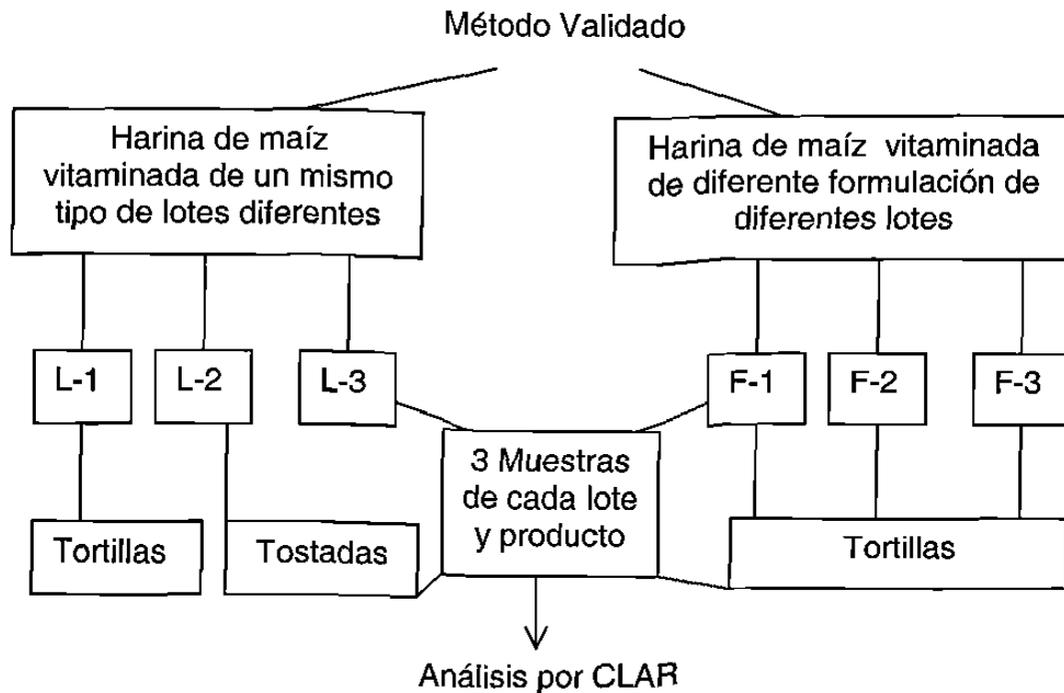


Figura 4. Estrategia de muestreo para la aplicación del método por CLAR en muestras reales. L: Lote; F: Formulación.

Se realizó un muestreo de tres lotes diferentes de harina de maíz vitaminada de proceso de un mismo tipo, identificadas como; L-1, L-2 y L-3 y de tres lotes de harina de maíz de diferente formulación identificados como; F-1, F-2 y F-3. Cada lote de harina de maíz se analizó por triplicado empleando el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos a pH alcalino y usando cromatografía de afinidad en el paso de purificación (descritos en los procedimientos 4.5.1.2 y 4.5.2.3.4). La concentración del AF se evaluó por el método de estándar externo a partir de una curva de calibración de tres niveles de concentración. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada lote de harina de maíz.

Del lote de harina de un mismo tipo identificado como L-1 y de cada lote de harina de diferente formulación identificados como F-1, F-2 y F-3, se elaboraron tortillas en una máquina Tortec bajo condiciones normales de operación a 400°C y tiempo de cocción de 45 s. Cada tipo de tortilla se analizó por triplicado. Para determinar la concentración de AF en tortillas de maíz se usó el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos a pH alcalino empleando cromatografía de afinidad en el paso de purificación (descritos en los procedimientos 4.5.1.2 y 4.5.2.3.4), pero en lugar de pesar 5.0000 ± 0.0003 g de muestra se pesaron 10.0000 ± 0.0003 g de muestra. La concentración de AF se obtuvo por el método de estándar externo por medio de una curva de calibración. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por medio del paquete computacional Excel.

Del lote de harina de maíz identificado como L-2 se elaboraron tostadas siguiendo las condiciones normales de operación a nivel piloto, deshidratación de la tortilla a 250°C durante 45 s por ambos lados de la tortilla, freído a 180°C durante 32 s. La concentración de AF se determinó en muestras de tostadas desengrasadas empleando el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos a pH alcalino y usando cromatografía de afinidad en el paso de purificación (descritos en los procedimientos 4.5.1.2 y 4.5.2.3.4). En cada uno de los lotes de harina de maíz y tortilla se determinó el porcentaje de humedad para expresar los resultados en base seca, la determinación del porcentaje de humedad se realizó según el método interno GRUMA HA, en estufa Brabender.

4.11 Comparación estadística de la concentración de AF en las muestras de harina, tortillas y tostadas de maíz

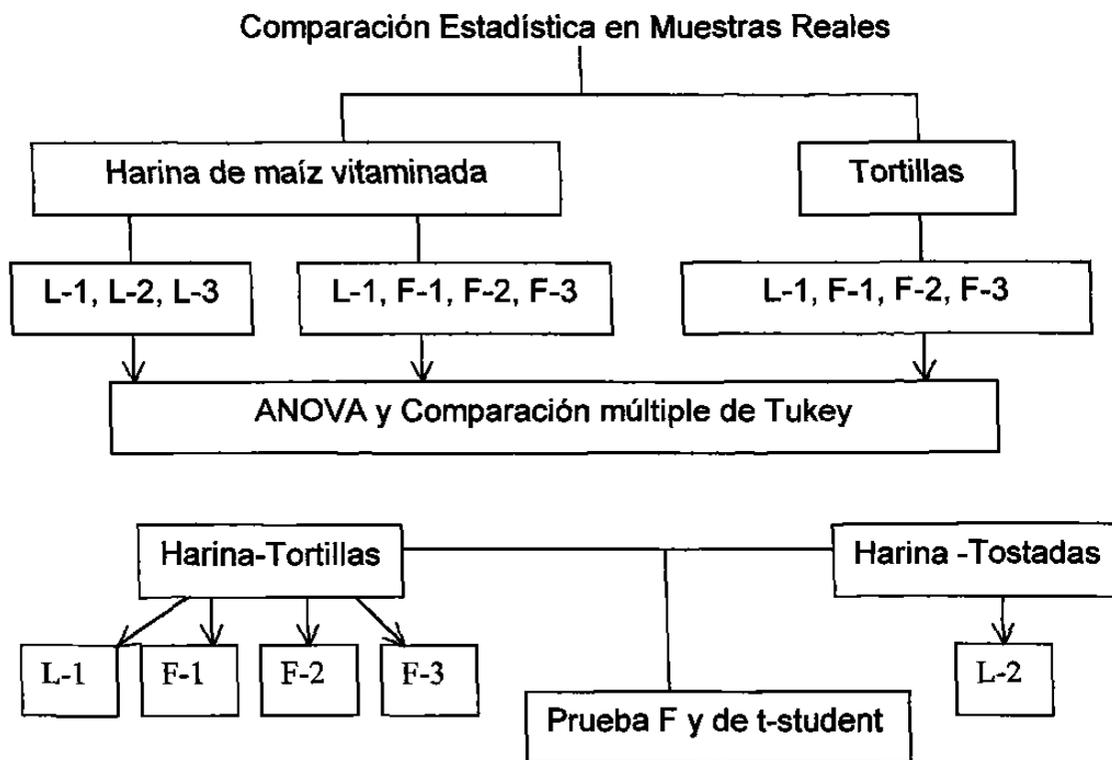


Figura 5. Estrategia para el análisis estadístico. L: Lote; F: Formulación.

La evaluación estadística de los resultados obtenidos de la concentración de AF se realizó con el paquete estadístico SPSS for windows 8.0 (SPSS Inc.), por medio del cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de Tukey, para evaluar las diferencias significativas entre las concentraciones de AF en las harinas del mismo tipo y las concentraciones de AF en las harinas de diferente formulación así como sus respectivas tortillas.

Para comparar la concentración de AF en la harina, las tortillas y las tostadas de maíz de sus respectivos lotes, se realizó una prueba F para evaluar la igualdad de varianzas y posteriormente una prueba t-student de igualdad de medias asumiendo varianzas iguales o diferentes según lo obtenido en la prueba F.

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1 Condiciones cromatográficas en CLAR

Las mejores condiciones de elución isocráticas se obtuvieron a un flujo de 0.2 ml/min, con una proporción de fase móvil A y B de 92:8. Bajo estas condiciones se obtuvo un pico a un tiempo de retención de 5.07 min, una H de 26.6 mAu, con un valor de K' y N de 2.59 y 3 993 respectivamente (ver TABLA III y Fig. 6).

TABLA III

Optimización de los Parámetros Cromatográficos en Condiciones de Elución Isocráticas

Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil	t _R min	H mAu	K'	N
1	0.2	90:10	3.86	33.2	1.73	3 438
2	0.3	92:8	3.28	17.9	2.48	2 387
3	0.3	93:7	3.33	24.4	2.53	3 129
4	0.2	92:8	5.07	26.6	2.59	3 993
5	0.2	91:9	5.34	20.0	2.78	3 624

t_R : tiempo de retención, H: altura del pico cromatográfico, mAu: miliunidades de absorbancia, K': Factor de capacidad, N: número de platos teóricos.

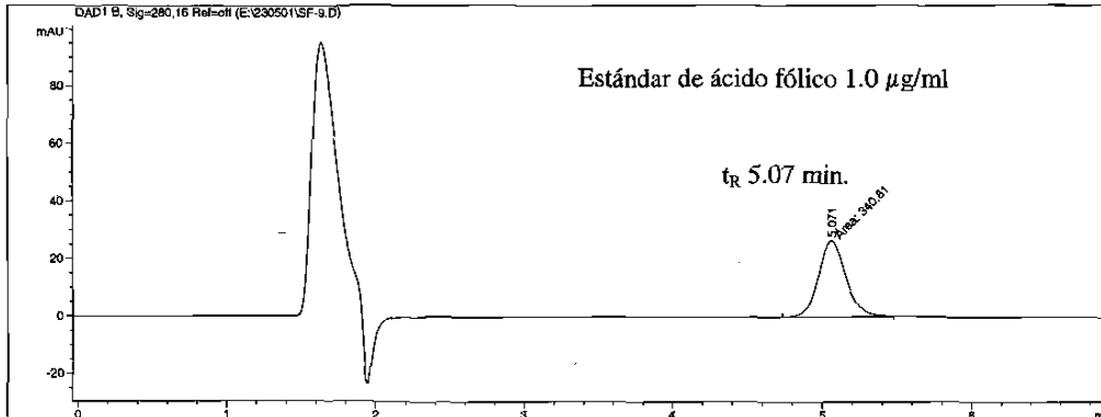


Figura 6. Cromatograma ensayo 4 en condiciones Isocráticas. Fase móvil: Buffer fosfatos 50mM, pH 6.8:MeOH (92:8); Flujo: 0.2 ml/min; Columna: Hypersil C18 2.1X100 mm, 3 µm.

Las condiciones que se consideraron como óptimas en los ensayos de elución en gradiente, se obtuvieron al incrementar la proporción de B hasta un 40%, y aumentando el flujo a 0.4 ml/min, para lograr un tiempo de análisis cromatográfico de 10 min y un tiempo de 12 min entre inyecciones consecutivas. El gradiente empleado fue de 0% B durante 1 min, 0-40% B en 3.5 min, 40% B por 1 min, 40-0% B en 4.5 min, con el cual se obtuvo un pico simétrico y estrecho a un tiempo de retención de 5.22 min, con una H de 5.5 mAu, una K' de 6.40 y un valor de N de 39 114. La elección de estas condiciones se hizo tomando como base el tiempo de análisis, el cual se logró reducir a la mitad del tiempo que el resto de las condiciones a prueba (ver TABLA IV y Fig. 7) y considerando que aún bajo esas condiciones se obtuvo un número de platos teóricos de 39 114. Antes de elegir los parámetros mencionados como óptimos algunas pruebas se realizaron según el ensayo 5 (TABLA II).

Se descartó trabajar en condiciones de elución isocráticas, puesto que las condiciones de elución en gradiente proporcionaron picos más estrechos y con un mayor número de platos teóricos. Por lo cual todos los análisis por CLAR posteriores se realizaron bajo condiciones en gradiente.

TABLA IV

Optimización de los Parámetros Cromatográficos en Condiciones de Elución en Gradiente

Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil		t_R min	H mAu	K'	N
		% B	min				
1	0.2	0	0-2	13.32	353	8.43	45 687
		0-5	2-4				
		5-10	4-8				
		10	8-10				
		10-5	10-12				
		5-0	12-15				
2	0.2	0	0-2	12.72	35.5	8.0	51 671
		0-10	2-7				
		10	7-10				
		10-0	10-15				
3	0.2	0	0-2	11.01	55.0	6.79	70 845
		0-20	2-7				
		20	7-9				
		20-0	9-14				

t_R : tiempo de retención, H: altura del pico cromatográfico, mAu: miliunidades de absorbancia, K': Factor de capacidad, N: número de platos teóricos.

TABLA IV (Continua)

Ensayo	Flujo ml/min	Fase móvil		t _R min	H mAu	K'	N
		min	% B				
4	0.2	0	0-2	11.36	49.9	7.04	57 009
		0-25	2-9				
		25	9-11				
		25-0	11-16				
5	0.2	0	0-2	10.34	53.2	6.32	57 644
		0-28	2-9				
		28	9-11				
		28-0	11-16				
6	0.2	0	0-2	9.92	45.88	-	45 615
		0-40	2-9				
		40	9-11				
		40-0	11-16				
7	0.4	0	0-1	5.22	5.5	6.40	39 114
		0-40	1-4.5				
		40	4.5-5.5				
		40-0	5.5-10				

t_R : tiempo de retención, H: altura del pico cromatográfico, mAu: miliunidades de absorbancia, K': Factor de capacidad, N: número de platos teóricos.

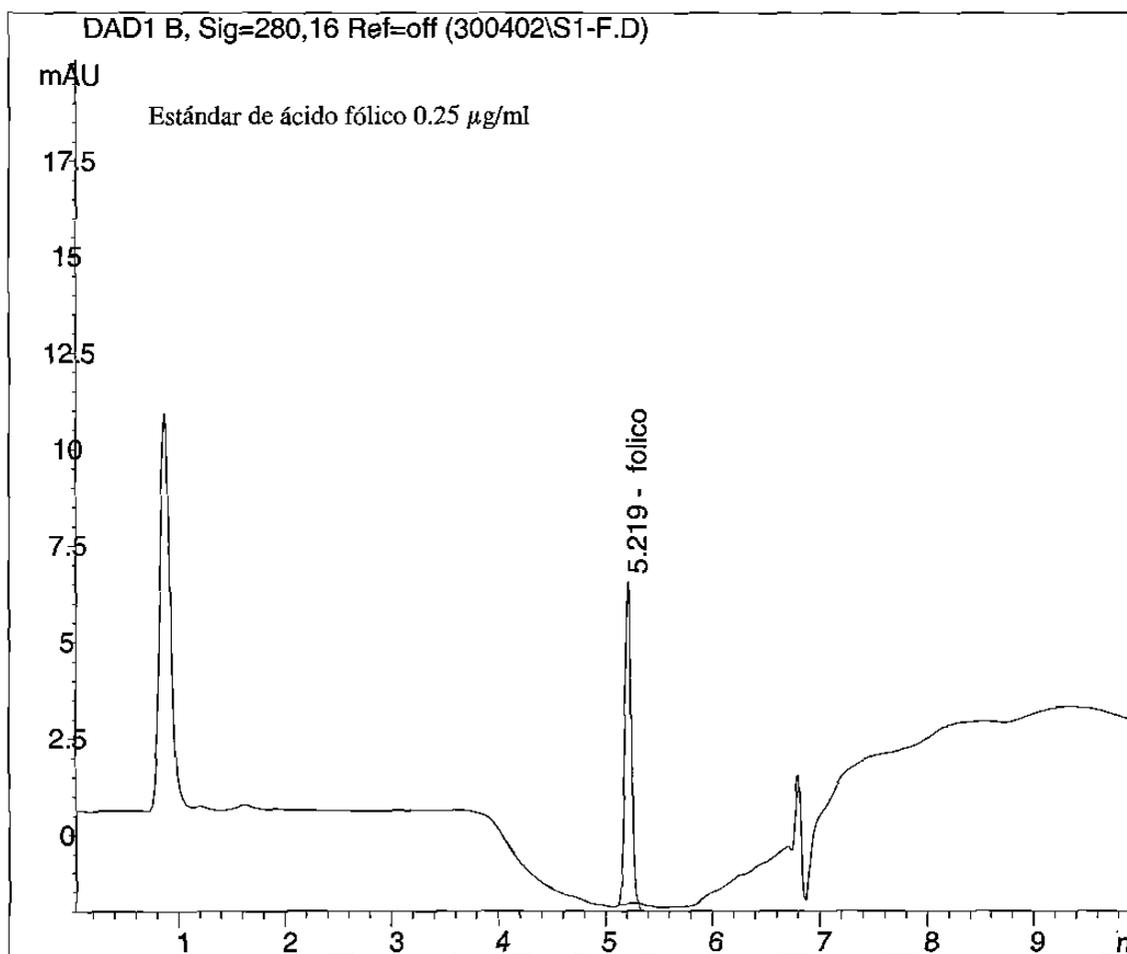


Figura 7. Cromatograma ensayo 7 condiciones en gradiente. Fase móvil A: Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; Fase móvil B: MeOH; Flujo: 0.4 ml/min; Columna: Hypersil C18 2.1x100 mm, 3 μm .

5.2 Repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo.

La evaluación de repetibilidad y la reproducibilidad se realizó empleando las condiciones de elución en gradiente descritas en el ensayo 7 (TABLAIV) consideradas como óptimas ya que se obtuvo un número de platos teóricos y un tiempo de análisis aceptable. Al evaluar los tiempos de retención de los estándares de AF, se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1%, tanto en las pruebas para evaluar la repetibilidad así como en las de reproducibilidad. Obteniendo una mayor variabilidad en días diferentes (ver TABLAS V, VI).

TABLA V

Repetibilidad en el Análisis
Cualitativo

Ácido fólico $\mu\text{g/ml}$	t_R	C.V.
0.05	5.227 ± 0.001	0.02
0.10	5.224 ± 0.009	0.18
0.20	5.225 ± 0.004	0.07

t_R : tiempo de retención, C.V: coeficiente de variación. Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3)

TABLA VI

Reproducibilidad en el Análisis
Cualitativo

Ácido fólico $\mu\text{g/ml}$	t_R	C.V.
0.05	5.210 ± 0.04	0.84
0.10	5.210 ± 0.04	0.80
0.20	5.210 ± 0.04	0.80

t_R : tiempo de retención, C.V: coeficiente de variación. Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3)

5.3 Repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cuantitativo.

Al evaluar la repetibilidad en el análisis cuantitativo se obtuvo una mayor variación en alturas que en áreas obteniendo coeficientes de variación desde un 2.3 a 7.5, siendo los coeficientes de variación mayores para las concentraciones más bajas. Sin embargo al evaluar la reproducibilidad en las áreas se observa el efecto opuesto para el estándar de más baja concentración (ver TABLA VII).

TABLA VII

Repetibilidad en el Análisis Cuantitativo

Ácido fólico $\mu\text{g/ml}$	AREAS	C.V.	ALTURAS	C.V.
0.05	8.53 ± 0.29	3.4	2.03 ± 0.15	7.5
0.10	20.37 ± 0.46	2.3	4.70 ± 0.17	3.7
0.20	41 ± 1.17	2.8	9.47 ± 0.29	3.1

t_R : tiempo de retención, C.V.: Coeficiente de variación. Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3)

TABLA VIII

Reproducibilidad en el Análisis Cuantitativo

Ácido fólico $\mu\text{g/ml}$	AREAS	C.V.	ALTURAS	C.V.
0.05	8.73 ± 0.15	1.7	2.08 ± 0.06	2.9
0.10	17.56 ± 0.36	2.0	4.07 ± 0.06	1.5
0.20	35.48 ± 0.70	2.0	8.20 ± 0.12	1.5

t_R : tiempo de retención, C.V.: Coeficiente de variación. Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=4)

5.4 Linealidad del método de análisis cromatográfico

Se obtuvo una respuesta lineal con un coeficiente de correlación >0.9998 en un intervalo de concentraciones de $0.05 - 0.20 \mu\text{g/ml}$, incluso la linealidad se mantiene hasta $1.0 \mu\text{g/ml}$ (ver figura 8).

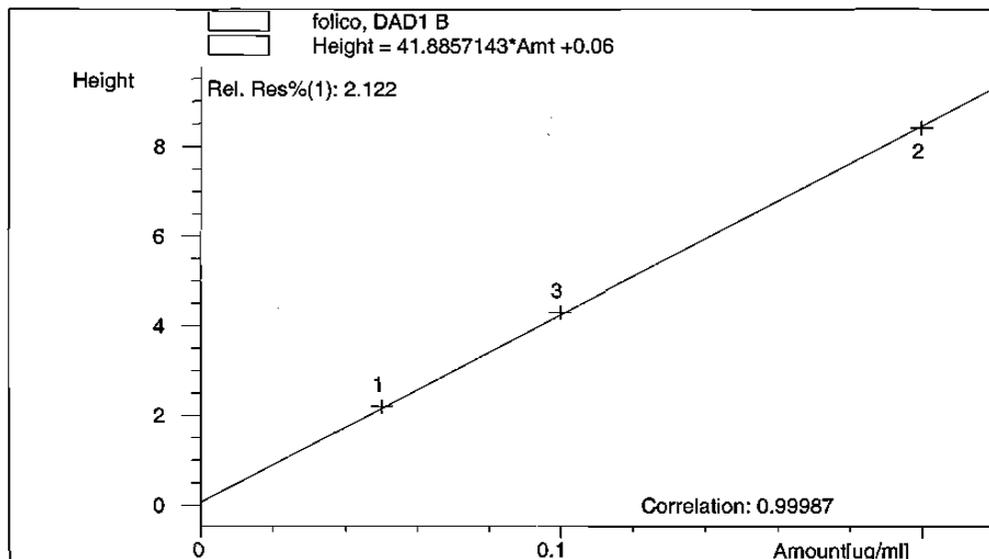


Figura 8. Curva de calibración de ácido fólico. Niveles de conc. de $0.20 \mu\text{g/ml}$, $0.10 \mu\text{g/ml}$ y $0.05 \mu\text{g/ml}$. Ecuación de la recta $y = 41.88x + (0.06)$

5.5 Metodología de extracción del AF en harina de maíz

5.5.1 Pruebas iniciales en extractos alcalinos de harina de maíz con y sin vitaminas.

En las pruebas iniciales que se realizaron siguiendo el procedimiento de extracción en una solución acuosa de hidróxido de amonio (descrito en el punto 4.5.1.1) y al realizar el análisis por CLAR, el estándar de AF eluyó a un tiempo de retención de 2.152 min y en el cromatograma del extracto de harina de maíz

sin vitaminas, se observó un pico al mismo tiempo de retención que el estándar de AF y al cuantificarlo a 280 nm dio una concentración de 31.20 mg/kg, puesto que el ácido fólico también absorbe a 350 nm, los extractos de harina de maíz sin vitaminas se cuantificaron a esa longitud de onda y el pico del AF no se detectó. Mientras que en el extracto de harina de maíz con vitaminas se obtuvo una concentración de 36.75 mg/kg realizando la cuantificación a 280 nm y a 350 nm se obtuvo una concentración de 2.48 mg/kg. Las concentraciones obtenidas fueron muy altas ya que la harina de maíz se adicionó con 0.50 mg/kg de AF en la muestra. Los resultados indicaron que algún analito propio de la matriz de la harina de maíz considerado como interferencia y con comportamiento químico similar al del AF estaba co-eluyendo junto con el ácido fólico (ver Figura 10).

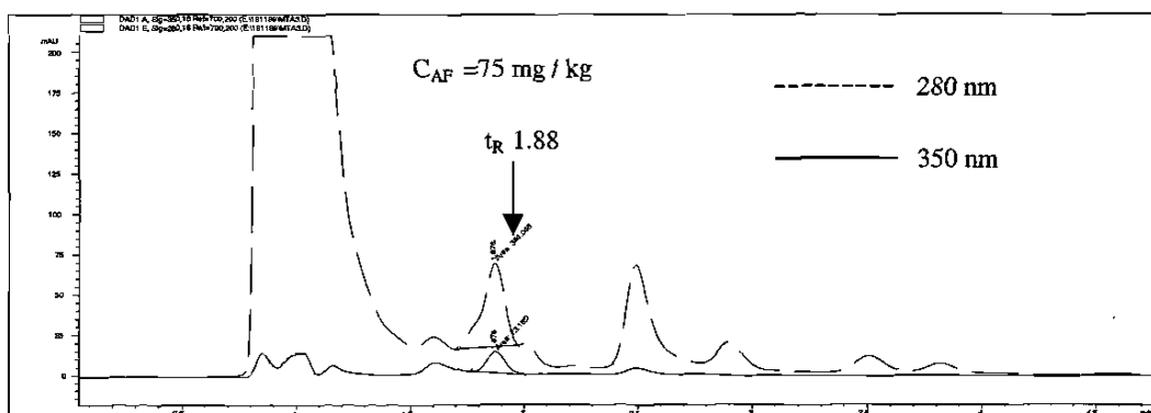


Figura 9. Co-inyección de un extracto de harina de maíz sin vitaminas con un estándar de ácido fólico. Estándar de AF de 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Fase móvil: Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.0 : MeOH (90:10); Flujo: 0.3 ml/min; Columna: Hypersil C18

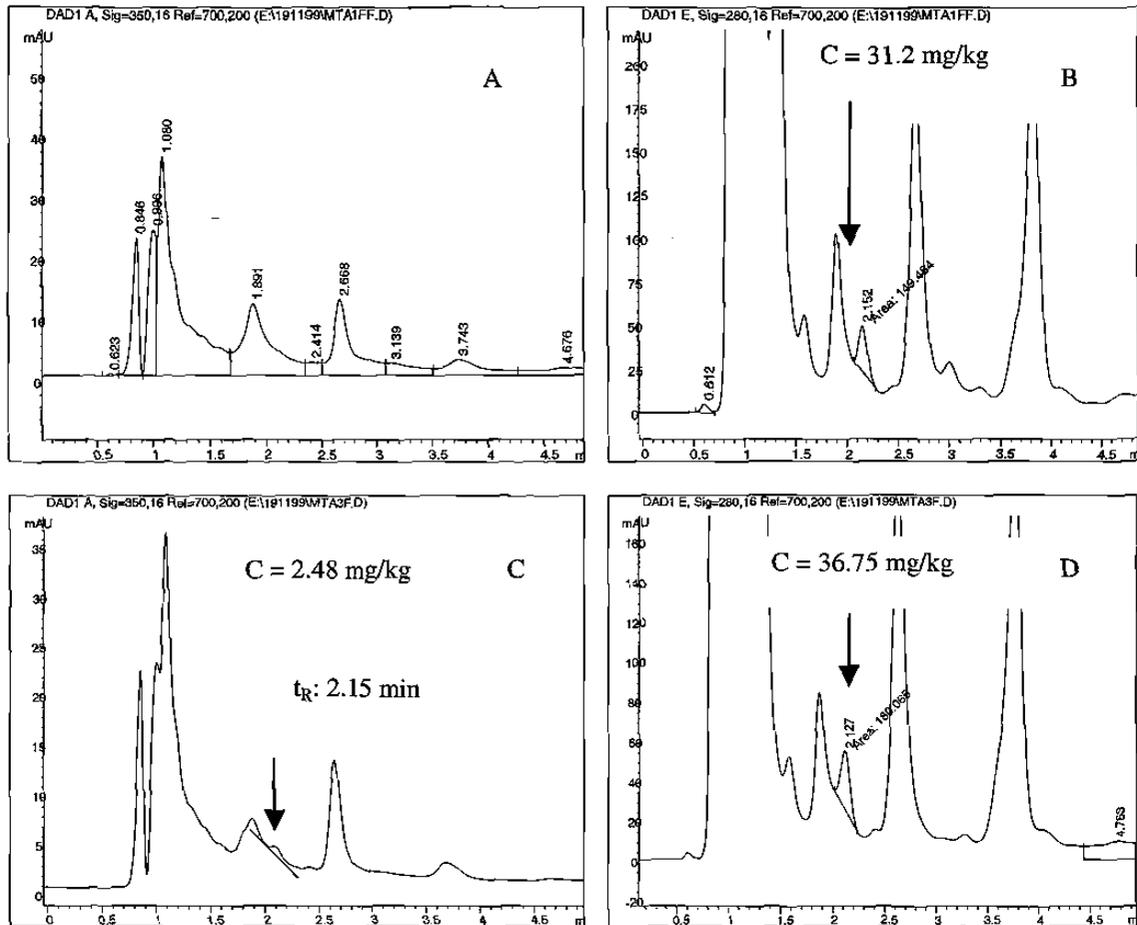


Figura 10. Cromatogramas de extractos de harina de maíz, detección a 280 y 350 nm. Cromatograma de un extracto de harina de maíz sin vitaminas. Detección a 350 nm (A); Detección a 280 nm (B). Cromatograma de un extracto de harina de maíz con vitaminas. Detección a 350 nm (C); Detección a 280 nm (D) Fase móvil: Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.0 : MeOH (90:10). Flujo: 0.3 ml/min. Columna: Hypersil C18 2.1 x 100 mm, 3 μ m. C; Concentración.

En la figura 9 puede observarse la distorsión del pico cromatográfico por el efecto de la co-inyección de un extracto de harina de maíz sin vitaminas con un estándar de AF que al cuantificar dio una concentración de 75 mg/kg. Esta prueba se realizó para verificar que las interferencias del extracto de harina de

maíz eluyen al mismo tiempo de retención que el AF. También se observó como el tiempo de retención del AF cambió de 2.152 min a 1.87 min muy cerca del tiempo muerto. El cambio en el tiempo de retención se atribuyó a la temperatura ambiente del laboratorio la cual estaba por arriba de los 30°C.

En los extractos de harina de maíz obtenidos empleando el procedimiento en solución alcalina de hidróxido de amonio y que se cuantificaron a 350 nm, la concentración obtenida de ácido fólico en extractos de harina de maíz vitaminada también fue mayor que la concentración de AF que se adiciona en proceso (0.5 mg/kg). Por lo tanto se descartó usar la detección en el UV a 350 nm y todas las pruebas posteriores se realizaron a 280 nm (longitud de onda de absorción máxima del AF).

EL procedimiento de extracción del AF en solución acuosa de hidróxido de amonio se descartó ya que el paso de filtración resultó muy tardado, es decir la enzima claradiastasa usada en ese procedimiento no resultó adecuada para hidrolizar el almidón a la temperatura y pH empleados. Por tal motivo las pruebas posteriores de extracción del AF a partir de la muestra, se realizaron empleando un buffer de fosfatos a pH alcalino y usando una enzima α -amilasa para facilitar el paso de filtración del extracto.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas iniciales se consideró benéfico usar algún sistema de purificación para eliminar las interferencias que co-eluyen con el ácido fólico

5.5.2 Análisis de extractos purificados por SPE C18

Al evaluar los porcentajes de recuperación del ácido fólico por purificación en los cartuchos de SPE C18, con la finalidad de determinar la proporción de solvente de elución que proporcionara buenos porcentajes de recuperación, se seleccionó una proporción de solvente de elución en los cartuchos de SPE C18 de 70:30 (Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8 : MeOH) con esta proporción se obtuvo un porcentaje de recuperación de AF promedio de tres ensayos del 72%, determinado por CLAR tanto con el método de elución isocrático como en gradiente (ver ensayo 5 TABLA II y ensayo 4 TABLA I).

El análisis de los extractos de harina de maíz purificados por SPE C18 sólo se realizó por CLAR en condiciones de elución en gradiente, obteniendo una concentración de AF (C_{AF}) en la harina de maíz sin vitaminas de 3.00 mg/kg y una concentración de AF en la harina de maíz con vitaminas de 3.01 mg/kg. Las concentraciones obtenidas son parecidas ya que el pico cromatográfico de la harina con vitaminas creció en área pero no en alturas. Estos resultados indicaron que mediante el uso de los cartuchos de SPE C18 la interferencia que contiene la matriz de la muestra y que co-eluye con el ácido fólico en el cromatógrafo de líquidos no se eliminó empleando el sistema de purificación a prueba (ver figura 11).

5.5.3 Análisis de los extractos purificados por SPE SAX

En el análisis por CLAR de los extractos obtenidos del tratamiento de la muestra en buffer de fosfatos a pH alcalino y purificados con SPE SAX según el procedimiento de prueba-1 descrito en el punto 4.5.2.2.1, bajo las condiciones cromatográficas descritas en el ensayo 6 (TABLA II).

148981

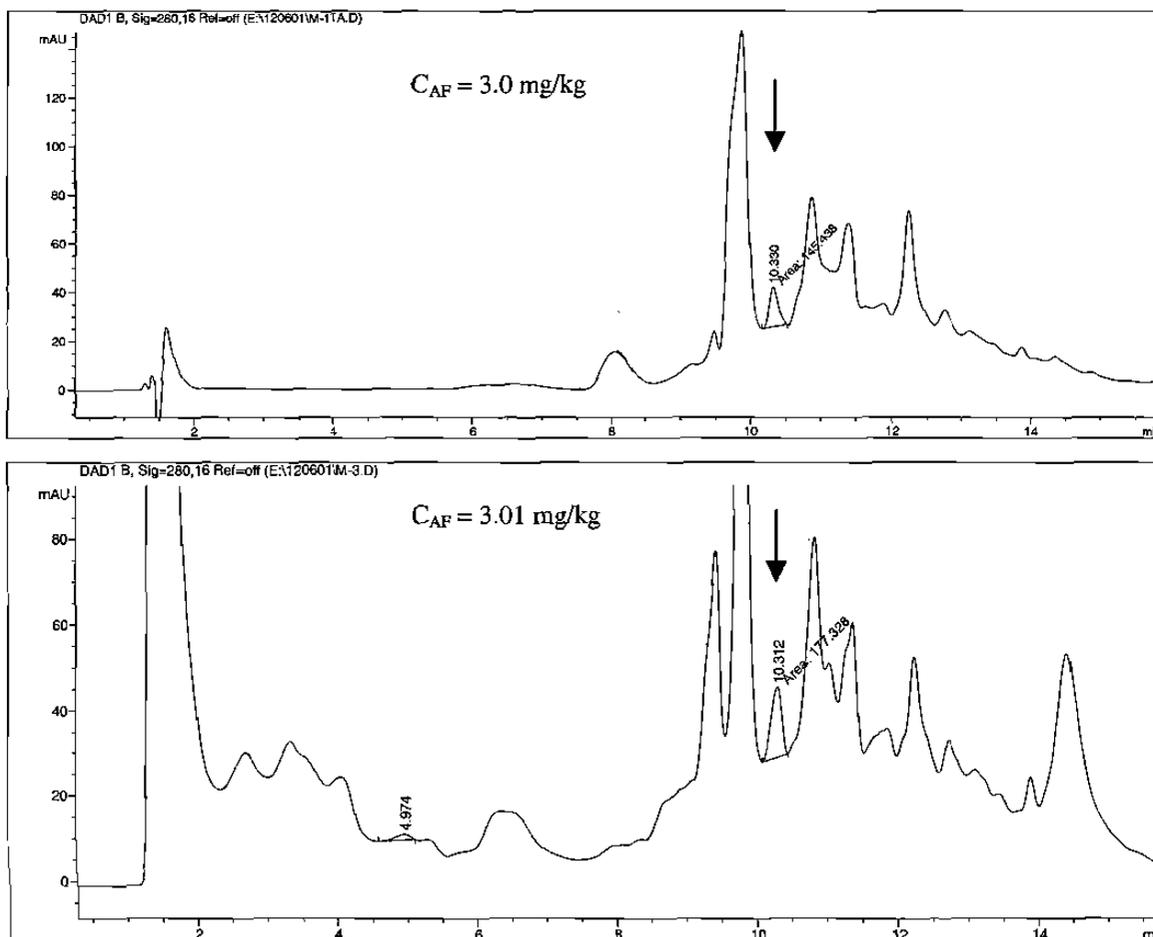


Figura 11. Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por SPE C18. Cromatograma de un extracto de harina de maíz sin vitaminas (superior). Cromatograma de un extracto de harina de maíz con vitaminas (inferior). *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.2 ml/min; *Gradiente:* %0 B por 2 min, 0-28% B en 7 min, 28% B por 2 min, 28-0% B en 5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100 mm, 3 μm . C_{AF} : Concentración de ácido fólico.

El extracto purificado de harina de maíz sin vitaminas presentó un pico al tiempo de retención del AF, el cual fue de 5.22 min y al cuantificarlo se obtuvo una concentración de 3.95 mg/kg, mientras que en la harina de maíz con vitaminas se obtuvo una concentración de 12.09 mg/kg. Esto indicó que con este método de extracción no se eliminaba la interferencia que eluye al tiempo de retención del AF (ver Figura 12).

Al analizar por CLAR las fracciones del extracto de harina de maíz con vitaminas obtenidas con el uso de los cartuchos de SPE SAX siguiendo el procedimiento-2 descrito en el punto 4.5.2.2.2, en el que se aumentó el volumen de solución de lavado a 6 ml, en la fracción del extracto denominada E-3 se obtuvo un pico ancho al tiempo de retención del AF, que al cuantificarlo dio una concentración de 2.07 mg/kg de ácido fólico en la muestra (ver figura 13). Estos resultados indicaron que se requeriría un mayor volumen de lavado para eliminar por completo la interferencia que co-eluye con el ácido fólico.

Posteriormente al aumentar el volumen de lavado como se indica en el procedimiento- 2a descrito en el punto 4.5.2.2.3, y al analizar las fracciones de los mismos y la fracción del reactivo de elución, se observó que después de pasar 18 ml de la solución de lavado no se detectó el pico de la interferencia que estaba co-eluyendo con el ácido fólico, puesto que no se detectó el pico al tiempo de retención del AF. El porcentaje de recuperación de un estándar de ácido fólico de 0.997 $\mu\text{g/ml}$ fue del 63.99%.

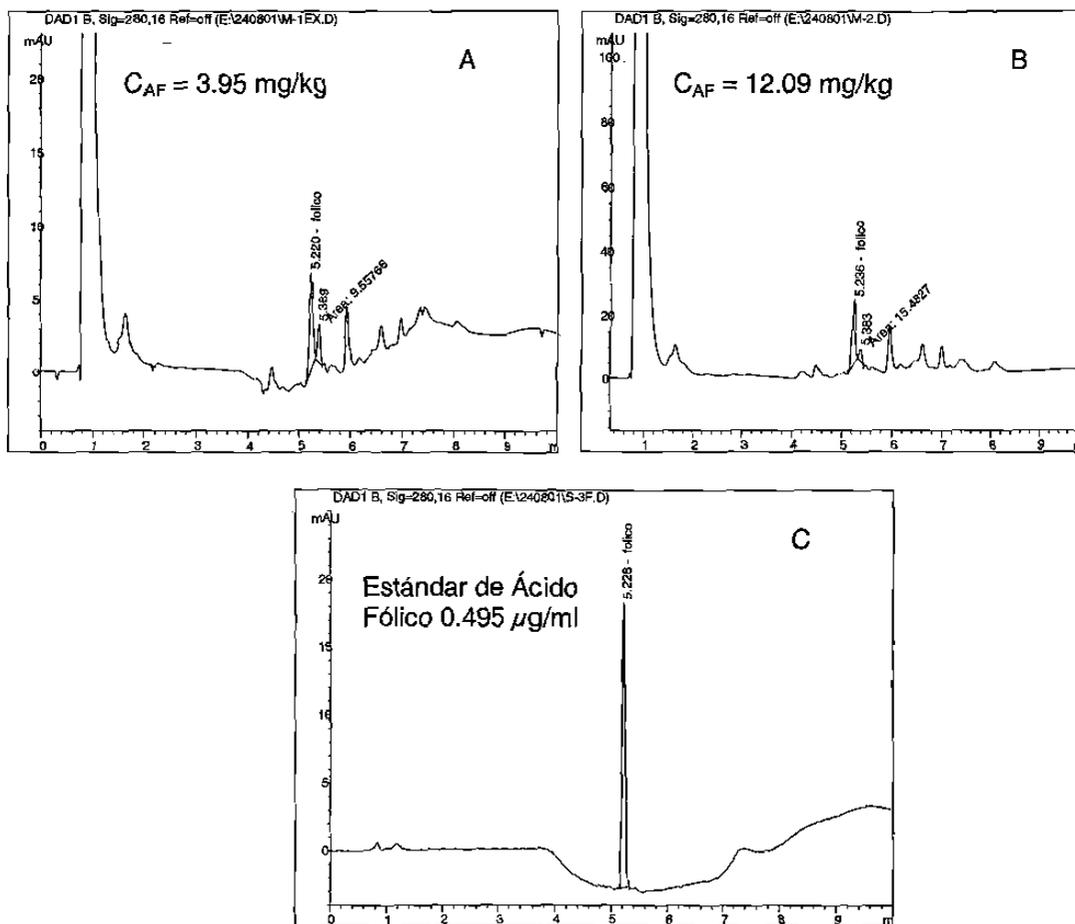


Figura 12. Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por SPE SAX. Cromatograma de un extracto de harina de maíz sin vitaminas (A). Cromatograma de un extracto de harina de maíz con vitaminas (B). Cromatograma de un estándar de Ácido fólico (C). *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.4 ml/min; *Gradiente:* %0 B por 1 min, 0-40% B en 3.5 min, 40% B por 1 min, 40-0% B en 4.5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100 mm, 3 µm. C_{AF} : Concentración de ácido fólico.

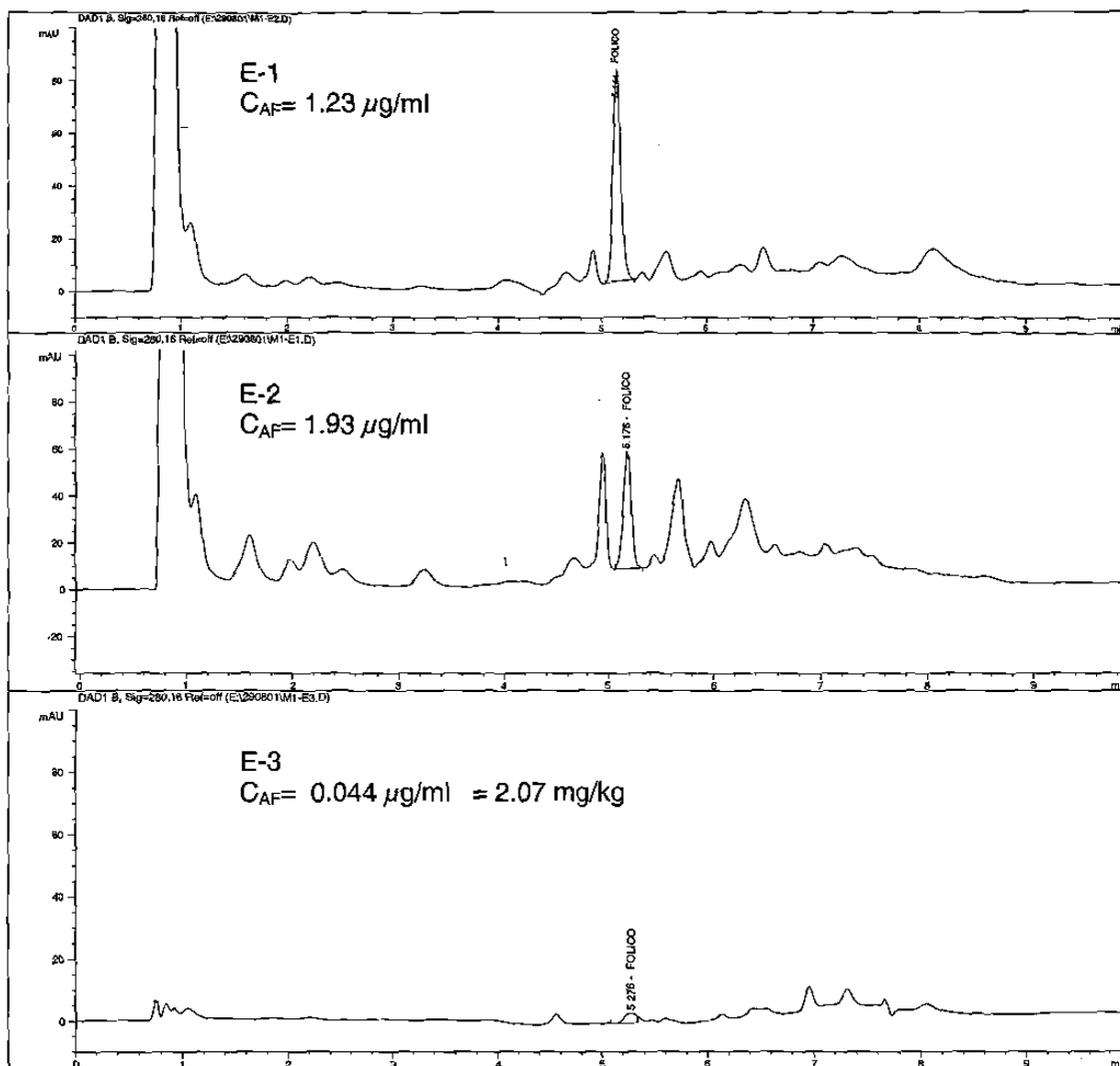


Figura 13. Cromatogramas de las fracciones obtenidas por SPE SAX de un extracto de harina de maíz sin vitaminas. Procedimiento de prueba -2a. E-1: Fracción del eluato de la muestra; E-2: Fracción de lavado; E-3: Fracción de elución con NaOAc 0.1 M, pH 4.5. *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.4 ml/min ; *Gradiente:* %0 B por 1 min, 0-40% B en 3.5 min, 40% B por 1 min, 40-0% B en 4.5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100 mm, 3 μm ; C_{AF} : Concentración de ácido fólico.

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de recuperación de un estándar de ácido fólico de menor concentración, se preparó un estándar de AF de 0.025 $\mu\text{g/ml}$, es decir de una concentración igual a la del ácido fólico contenida en un extracto de harina de maíz con vitaminas, obtenido según el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos a pH alcalino, descrito en el punto 4.5.1.2. El porcentaje de recuperación promedio de ácido fólico fue del 33.9%, determinado según el procedimiento 2-b descrito en el punto 4.5.2.2.4.

Con el objetivo de evaluar si el porcentaje de recuperación del ácido fólico aumentaba al modificar el solvente de acondicionamiento del cartucho SPE SAX, tal como se indica en el procedimiento-2c descrito en el punto 4.5.2.2.5, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio para tres ensayos del 35.1% de ácido fólico. Después de aplicar el mismo procedimiento de purificación a un extracto de harina de maíz sin vitaminas y después de un volumen de lavado en el cartucho SPE SAX de 43.5 ml, en el análisis cromatográfico de dicha fracción se obtuvo un pico casi al mismo tiempo de retención del estándar de ácido fólico con una concentración de $8.87 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$. En la fracción del solvente de elución se obtuvo un pico al tiempo de retención del ácido fólico (5.224 min) obteniendo una concentración de 0.0191 $\mu\text{g/ml}$ en la fracción y una concentración de 0.159 mg/kg en la muestra (ver figura 14). Lo cual indicó que al aumentar el volumen de extracto (12 ml) como era de esperarse, también se requiere un mayor volumen de la solución de lavado para eliminar la interferencia que co-eluye con el ácido fólico.

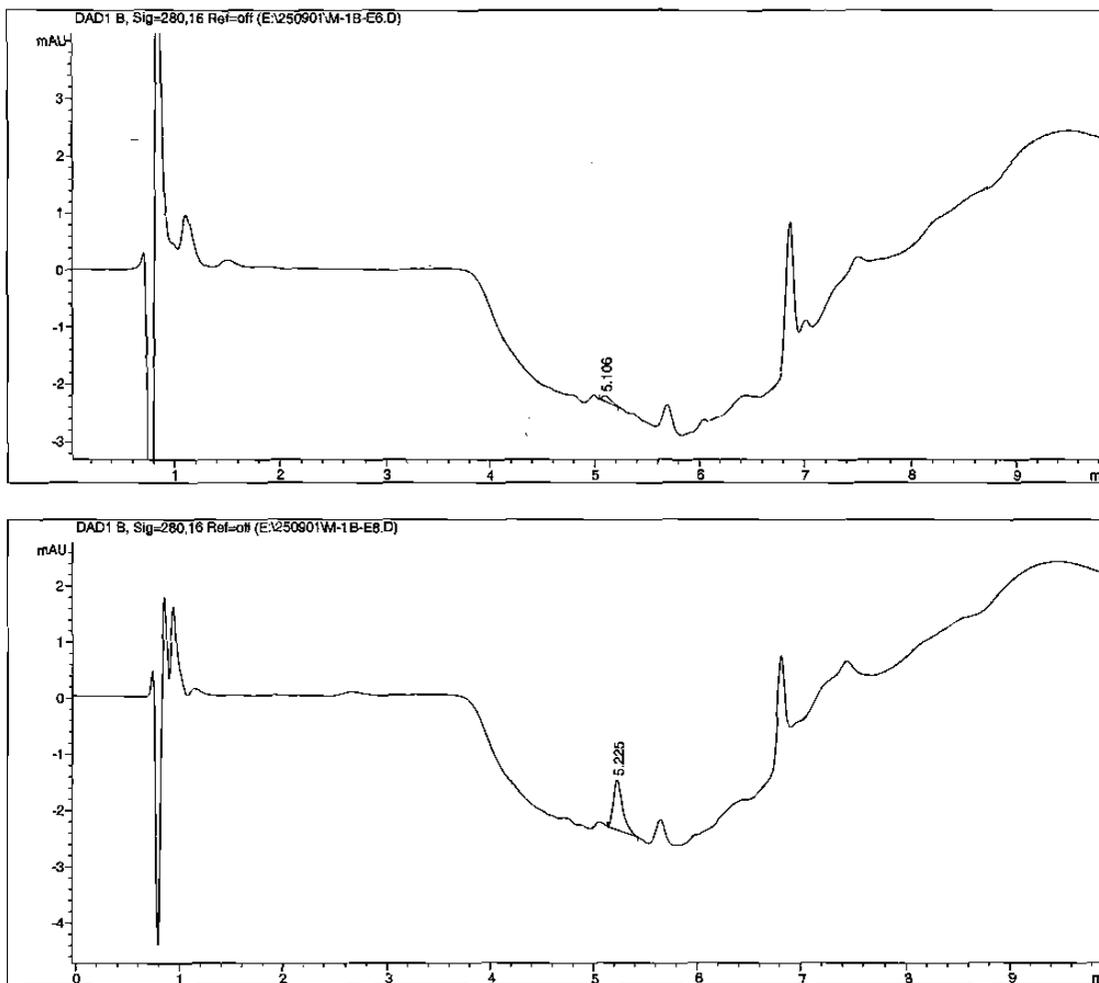


Figura 14. Cromatogramas de las fracciones obtenidas por SPE SAX según procedimiento-2c. Cromatograma de la fracción de lavado (superior). Cromatograma de la fracción de elución con NaOAc 0.1 M, pH 4.5 (inferior). *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.4 ml/min ; *Gradiente:* %0 B por 1 min, 0-40% B en 3.5 min, 40% B por 1 min, 40-0% B en 4.5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100 mm, 3 μ m.

En los ensayos realizados según el procedimiento-2d para obtener las fracciones del extracto de la muestra purificado con SPE SAX, cuando se aplicaron al cartucho 5 ml del extracto de harina de maíz (obtenido según el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos), así como las fracciones de los lavados y de elución del analito, para posteriormente ser analizadas por CLAR y realizar un balance de materia en las fracciones analizadas, se observó que el mayor porcentaje del analito interferente, se pierde en la primera fracción de lavado (ver TABLA IX), los porcentajes de recuperación total de materia fueron menores al 100 %, esto indicó que en los cartuchos SPE SAX todavía quedaba algo de materia retenida, pero fue evidente que al tratar de eliminar la interferencia aumentando el número de lavados en la SPE SAX, también se pierde el ácido fólico ya que al evaluar un estándar de AF se observó que en la tercera fracción de lavado (18 ml) se pierde casi el 58% de ácido fólico quedando retenido en el cartucho un 2.64 %, determinado después de una segunda elución con NaOAc. Al aumentar el volumen de extracto de muestra a 12 ml para ser fraccionado por SPE SAX, se observó que entre el 76-79% de materia no fue retenida en los cartuchos y en la primera fracción de lavado se pierde el mayor porcentaje de materia, en el resto de las fracciones analizadas el porcentaje disminuye. La suma de las fracciones analizadas fue de un 97-109% esto se debió posiblemente a la elución de otros analitos interferentes de la matriz que eluyen con el AF. El volumen de extracto aplicado al cartucho de SPE fue alto (12 ml) pero se uso con la finalidad de concentrar el ácido fólico presente en la harina de maíz vitaminada, sin embargo los resultados no fueron satisfactorios (ver TABLA X).

TABLA IX

Balance de Materia en las Fracciones de Extractos de Harina de Maíz con y sin Vitaminas Purificadas y Concentradas por SPE SAX y Analizadas por CLAR

Fracción Analizada por CLAR	Porcentaje de Recuperación de Materia en las Fracciones Analizadas			
	Extracto de harina de maíz sin vitaminas		Extracto de harina de maíz con vitaminas	
	e-1	e-2	e-1	e- 2
F-1 ^a	29.47	46.69	38.21	37.33
F-Lav-1 ^b	34.76	44.81	44.89	44.58
F-Lav-2 ^b	0.57	1.39	0.95	0.96
F-Lav-3 ^b	0.07	0.06	0.03	0.03
F-Elución ^a	0.07	0.06	0.04	0.03
F-Total	64.93	93.02	84.11	82.93

e: Número de ensayos; F-1:Fracción del extracto de la muestra; F-Lav-1,2 y 3: fracciones de lavado con buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.5; F-Elución : Elución con NaOAc 0.1M, pH 4.5; F-Total: Porcentaje de recuperación total. ^a Volumen de la fracción analizada = 5 ml; ^b Volumen de la fracción analizada = 6 ml.

TABLA X

Balance de Materia en las Fracciones de Extractos de Harina de Maíz con y sin Vitaminas Purificadas y Concentradas por SPE SAX y Analizadas por CLAR

Fracción Analizada por CLAR	Porcentaje de Recuperación de Materia en las Fracciones Analizadas					
	Extracto de harina de maíz sin vitaminas		Extracto de harina de maíz con vitaminas		Estándar de Ácido Fólico	
	e-1	e-2	e-1	e-2	e-1	e-2
F-1	77.46 ^d	79.13 ^d	76.16 ^d	76.15 ^d	0.00 ^g	0.00 ^g
F-Lav-1	18.16 ^c	20.20 ^c	14.60 ^b	12.21 ^b	0.51	0.50
F-Lav-2	0.30 ^c	3.54 ^c	11.04 ^e	10.32 ^e	9.52	9.51
F-Lav-3	0.21 ^c	3.19 ^c	2.81 ^b	2.84 ^b	56.45	57.77
F-Lav-4	0.25 ^c	2.45 ^c	2.01 ^b	2.00 ^b	-	-
F-Lav-5	0.23 ^c	1.75 ^c	1.64 ^b	1.57 ^b	-	-
F-Elución 1	0.06 ^b	0.99 ^b	1.42 ^b	1.30 ^b	30.82 ^b	29.78 ^b
F-Elución 2	0.36 ^a	0.25 ^a	-	-	2.72 ^f	2.64 ^f
F-Total	97.04	111.50	109.68	106.39	100.02	100.20

e: Número de ensayos; F-1:Fracción del extracto de la muestra; F-Lav-1,2,3,4 y 5: fracciones de lavado con buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.5; F-Elución : Elución con NaOAc 0.1M, pH 4.5; F-Total: Porcentaje de recuperación total. ^a Volumen de la fracción analizada = 4 ml; ^b Volumen de la fracción analizada = 5 ml. ^cVolumen de la fracción analizada = 6; ^d Volumen de la fracción analizada = 12 ml; ^e Volumen de la fracción analizada = 55 ml. ^f Volumen de la fracción analizada = 2 ml. ^g Volumen de la fracción analizada = 1 ml.

5.5.4 Porcentajes de recuperación de AF por cromatografía de afinidad

Al analizar por CLAR el estándar de AF de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, purificado y concentrado previamente por cromatografía de afinidad, se obtuvo un pico no muy resuelto del AF a un tiempo de retención de 9.980 min, el cual co-eluyó con otro pico cercano, además de observarse en el cromatograma la presencia de otro pico a un tiempo de retención de 11.697 min. Para determinar el origen de los picos que estaban co-eluyendo junto con el AF se analizó por CLAR el reactivo de elución usado en el paso de purificación, el cual estaba constituido por una mezcla de TFA y ditioneitol, también se analizó por CLAR cada reactivo de forma individual. Los resultados del análisis cromatográfico mostraron que los picos interferentes provenían del ditioneitol, (reactivo usado como antioxidante) puesto que al analizar el TFA por separado no aparece en el cromatograma ningún pico que pudiera causar interferencia con el ácido fólico (ver Figura 15).

Los porcentajes de recuperación del ácido fólico se evaluaron en cuatro columnas de afinidad, usando sólo como solvente de elución TFA, se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 99% (ver TABLA XI) .

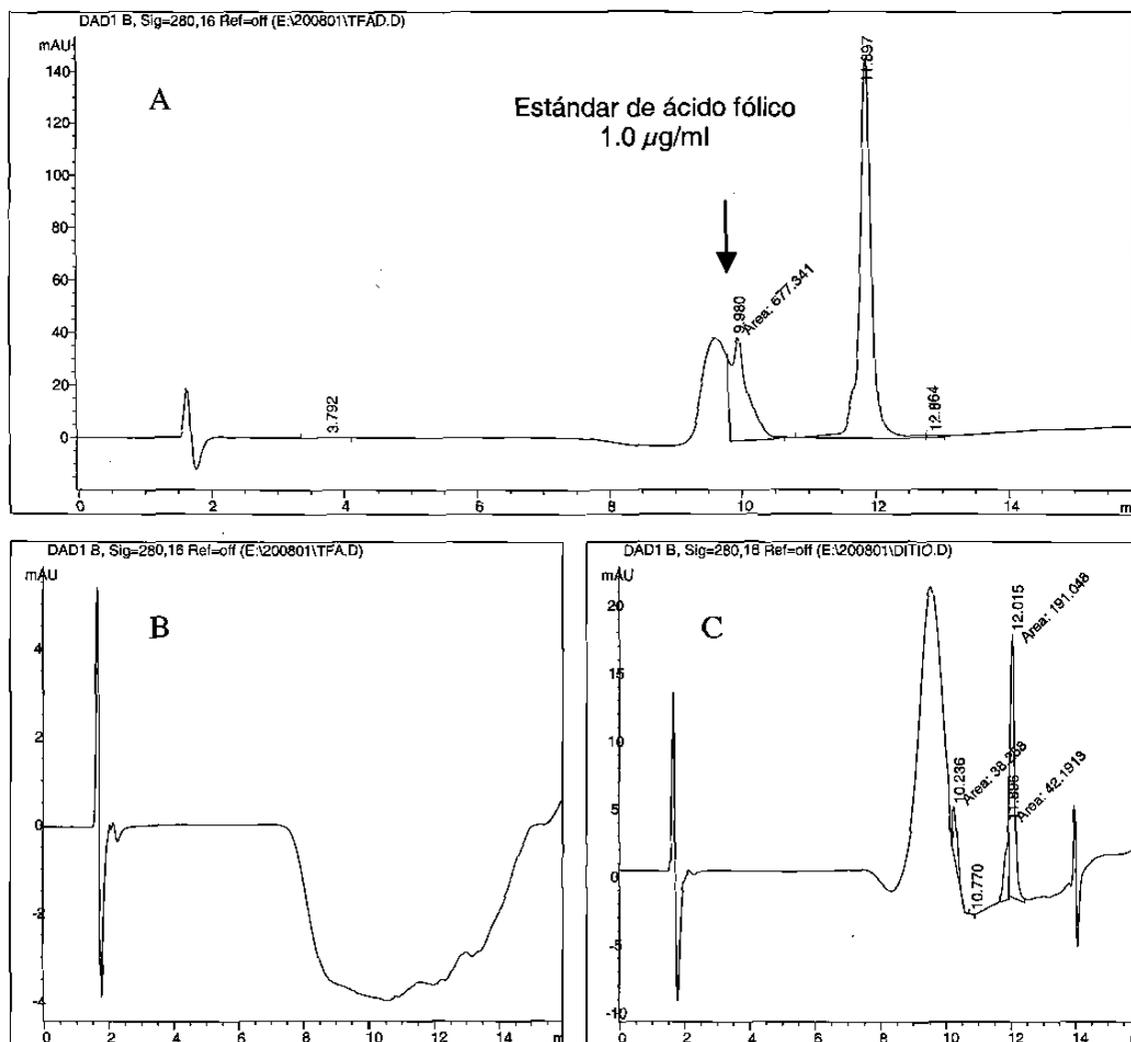


Figura 15. Cromatogramas de reactivos de elución. Cromatograma del reactivo de elución TFA/Ditiotreitol 20 mM (A). Cromatograma de una solución de TFA 20 mM. (B). Cromatograma de una solución de Ditiotreitol 20 mM (C). *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.2 ml/min; *Gradiente:* %0 B por 2 min, 0-40% B en 7 min, 40% B por 2 min, 40-0% B en 5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100 mm, 3 µm.

TABLA XI

Porcentajes de Recuperación de un Estándar de Ácido Fólico de 25 ng/ml en Columnas de Afinidad

% Recuperación			
Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4
99.2 ± 0.25	99.7 ± 0.12	100.1 ± 1.38	99.7 ± 0.12

Los resultados se expresan como la $x \pm s$, para (n =3).

5.5.5 Análisis de los extractos purificados por cromatografía de afinidad

Al analizar por CLAR un estándar de AF se obtuvo un pico a un tiempo de retención de 5.22 min, al analizar un extracto de harina de maíz sin vitaminas y un extracto de harina de maíz con vitaminas obtenidos según el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos a pH alcalino, y purificados por cromatografía de afinidad, en el extracto purificado de harina de maíz sin vitaminas no se detectó el pico de ácido fólico, mientras que en el extracto purificado de harina de maíz con vitaminas se obtuvo un pico al mismo tiempo de retención que el AF (5.22 min) y al cuantificarlo se obtuvo una concentración de ácido fólico de 0.52 mg/kg en la muestra (ver figura 16).

La concentración de AF obtenida en la harina de maíz vitaminada concuerda con la cantidad de ácido fólico que se adiciona en proceso la cual es de 0.5 mg/kg de harina.

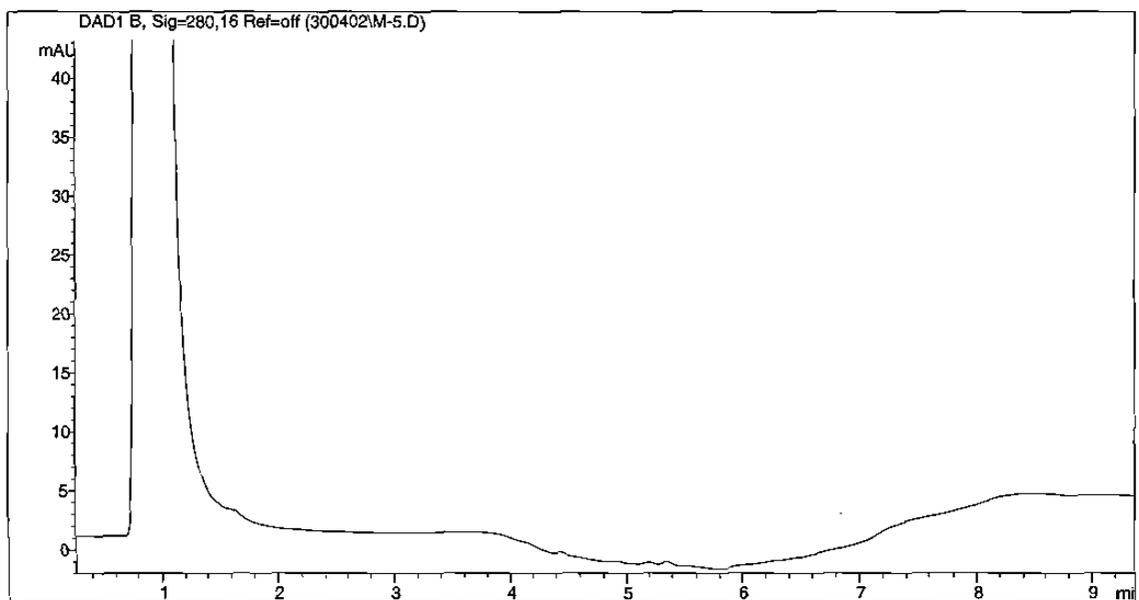
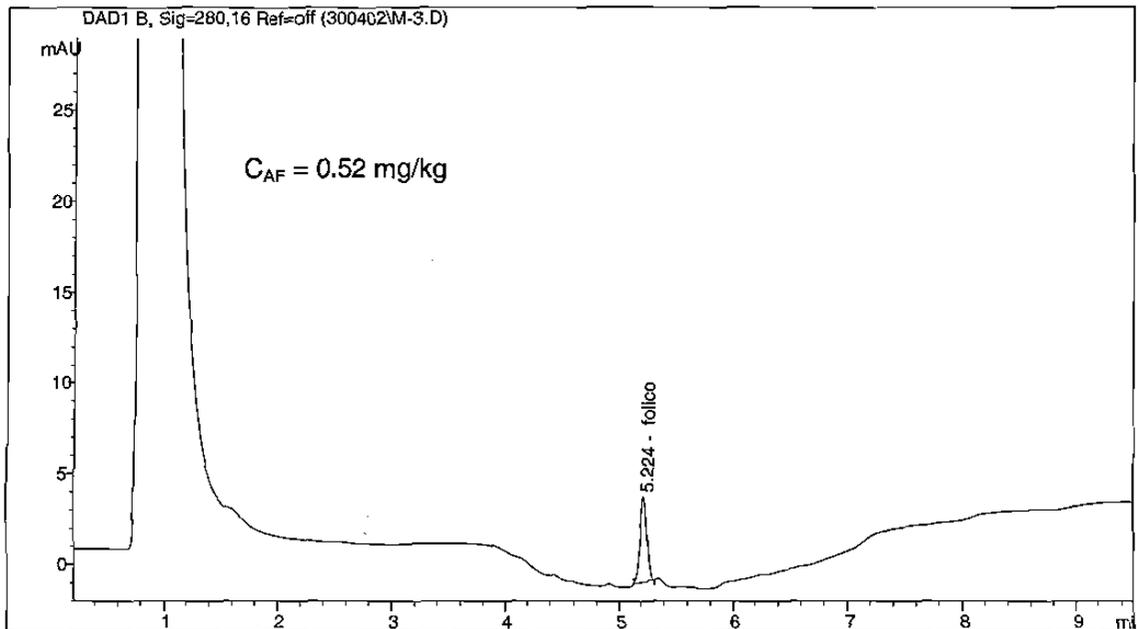


Figura 16. Cromatogramas de extractos de harina de maíz purificados por cromatografía de afinidad. Cromatograma de un extracto de harina de maíz vitaminada (superior). Cromatograma de un extracto de harina de maíz sin vitaminas (inferior). *Fase móvil A:* Buffer fosfatos 50 mM, pH 6.8; *Fase móvil B:* MeOH; *Flujo:* 0.2 ml/min; *Gradiente:* %0 B por 1 min, 0-40% B en 3.5 min, 40% B por 1 min, 40-0% B en 4.5 min; *Columna:* Hypersil C18 2.1x 100, 3 μm ; C_{AF} : Concentración de ácido fólico.

5.6 Exactitud del método con el uso de cromatografía de afinidad

La evaluación de método se realizó en muestras de harina de maíz de concentración conocida de AF, empleando el procedimiento de extracción en buffer de fosfatos (descrito en el 4.5.1.2), usando como método de purificación y concentración cromatografía de afinidad. El porcentaje de recuperación promedio obtenido en muestras de concentración conocida evaluado en un sólo día fue de 89.2% y evaluado en días diferentes fue de 89.7%.

5.7 Repetibilidad y reproducibilidad del método de análisis

Al evaluar la variación del método de análisis en un día se determinó la repetibilidad, obteniendo una menor variación en un solo día. Sin embargo al evaluar el método de análisis en días diferentes para evaluar la reproducibilidad, se obtuvo una mayor variación la cual fue menor al 5% (ver TABLA XII).

TABLA XII

Repetibilidad y Reproducibilidad del Método para
AF en Harina de Maíz por CLAR

	Concentración de AF mg/kg	C.V.
Repetibilidad	0.446 ± 0.004	0.85
Reproducibilidad	0.443 ± 0.018	4.04

Los resultados se expresan como la $x \pm s$, para (n =5).

5.8 Limite práctico de cuantificación y límite de detección

La mínima concentración de ácido fólico que puede ser cuantificable (L.P.C.) para un coeficiente de variación del 5% fue de 0.16 mg/kg equivalente a 160 ng/ml (ver figura 17).

TABLA XIII

Datos para Determinación del L.P.C.

Concentración de AF en la muestra mg/kg	C.V.
0.125	6.20
0.250	1.93
0.500	0.23

Los resultados se expresan como el promedio del coeficiente de variación de cada concentración (n=3).

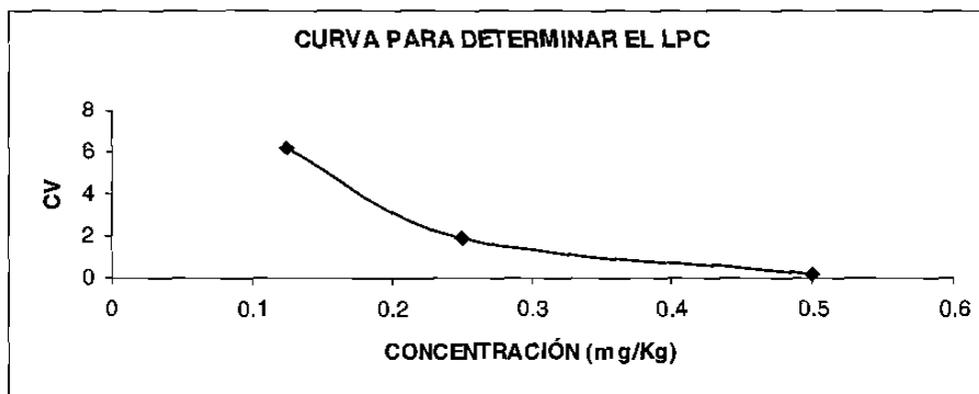


Figura 17. Gráfico para determinación del L.P.C. Coeficiente de variación contra concentración de ácido fólico. CV ; Coeficiente de variación.

El valor del límite de detección se determinó del valor de ruido obtenido de la altura del máximo pico al mínimo pico (PtoP), dando un valor de 0.0412 mAu que multiplicado por 2 y extrapolado en la curva de calibración dio un valor de 2 ng/ml ($0.02 \mu\text{g/ml} = 2 \times 10^{-3} \text{ mg/kg}$) (ver figura 18).

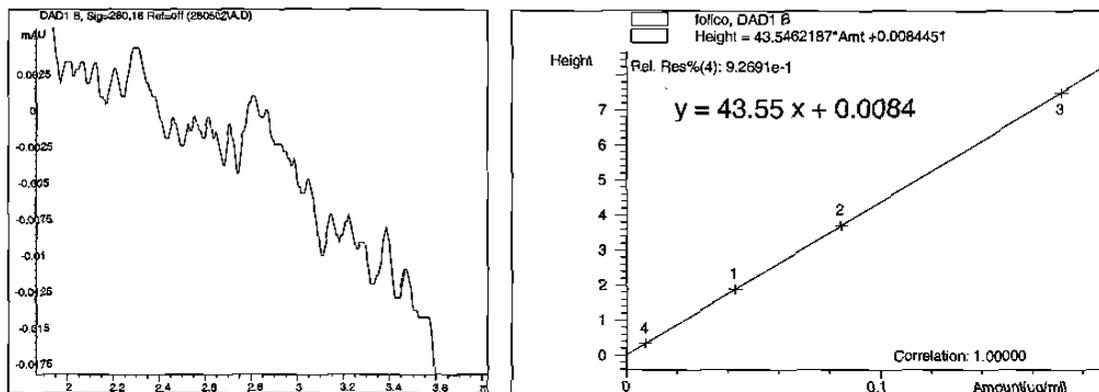


Figura 18. Curva de calibración y nivel de ruido para determinar el L.D. Cromatograma del nivel de ruido (PtoP) (izquierdo). Curva de calibración de 0.1717 $\mu\text{g/ml}$, 0.0847 $\mu\text{g/ml}$, 0.0432 $\mu\text{g/ml}$, 0.0075 $\mu\text{g/ml}$ (derecho).

5.9 Análisis de AF en harina de maíz vitaminada, tortillas y tostadas

Los coeficientes de variación de la concentración de ácido fólico, en las muestras analizadas de harina de maíz, tortillas y tostadas fueron de un 0.5 a 5.6%, para $n=3$ (ver TABLA XIV).

TABLA XIV

Concentración de Ácido Fólico en Harina de Maíz, Tortillas y Tostadas

Harina de maíz de un mismo tipo			Tortilla	Tostada
L-1	L-2	L-3	L-1	L-2
(mg/kg)				
0.50 ± 0.017	0.632 ± 0.003	0.560 ± 0.007	0.407 ± 0.005	0.548 ± 0.003

Los resultados se expresan como la $m \pm s$ para $n=3$, en base seca; ^{cv} Coeficiente de variación. L-1, L-2, L-3 ; Lotes de harina de maíz vitaminada de un solo tipo en presentación de 1 kg; Tortilla L-1: Tortilla elaborada con el L-1 de harina de maíz vitaminada . Tostada L-2: Tostada elaborada con el lote de harina maíz L-2.

TABLA XV

Concentración de Ácido Fólico en Harina de Maíz y Tortillas de Diferentes Formulaciones.

Formulación -1		Formulación- 2		Formulación -3	
Harina	Tortilla	Harina	Tortilla	Harina	Tortilla
(mg/kg)					
0.452 ± 0.009	0.440 ± 0.003	0.48 ± 0.028	0.428 ± 0.001	0.490 ± 0.003	0.474 ± 0.009

Los resultados se expresan como la $m \pm s$ para $n=3$. en base seca. ^{cv} coeficiente de variación; Formulación -1; Harina de maíz vitaminada con conservadores; Formulación- 2; Harina de maíz vitaminada con conservadores y texturizante; Formulación -3; Harina de maíz vitaminada con conservadores y un blanqueador.

5.10 Comparación estadística de los resultados obtenidos en las muestras de harina, tortillas y tostadas de maíz.

5.10.1 Análisis de varianza y comparación múltiple de Tukey

En el análisis de ANOVA de las concentraciones de AF para las harinas de un mismo tipo y las harinas de diferentes formulación así como las tortillas elaboradas con las respectivas harinas, se encontraron diferencias significativas para $p < 0.05$.

Los resultados de la comparación múltiple de Tukey se expresan en las TABLAS XVI, XVII y XVIII.

TABLA XVI.

Comparación Múltiple de Tukey en Harina de Maíz de un Mismo Tipo

Lote	Concentración de AF mg/kg
1	0.50 ± 0.017 ^a
2	0.632 ± 0.0034 ^b
3	0.560 ± 0.0070 ^c

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

TABLA XVII.

Comparación Múltiple de Tukey en Harina de Maíz de un Mismo Tipo y de Diferentes Formulaciones

Lote	Concentración de AF mg/kg
1	0.50 ± 0.017 ^a
F-1	0.452 ± 0.0090 ^b
F-2	0.48 ± 0.028 ^{a,b}
F-3	0.490 ± 0.0034 ^{a,b}

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$.
F: Formulación

Entre todas las harinas de un mismo tipo se encontraron diferencias significativas, mientras que entre todas las harinas de diferente formulación y un mismo tipo, los lotes 1 y F-1 mostraron diferencias significativas entre sí y con los lotes F-2 y F-3 no mostraron diferencias significativas entre sí y entre estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas entre sí.

TABLA XVIII

Comparación Múltiple de Tukey en Tortillas Elaboradas con Harina de Maíz de un Mismo Tipo y de Diferentes Formulaciones

Lote	Concentración de Ácido fólico mg/kg
1	0.407 ± 0.0050 ^a
F-1	0.440 ± 0.0035 ^b
F-2	0.428 ± 0.0012 ^b
F-3	0.474 ± 0.0095 ^c

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ ($n=3$).
Literales diferentes indican diferencias significativas para $p<0.05$. F: Formulación

El lote 1 mostró diferencias significativas con los lotes F-1, F-2 y F-3, mientras que los lotes F-1 y F-2 no mostraron diferencias significativas, pero ambos sí presentaron diferencias significativas con los lotes 1 y F-3, el lote F-3 mostró diferencias con los lotes 1, F-1 y F-2.

5.10.2 Pruebas de t-student en harina, tortillas y tostadas de maíz

Al comparar la concentración de AF de la harina de un mismo tipo y cada una de las harinas de diferente formulación con sus respectivas tortillas se observó que para el caso de la concentración de harina y tortillas del lote 1 no hay diferencias significativas entre varianzas, pero al realizar la prueba de t-student, sí se encontraron diferencias significativas entre las medias de los dos productos (ver TABLA XIX). En el caso de la concentración de harina y tortillas de la formulación 1, no se encontraron diferencias significativas entre varianzas, y según la prueba de t-student, el resultado indicó que entre la media de las concentraciones de AF no hay diferencias significativas (ver TABLA XX).

TABLA XIX

Comparación de Medias
por la Prueba de t-Student para
Harina y Tortilla L-1

Producto	Concentración de AF mg/kg
Tortilla	0.407 ± 0.005 ^a
Harina	0.50 ± 0.017 ^b

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$.
AF: Ácido fólico.

TABLA XX

Comparación de medias
por la prueba de t-Student para
Harina y Tortilla F-1

Producto	Concentración de AF mg/kg
Tortilla	0.440 ± 0.0035 ^a
Harina	0.452 ± 0.0090 ^a

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$.
AF: Ácido fólico.

En el caso de la concentración de harina y tortillas de la formulación-2 sí se encontraron diferencias significativas entre varianzas ($F < 0.05$), pero al comparar las medias de la concentración de los dos productos con la prueba de t-student no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de ácido fólico en harina y tortilla (ver TABLA XXI), y entre la concentración de harina y tortilla de la formulación-3 no se encontraron diferencia significativas entre varianzas ($F > 0.05$), así como tampoco se encontraron diferencias significativas entre sus medias ($p > 0.05$) (ver TABLA XXII).

TABLA XXI

Comparación de medias por la prueba de t-Student para Harina y Tortilla F-2

Producto	Concentración de AF mg/kg
Tortilla	0.428 ± 0.0012 ^a
Harina	0.48 ± 0.028 ^a

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$. AF: Ácido fólico.

TABLA XXII

Comparación de medias por la prueba de t-Student para Harina y Tortilla F-3

Producto	Concentración de AF mg/kg
Tortilla	0.474 ± 0.0095 ^a
Harina	0.4900 ± 0.00346 ^a

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$. AF: Ácido fólico.

Al comparar la concentración de AF de la harina de maíz del lote 2 con la de las tostadas elaboradas a partir del mismo lote de harina, no se encontraron diferencias significativas entre las varianzas ($F > 0.05$), pero al comparar las medias de la concentración de ácido fólico por medio de la prueba de t-student sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (ver TABLA XXIII).

TABLA XXIII

Comparación de Medias por Medio de la Prueba de t-student para Harina de Maíz y Tostadas L-2

Producto	Concentración de AF mg/kg
Harina	0.632 ± 0.003 ^a
Tostada	0.548 ± 0.003 ^b

Los resultados se expresan como la $x \pm s$ (n=3). Literales diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$; AF: Ácido fólico.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

EL método de análisis desarrollado para cuantificar ácido fólico en harina de maíz y productos derivados por CLAR se basa en la extracción del ácido fólico en buffer de fosfatos a pH alcalino en presencia de ácido ascórbico como antioxidante para prevenir la degradación del AF dada la sensibilidad de esta vitamina del complejo B a la oxidación. Posterior a la extracción del AF en la muestra usando el procedimiento en buffer de fosfatos a pH alcalino, se realizó una hidrólisis enzimática con alfa amilasa para facilitar la filtración del extracto por el alto contenido de almidón presente en la harina de maíz. Para purificar y concentrar el ácido fólico extraído se usó cromatografía de afinidad, cuya metodología fue desarrollada por Selhub *et al.* (13). El análisis cromatográfico se realizó en condiciones de elución en gradiente usando como fase móvil buffer de fosfatos y metanol, un flujo de 0.4 ml/min con detección a 280 nm. El método desarrollado por CLAR, presentó un rango lineal de 50 a 200 ng/ml (incluso de 7.5 ng/ml- 1000 ng/ml) con un loop de inyección de 20 μ l y un límite de detección de 2 ng/ml, mientras que Koning's *et al.* (7) reportaron un rango lineal de 0-100 ng/ml y un L.D de 1.0 ng/ml pero con un loop de inyección de 100 μ l.

El tiempo de análisis del método fue de 10 min y entre inyecciones consecutivas de 12 min. Koning`s *et al.* (7) reportaron 40 min entre inyecciones consecutivas, casi similar a lo que reportaron Pfeiffer *et al.* (11) los cuales obtuvieron un tiempo de análisis de 45 min entre inyecciones, Vahterisco *et al.* (16), reportaron 32 min además de usar como solventes de elución ácido fosfórico y acetonitrilo, el primero usado a un pH muy bajo (2.3), lo cual pudiera afectar la fase de la columna analítica, y el segundo tiene un costo más elevado que el metanol, solvente usado en el método desarrollado en el presente estudio y en el cual además se empleó una solución de buffer de fosfatos a pH 6.8.

El ácido fólico presente en la harina de maíz, tortilla y tostada (desengrasada), se logró extraer en un medio buffer básico conteniendo ácido ascórbico como antioxidante (procedimiento 4.5.2.1), contrario a los buffer orgánicos que describieron en sus métodos Koning`s *et al.* (7), Vahterisco *et al.* (16), Seyoum, Selhub (13), los cuales no se encuentran fácilmente disponibles en las casas comerciales sin olvidar su elevado costo. Además de utilizar sólo ácido ascórbico para prevenir la degradación del ácido fólico, a pesar de que Vahterisco *et al.* (16) reportaron inestabilidad del ácido ascórbico a pH alto, lo cual resulta cierto, ya que en el presente estudio se observó que después de aproximadamente una hora de preparada la solución de extracción, el ácido ascórbico comienza a oxidarse, pero una vez terminado el paso de extracción que involucra un tiempo de 30 min, inmediatamente se disminuye el pH de la solución para continuar con la etapa de la hidrólisis enzimática y aún así se logró obtener un porcentaje de recuperación del ácido fólico en la muestra del

89%. En teoría el ácido fólico presenta estabilidad a pH 5-12. En la etapa de la hidrólisis enzimática sólo se usó una amilasa bacteriana proveniente de *Bacillus subtilis*, sin necesidad de usar sistemas trienzima, atmósferas de N₂, mercaptoetanol y ditioneitol, los cuales se emplean cuando se requiere cuantificar los folatos endógenos totales (Tamura *et al.* (15), Pfeiffer *et al.* (11), Koning's *et al.* (7)). Osseyi *et al.* (10) emplearon una α -amilasa de *Aspergillus oryzae* para facilitar la filtración de la muestra empleando un tiempo de hidrólisis de 1 h, en este trabajo se obtuvieron extractos fácilmente filtrables empleando 30 min en la hidrólisis enzimática. En el método de extracción en fase sólida SAX que propusieron estos investigadores mencionan que fue efectivo para eliminar algunas sustancias que eluyen en la vecindad del AF con buenos resultados en maíz y Corn flakes, en donde la concentración de AF en este tipo de productos es mayor de 3 mg/kg, mientras que para la harina de maíz es de 0.5 mg/kg, incluso mencionan que para el caso del Corn flakes no es necesario purificar. Sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo su método de purificación no es aplicable en harina de maíz y harina de trigo, indudablemente esto es debido a las diferencias que existen en un maíz crudo (sin procesar) y una harina de maíz la cual ha pasado por todo un proceso en el cual la matriz del maíz experimenta varios cambios fisicoquímicos. Osseyi *et al.* (10) reportaron un porcentaje de recuperación de ácido fólico en los extractos del 86-90% y en los cartuchos de SPE SAX de 97-99% mientras que bajo las condiciones de prueba utilizadas en este estudio, los porcentajes de recuperación en los cartuchos fueron de un 33- 35%. Vahterisco *et al.* (16)

obtuvieron una recuperación del 75% en los cartuchos SAX pero usaron NaCl como contraión para aumentar los porcentajes de recuperación.

En las pruebas realizadas en el presente estudio usando SPE SAX se observó que después de una segunda elución todavía se recuperaba algo de ácido fólico, sin embargo no se consideró prioritario el uso de NaCl puesto que las pruebas se enfocaron a la eliminación de la interferencia. Stokes *et al.* (14) aplicaron un método para cuantificar AF en un cereal para el desayuno y usaron como método de purificación SPE de C18 y encontraron que contenía una cantidad significativamente más alta de AF que lo que ellos esperaban, con un porcentaje de variación del 23%, pero usaron como método de detección espectrometría de masas, en el presente estudio al evaluar los cartuchos de SPE C18 como método de purificación también se encontraron cantidades de AF en harina maíz significativamente más altas que la cantidad de ácido fólico que se adiciona en proceso (0.5 mg/kg) incluso en la harina de maíz sin vitaminas razón por la cual la SPE C18 quedó descartada como método de purificación.

Por cromatografía de afinidad se logró la purificación de los extractos con porcentajes de recuperación de AF en las columnas mayores al 99% y en la muestra de un 89.2-89.7%, usando en el paso de elución únicamente TFA lo cual quizá mejoró el tiempo de vida útil de las columnas ya que después de 29 extractos de harina de maíz purificados por cromatografía de afinidad se evaluaron los porcentajes de recuperación de AF en las columnas y se logró recuperar el 90% de AF, contrario a lo observado por Koning's *et al.* (7) los cuales reportaron una disminución de la capacidad de enlace de las columnas

hasta un 58% después de 18 extractos procesados, pero usaron una mezcla de TFA, mercaptoetanol y ditioneitol, al igual que Seyoum, Selhub (1993) pero en su método de purificación por cromatografía de afinidad estos últimos recibieron el extracto en piperazina para aumentar el pH, mientras que en la metodología desarrollada en este estudio, al igual que Koning's *et al.* (7), se utilizó KOH 4 M.

El procedimiento de purificación se realizó conforme a lo descrito por Koning's *et al.* (7) y Pfeiffer *et al.* (11) excepto por el volumen de solución de acondicionamiento de las columnas, el volumen de extracto y el reactivo de elución. La purificación se realizó a temperatura ambiente sin control de la velocidad de flujo por bomba peristáltica. Pfeiffer *et al.* (11) reportaron porcentajes de recuperación en productos a base de cereales de un 87.9-107%, además de que mencionan que los agentes reductores ascorbato y mercaptoetanol no interfieren en la separación cromatográfica, mientras que bajo las condiciones cromatográficas empleadas en este trabajo, la presencia de ácido ascórbico no interfirió en la separación cromatográfica pero la presencia del ditioneitol sí causó interferencia en la separación del AF, debido a la co-elución de impurezas del reactivo. El pH seleccionado para el acoplamiento de la FBP-Affigel 10 fue muy adecuado tal como lo menciona Koning's *et al.* (7), la cantidad de FBP usada para el acoplamiento fue determinada en base a las recomendaciones del proveedor, 1 mg de proteína tiene la capacidad de enlazar 1-3 µg de ácido fólico a 25°C a pH 7.5.

La desventaja del uso de la proteína de unión a folato es su difícil adquisición ya que se tiene que importar, su costo es elevado, la preparación de las columnas requiere de equipamiento a 4°C, en nuestro estudio se tuvo que

controlar la temperatura todo el tiempo de incubación durante 12 h, lo cual resultó algo tedioso. Sin embargo el tiempo de vida útil de las columnas de afinidad resulta adecuado, con 5 mg de FBP se pueden preparar 10 columnas, suficientes para un año o más (lo cual dependerá del número de muestras).

Sin duda alguna el método de purificación por afinidad resultó ser el mejor a comparación de SPE de C18 y SAX ya que se eliminaron todas las impurezas que estaban co-eluyendo con el AF al momento del análisis cromatográfico.

Una desventaja del método desarrollado es que los extractos de la muestra después de la hidrólisis enzimática, así como los obtenidos por cromatografía de afinidad no se pueden guardar en refrigeración para analizarse otro día ya que el ácido fólico comienza a degradarse, tal vez si se utilizara una atmósfera de N₂ o mercaptoetanol (reactivo no usado dada su toxicidad) se podrían guardar los extractos para su análisis posterior pero eso tendría que evaluarse.

En este estudio los extractos obtenidos después de la hidrólisis enzimática se mantuvieron a temperatura ambiente por un período no mayor a 3 h antes del paso de purificación.

En cuanto al método de elución cromatográfico del AF, se presenta una caída de la línea base, esto quizá se atribuya al reactivo usado en la fase móvil A, en un principio se pensó que podría ser por impurezas del agua o MeOH, se cambió de marca de agua y MeOH (grado HPLC), sin cambio en la línea base, además se midieron las absorbancias del MeOH y agua en el UV pero no se observaron diferencias en las absorbancias de ambos. Aun así esto no afectó la repetibilidad y reproducibilidad en el análisis cualitativo y cuantitativo del AF por CLAR.

En los datos obtenidos de la comparación estadística de las concentraciones de ácido fólico en muestras reales, se encontraron diferencias significativas principalmente en la concentración de ácido fólico en harina de maíz de un mismo tipo y de diferentes lotes, las cuales se podrían atribuir al proceso de dosificación o quizá a la distribución del ácido fólico en la premezcla vitamínica.

En estudios anteriores se han observado diferencias significativas en la concentración de vitaminas la cual se debe al proceso de la homogenización de partículas diferentes y el tratar de mantener la relación harina de maíz-vitaminas presenta algo de dificultad, ya que en el proceso de mezclado continuo existen fluctuaciones naturales del flujo de harina que normalmente se tratan de reducir con un controlador de flujos, pero la aglomeración de partículas puede formar grumos debido a las diferencias en humedades de los componentes de la premezcla y a la humedad del aire y de transporte.

Por otro lado no se observaron diferencias significativas en la concentración de AF de harina a tortilla de diferentes formulaciones, mientras que de harina a tostada sí se observaron diferencias significativas en la concentración de ácido fólico lo cual se atribuye al proceso de freído a 180°C.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el método de análisis para cuantificar el ácido fólico en harina de maíz y productos derivados por CLAR empleando cromatografía de afinidad, se logró reducir el tiempo de análisis con un nivel de detección de 2 ng/ml, un rango lineal con $r^2 > 0.9998$. La metodología desarrollada mostró un nivel de precisión < 4.04% y porcentajes de recuperación en la muestra > 89%, puede ser aplicable en un laboratorio de rutina cuando sólo se requiera cuantificar el ácido fólico adicionado y además todos los reactivos se encuentran disponibles comercialmente. El método de purificación por cromatografía de afinidad resultó ser adecuado, pero las columnas con la FBP no se encuentran disponibles de forma comercial sin embargo la proteína de unión a folato se encuentra disponible comercialmente y las columnas se pueden elaborar en el laboratorio y hacer el procedimiento aplicable en condiciones de rutina y tienen un buen tiempo de vida útil hasta de 5 meses o quizá mayor. El método es aplicable a todos los productos derivados del maíz. La mínima concentración que puede ser cuantificable en harina de maíz es de 0.16 mg/kg.

De acuerdo a los datos proporcionados por el análisis estadístico las diferencias encontradas en la concentración de ácido fólico en harina de maíz de un mismo tipo y de diferentes formulaciones se podrían atribuir al proceso de dosificación o quizá a la distribución del ácido fólico en la premezcla vitamínica.

Por otro lado no se observaron diferencias significativas en la concentración de AF de harina y tortilla de diferentes formulaciones, por lo tanto la presencia de conservadores y otros aditivos usados en harina de maíz para elaborar tortillas, no afectaron la estabilidad del ácido fólico. Mientras que las diferencias observadas en la concentración de ácido fólico de harina y tostadas en términos de porcentajes de recuperación es solo del 10%, es decir la degradación del AF por efecto de la temperatura no llega al 50% por lo tanto podría ser benéfico adicionar AF a las harinas para la elaboración de tostadas incluso de frituras, ya que en la actualidad las harinas para frituras y tostadas no se fortifican con AF y ambos son productos de alto consumo, incluso se podrían considerar parte de la canasta básica del mexicano.

Por otra parte el método desarrollado para ácido fólico es el mejor indicador del proceso de dosificación (en el caso específico de Maseca) ya que para fines de control de calidad se debe de cumplir con cierto rango de especificación, contrario a otras vitaminas del complejo B que también se adicionan a la harina de maíz y las cuales se determinan por métodos que involucran la cuantificación de las vitaminas endógenas (propias de la matriz de la muestra) más las que se adicionan en proceso las cuales no proporcionan un dato real de las vitaminas que se adicionan a la harina de maíz.

En un futuro sería recomendable evaluar si el hierro (Fe^{2+}) tiene un efecto preservativo o degradativo sobre el ácido fólico, puesto que este mineral se encuentra en una gran concentración en la harina de maíz (30 mg/kg), ya que en algunas referencias se menciona que el Fe^{2+} puede estabilizar el ácido fólico, mientras que en otras se menciona el efecto opuesto (2). Entonces,

existe la posibilidad de que la estabilidad del ácido fólico durante la metodología de extracción además de atribuirse al ácido ascórbico también se podría atribuir al Fe^{2+} .

Posteriormente sería recomendable evaluar la robustez y el nivel de incertidumbre del método.

La principal ventaja de la metodología desarrollada por CLAR para cuantificar AF reside en el tiempo de análisis, en un solo día se pueden procesar 7 muestras (o más según el analista y la práctica), obteniendo el resultado en ese mismo día mientras, que en otros métodos cromatográficos se emplean hasta tres días por los tratamientos trienzima y no se diga en los microbiológicos en los cuales se requiere de toda una semana de análisis o más para obtener el resultado, además de que los métodos microbiológicos no diferencian el ácido fólico adicionado de los folatos endógenos.

El lote 1 mostró diferencias significativas con los lotes F-1, F-2 y F-3, mientras que los lotes F-1 y F-2 no mostraron diferencias significativas, pero ambos sí presentaron diferencias significativas con los lotes 1 y F-3, el lote F-3 mostró diferencias con los lotes 1, F-1 y F-2.

5.10.2 Pruebas de t-student en harina, tortillas y tostadas de maíz

Al comparar la concentración de AF de la harina de un mismo tipo y cada una de las harinas de diferente formulación con sus respectivas tortillas se observó que para el caso de la concentración de harina y tortillas del lote 1 no hay diferencias significativas entre varianzas, pero al realizar la prueba de t-student, sí se encontraron diferencias significativas entre las medias de los dos productos (ver TABLA XIX). En el caso de la concentración de harina y tortillas de la formulación 1, no se encontraron diferencias significativas entre varianzas, y según la prueba de t-student, el resultado indicó que entre la media de las concentraciones de AF no hay diferencias significativas (ver TABLA XX).

BIBLIOGRAFIA

1. Day Brian, Gregory III. Determination of folacin derivatives in selected foods by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, (29), 374 - 377, 1981.
2. Eitenmiller Ronald, Landen. W.O. Vitamin analysis for the health and food sciences, CRC press, Boca Raton London, chap. 11, 1999.
3. Gregory, J.F., III, Day, B.P.F., and Ristow, K.A., Comparison of high performance liquid chromatographic, radiometric, and *Lactobacillus casei* methods for the determination of folacin in selected foods. *J. Food Sci.*, (47), 1568, 1982.
4. Gregory, J.F., III, Sartain, D.B., and Day, B.P.F. Fluorometric determination of folacin in biological material using high performance liquid chromatography. *J. Nutr.*, (114), 341, 1984.
5. Hurtado, A. Soledad, Venciana. N.T., Púlido, I.M, Marine, F.A, Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr A.*, (778), 247-253, 1997.
6. Keller, H.E., Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feed, Hoffman-La roche. Basel, 30, 50, 1998.
7. Konings, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and fluor. *J. AOAC int.*, (82), 119 -127, 1999.
8. Norma Oficial Mexicana - 131- SSA1- 1995. Alimentos para lactantes y niños de corta edad.
9. Official Methods of Analysis AOAC 944.12, 16th ed., vol. II, 1997.
10. Osseyi, E.S., R.L. Wehling and J.A. Albrecht. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *J. Chrom. A.*, (826), 235 - 240, 1998.
11. Pfeiffer, C.M., L.M. Rogers, and J.F. Gregory, III. Determination of folate in cereal grain food products using tri-enzyme extraction and combined affinity and reversed - phase liquid chromatography. *J. Ag. Food Chem.*, (45), 407 - 413, 1997.
12. Rosado, L.J, Camacho, S.R, Bourges, H, Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Revista salud pública de México.*, (41), no. 2, 130 -137, 1999.
13. Seyoum, E. And J. Selhub. Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate. *J. Nutr. Biochem.*, (4), 488 - 494, 1993.
14. Stokes, P, Webb, K, Analysis of some folate monoglutamates by high performance liquid chromatography - mass spectrometry. I, *J. Liq. Chromatogr A.*, (864), 59 - 67, 1999.

15. Tamura, T.Y. Mizuno, J.W. Johnston, and R.A. Jacob. Food folate assay with proteasa, α -amylase and folate conjugase treatments. J. Agric. Food Chem., (45), 135 - 139, 1997.
16. Vahterisco, L. T., Olliainen, V., Koivistoinen, P.E., and Vara, p., Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamate and folic acid in food by high performance liquid chromatography, J. Agric. Food Chem., (44), 477, 1996.

APENDICES

APENDICE A
FORMULAS Y ECUACIONES

APÉNDICE A FORMULAS Y ECUACIONES

FORMULA 1

CÁLCULO DEL CONTENIDO DE AF EN HARINA DE MAÍZ Y PRODUCTOS DERIVADOS

$$[C_i (0.25)] 100 / P = \text{mg/kg de ácido fólico en la muestra}$$

C_i : Concentración de AF obtenida de la curva de calibración en $\mu\text{g} / \text{ml}$

P : Peso de la muestra en gramos

100 : Volumen de aforación del extracto

0.25 : Factor de dilución

FORMULA 2

CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE AF

$$\text{Porcentaje de recuperación} = C_2 (100) / C_1$$

C₂ : Concentración obtenida de AF obtenida de la curva de calibración

C₁ : Concentración conocida de AF

APÉNDICE A

ECUACIÓN 1

ECUACIÓN PARA DETERMINAR EL L.P.C PARA UN CV DEL 5%

1. Determinación de la ecuación de la recta que pasa por dos puntos (x_1, y_1) (x_2, y_2) considerando la parte lineal de la curva.

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{y - y_1}{x - x_1}$$

Despejando:

$$x - x_1 = \left[\frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} \right] [y - y_1]$$

Ecuación para determinar la concentración x a un CV del 5%

$$x = x_1 + \left[\frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} \right] [y - y_1]$$

2. Sustitución de los valores de x , y en la ecuación

$$x = 0.25 + \left[\frac{0.125 - 0.250}{6.20 - 1.93} \right] [y - 1.93]$$

$$x = 0.25 - [0.02927] [y - 1.93]$$

3. Sustitución del valor de y en la ecuación, donde $y = 5$

$$x = 0.3065 - 0.0293 y$$

$$x = 0.3065 - 0.0293 (5) = \mathbf{0.16}$$

$$\text{LPC} = 0.16 \text{ mg/kg} = 160 \text{ ng/ml}$$

APÉNDICE B
FIGURAS

APENDICE B FIGURAS

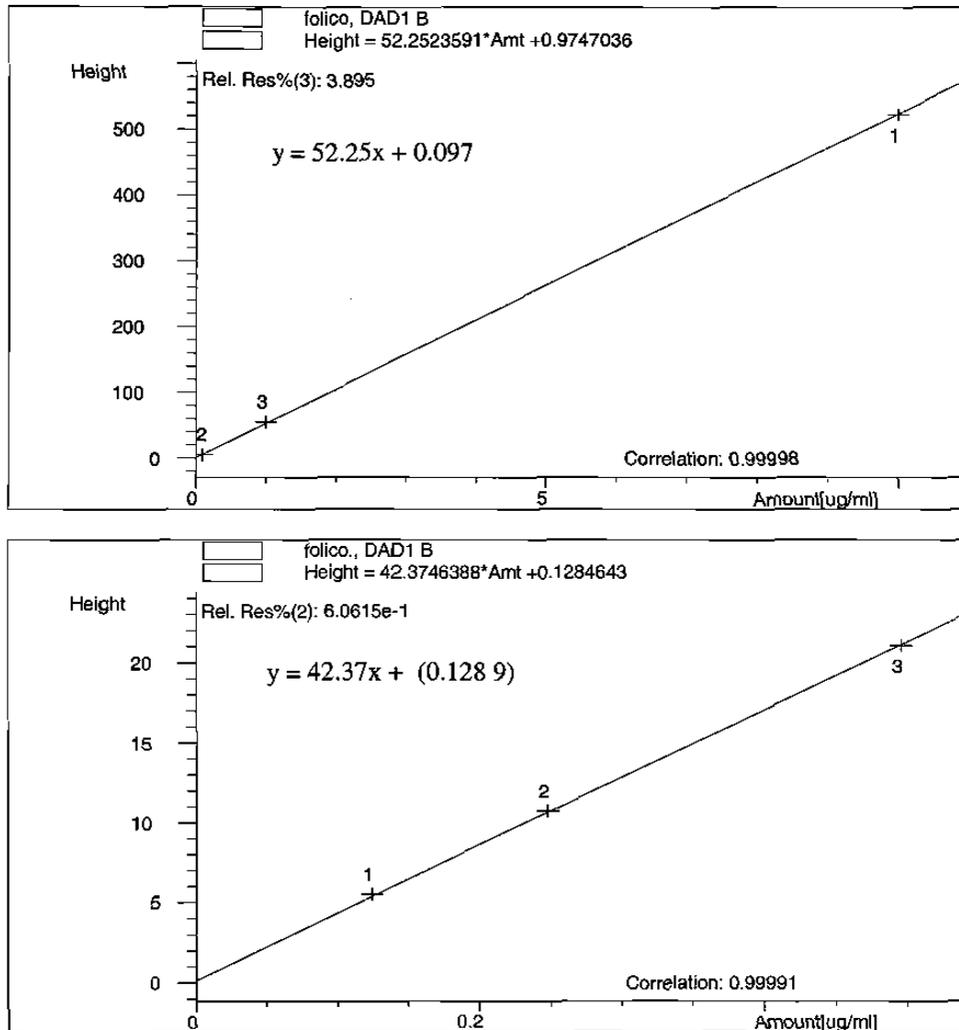


Figura 19. Curvas de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en los extractos purificados por SPE C18 y SAX. Nivel 1: 10.0 µg/ml; Nivel 2: 1.0 µg/ml; Nivel 3: 0.1 µg/ml (superior). Curva de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en los extractos purificados por SPE SAX. Nivel 1: 0.495 µg/ml; Nivel 2: 0.248 µg/ml; Nivel 3: 0.124 µg/ml (inferior).

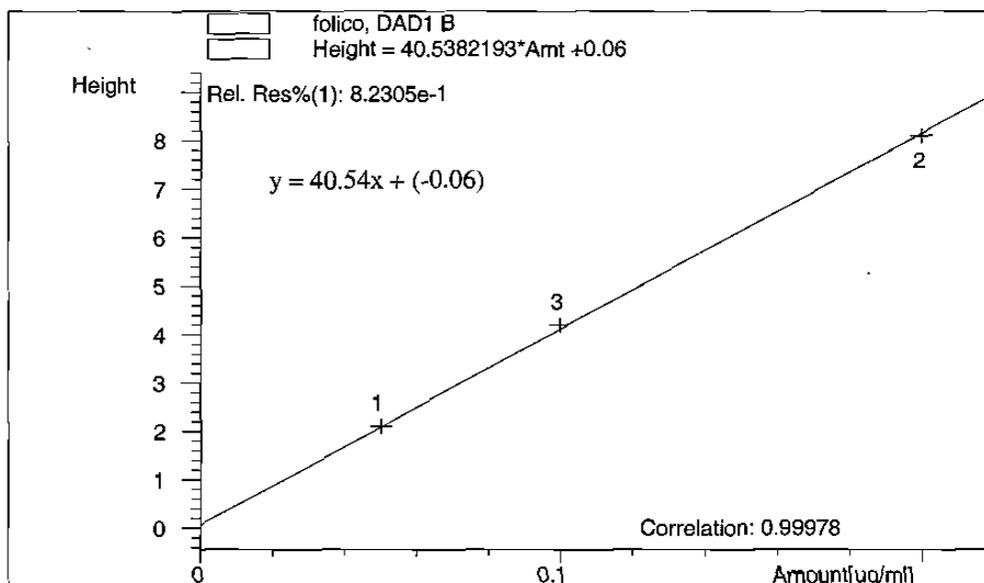
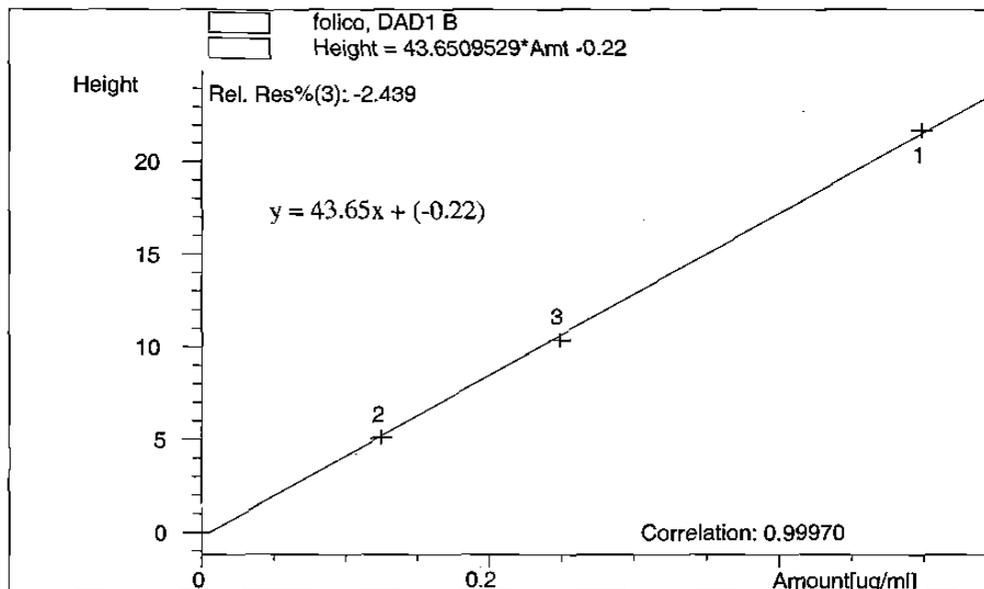


Figura 20. Curvas de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2a y 2b. Nivel 1: 0.498 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 2: 0.249 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 3: 0.125 $\mu\text{g/ml}$ (superior). Curva de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2b. Nivel 1: 0.0499 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 2: 0.1996 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 3: 0.0998 $\mu\text{g/ml}$ (inferior).

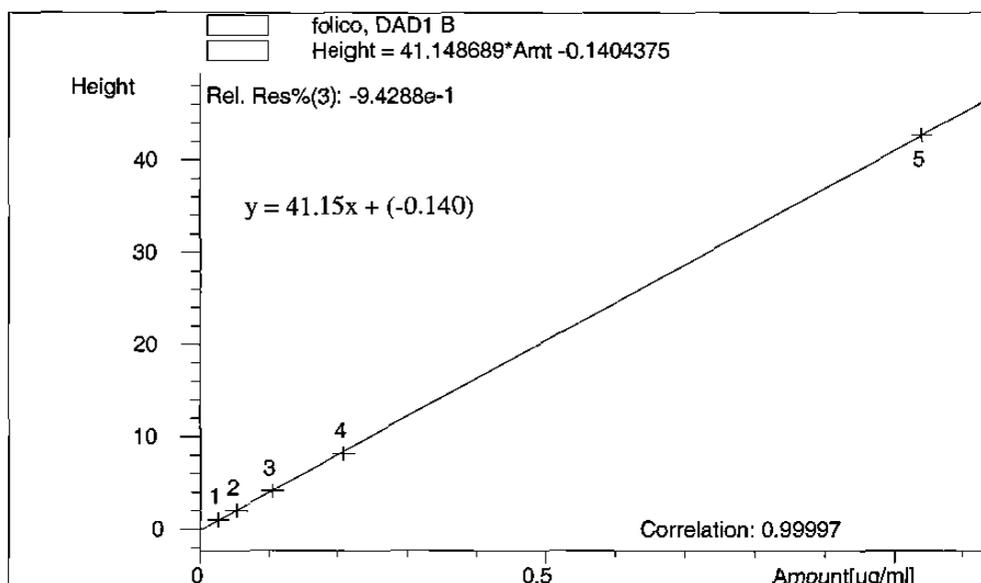
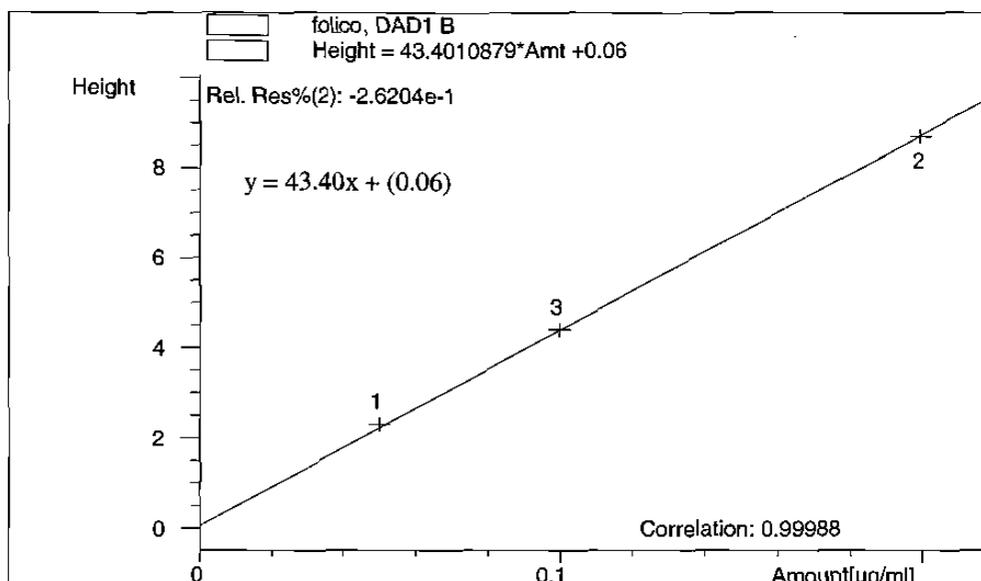


Figura 21. Curvas de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2c y 2d. Nivel 1: 0.0499 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 2: 0.1996 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 3: 0.0998 $\mu\text{g/ml}$ (superior). Curva de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2d. Análisis de las fracciones para el balance de materia. Nivel 1: 0.026 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 2: 0.052 $\mu\text{g/ml}$; Nivel 3: 0.104 $\mu\text{g/ml}$. Nivel 4: 0.208 $\mu\text{g/ml}$. Nivel 5: 1.040 $\mu\text{g/ml}$ (inferior).

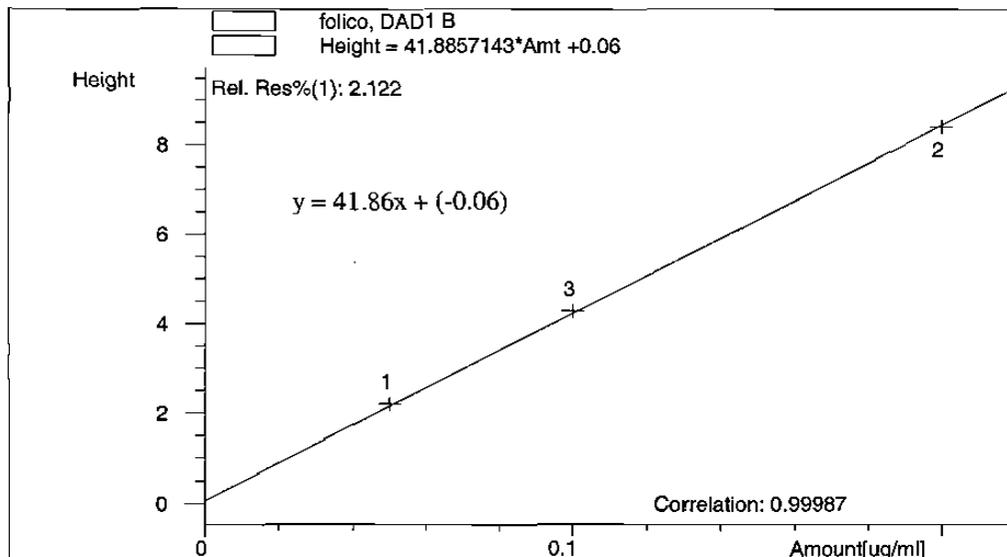
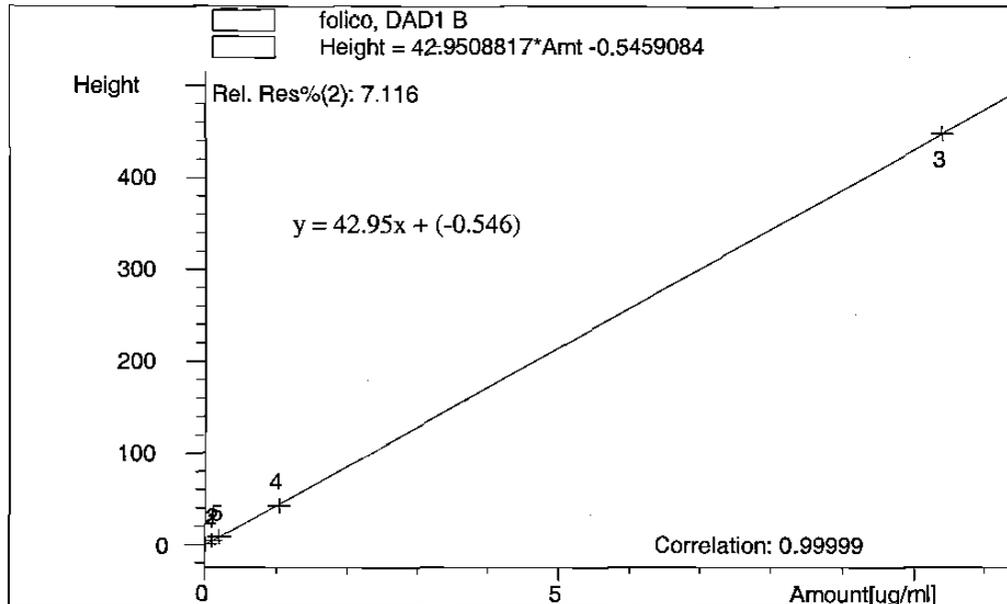


Figura 22. Curvas de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en el procedimiento-2d y por cromatografía de afinidad. Análisis de las fracciones para el balance de materia. Nivel 1: 0.0104 µg/ml; Nivel 2: 0.1040 µg/ml; Nivel 3: 10.4000 µg/ml. Nivel 4: 0.1.0400 µg/ml. Nivel 5: 0.2080 µg/ml (superior). Curva de calibración para determinar la concentración de ácido fólico en extractos purificados por afinidad. Nivel 1: 0.05 µg/ml; Nivel 2: 0.20 µg/ml; Nivel 3: 0.10 µg/ml (inferior).

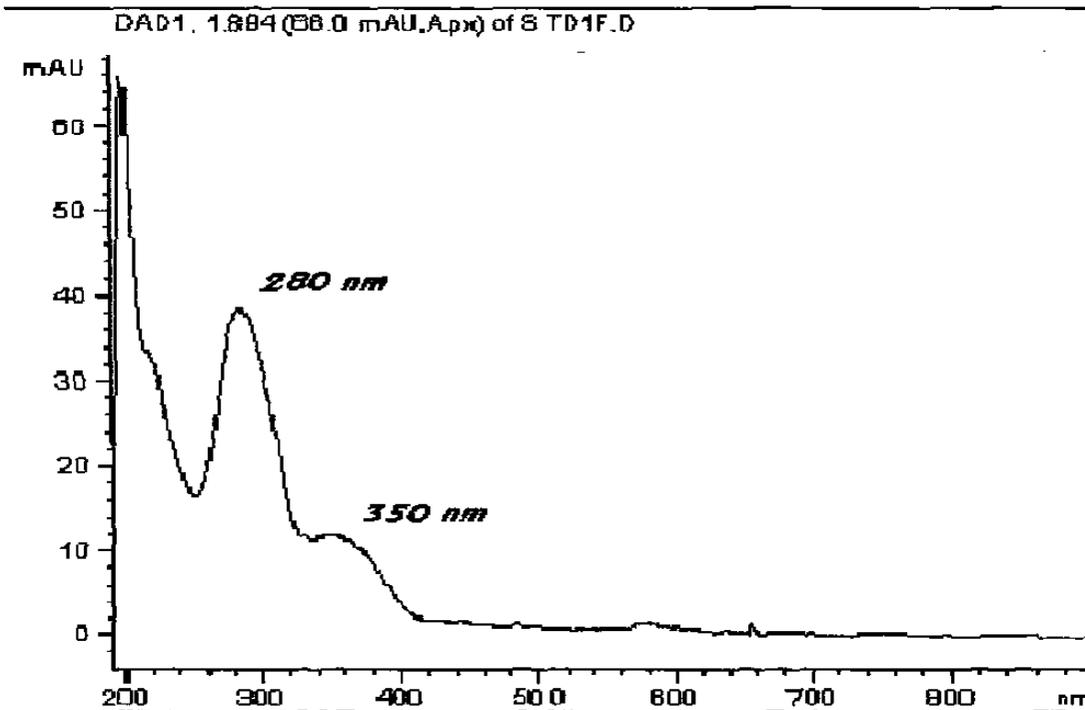


Figura 23. Espectro de absorción de ácido fólico. En Buffer de fosfatos 50 mM pH 6.8.



Figura 24. Fotografías de los sistemas SPE SAX y de afinidad. Sistema de extracción en fase sólida (SPE) SAX (superior). Sistema de purificación por cromatografía de afinidad (inferior).

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Carmen Julia Guerrero Quiroz

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Analítica

Tesis: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE MAÍZ VITAMINADA Y PRODUCTOS DERIVADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Campo de Estudio: Ciencias Químicas

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 25 de Octubre de 1973, hija de Juan Guerrero Gonzalez y Petra Quiroz Ramos (finada).

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 1996 con mención honorífica, primer lugar en la generación.

Experiencia Profesional: Analista Especializado y asistente en proyectos de investigación en la Empresa Constructora Industrial y Agropecuaria S.A. de C.V. (GRUMA) desde 1997.

