

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA LA DETERMINACION
DE ACIDO FOLICO EN CEREALES ENRIQUECIDOS

POR

Q.C.B. ADELINA ALEJANDRA HERNANDEZ HURTADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación Terminal
en Química Biomédica

Agosto, 2004

TM

TX548

.2

.L55

H4

2004

c.1

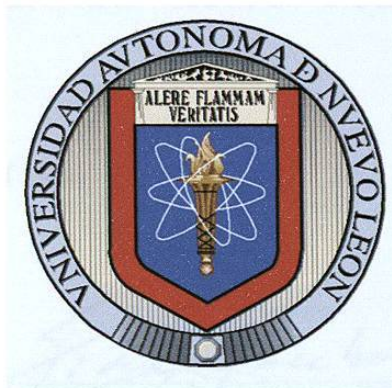
O.C.B. ADRIANA ALBERTA HERRERA HILBERTA ADDO



1080126002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO
FÓLICO EN CEREALES ENRIQUECIDOS

POR

Q.C.B. ADELINA ALEJANDRA HERNÁNDEZ HURTADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
Orientación Terminal en Química Biomédica

Agosto, 2004



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA
LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN CEREALES
ENRIQUECIDOS**


Aprobación de la Tesis:



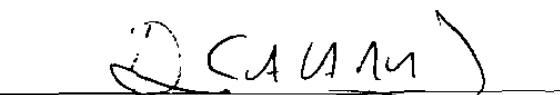
M.C. LIDIA RUJÍA NACCHA TORRES
Director de Tesis



M.C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA
Co-Director de Tesis



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO
FÓLICO EN CEREALES ENRIQUECIDOS

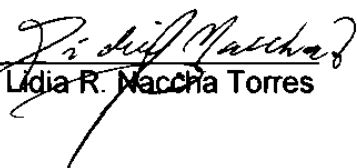
Presentado por:

Q.C.B. ADELINA ALEJANDRA HERNÁNDEZ HURTADO

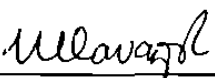
Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la M.C. Lidia R. Naccha Torres y la codirección de la M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha.

FIRMAS

DIRECTOR


M.C. Lidia R. Naccha Torres

CODIRECTOR


M.C. Norma C. Cavazos Rocha

Dedico esta tesis con gran amor

A mi esposo:

Ing. Jorge A. Quiroga Guerrero

Responsable directo de la finalización de este trabajo.

Por su apoyo incondicional, por ser mi compañero, sostén y comprensión de todos los días.

A la memoria de mi madre Profesora Candelaria Hurtado Gómez cuya ausencia siento cada día más.

A mi padre Sr. Pedro Hernández Páez por darme la educación necesaria para poder llegar hasta aquí.

Agradecimientos

Quisiera expresar aquí mi gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro me han facilitado el camino para la realización de éste trabajo.

Primeramente a Dios que puso los medios para entrar a la maestría, me dio la fortaleza espiritual y física.

A mis hermanos, verdaderos amigos, porque los aprecio y quiero, ya que son y serán siempre muy importantes en mi existencia.

A mis sobrinos a quienes deseo éxito en la vida y que logren satisfacciones perdurables.

A la directora de esta tesis M.C. Lidia Naccha Torres, quien me compartió su sabiduría de una manera agradable, apoyándome en todo momento y sobre todo por depositar su confianza en mí. Admiro su nobleza a la vez su firmeza.

A la co-directora de esta tesis M.C. Norma Cecilia Cavazos, porque sin sus conocimientos no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Admiro su calidad humana.

A la Dra. Noemí Waksman de Torres por permitirme avanzar en mis estudios y por haberme brindado su valiosa asesoría durante el desarrollo del presente trabajo. Es un ejemplo a seguir.

A mis compañeras de generación: Marcela, Alicia y Adriana, por su amistad y por sus oraciones.

A mis compañeras de trabajo Aurora y Rocío que además de compartirme sus conocimientos, supieron escucharme y me ayudaron a tomar las mejores decisiones.

A la TLC Marivel Esparza D. por su gran ayuda en la parte práctica y proporcionarme el material necesario para realizar mis experimentos.

A Víctor Torres, Gloria Molina, Gloria Martínez porque de algún modo me facilitaron el trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó para realizar este proyecto de tesis.

A todas aquellas personas que no mencioné pero que me apoyaron incondicionalmente para poder realizar un logro más en mi vida, mil gracias.

RESUMEN

Adelina Alejandra Hernández Hurtado

Fecha de graduación: Agosto del 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN CEREALES ENRIQUECIDOS

Número de páginas:71

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación terminal en Química Biomédica

Área de Estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio.

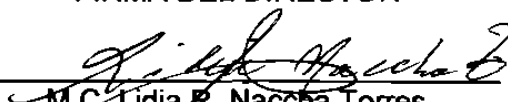
El ácido fólico es un nutriente clasificado entre las vitaminas del complejo B. Su deficiencia produce afecciones de la división celular y alteraciones en la síntesis proteica. Juega un papel importante a nivel mundial en los defectos del tubo neural (DTN). El método oficial para su determinación es el Microbiológico, a pesar de ser sensible, es muy laborioso y de muy baja reproducibilidad, por lo que surgió la necesidad de implementar un método analítico que permitiera la determinación de ácido fólico de una manera rápida, sencilla y confiable.

En el presente trabajo se desarrolló un método por HPLC para la cuantificación de ácido fólico en cereales enriquecidos, donde se probaron dos métodos de purificación de la muestra, se desarrolló el método de extracción y posteriormente se validó el método.

Contribuciones y Conclusiones:

Se cuenta con un método cromatográfico rápido, sencillo y preciso para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos. Se analizaron muestras comerciales de corn flakes de diferentes marcas y se obtuvieron resultados similares a los reportados en la etiqueta del producto. Las condiciones cromatográficas establecidas fueron: fase móvil ATF 0.1%:AcN 85:15, velocidad de flujo 1.4 mL/min, fase estacionaria columna fase inversa dC18 5µm X 4.6 X 150 mm, detección a 280 nm. La precisión del método fue menor del 15% y una recuperación de 62%.

FIRMA DEL DIRECTOR


M.C. Lidia R. Naccha Torres

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Vitaminas	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Clasificación	2
1.2 Ácido Fólico	2
1.2.1 Estructura química y derivados	2
1.2.2 Metabolismo	4
1.2.3 Función	4
1.2.4 Efectos y requerimientos	5
1.2.5 Fuentes	7
1.3 Fortificación o enriquecimiento de alimentos	8
1.3.1 Definiciones	8
1.3.2 Cereales	9
1.3.3 El ácido fólico como auxiliar para prevenir enfermedades	10
1.3.4 Legislación	10
1.4 Métodos para la determinación de ácido fólico	12
1.4.1 Método microbiológico	12
1.4.2 Métodos por CLAR	12
1.5 Descripción del problema	15
1.6 Objetivos	16
1.6.1 Objetivo general	16
1.6.2 Objetivos específicos	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1 Equipo, material y reactivos	17
2.1.1 Equipo	17
2.1.2 Materiales	18
2.1.3 Reactivos	19
2.1.4 Solventes	19
2.2 Establecimiento de las condiciones de análisis de ácido fólico por CLAR	20
2.2.1 Evaluación de parámetros cromatográficos	21
2.2.2 Validación del sistema	22
2.2.2.1 Linealidad	22
2.2.2.2 Precisión	24
2.2.2.3 Límite de detección	24
2.2.2.4 Límite de cuantificación	25

2.3 Desarrollo de un procedimiento para la extracción de ácido fólico en cereales	25
2.3.1 Tratamiento previo de la muestra	26
2.3.2 Purificación	26
2.3.3 Selección del método de extracción	27
2.4 Validación del método	27
2.4.1 Linealidad	27
2.4.2 Precisión	28
2.4.3 Exactitud	29
2.4.4 Estabilidad	30
2.4.5 Robustez	30
2.5 Aplicación del método desarrollado para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey	31
2.5.1 Selección de muestras	31
2.5.2 Procesamiento de las muestras	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Condiciones cromatográficas	33
3.1.1 Sistema 1	33
3.1.2 Sistema 2	35
3.2 Optimización de parámetros cromatográficos	37
3.3 Parámetros de validación del sistema	38
3.3.1 Precisión intradía	38
3.3.2 Precisión interdía	39
3.3.3 Linealidad	40
3.3.4 Límites de detección y cuantificación	42
3.4 Extracción y purificación de la muestra	43
3.4.1 Porcentajes de recuperación	46
3.5 Validación de l método desarrollado	48
3.5.1 Linealidad	48
3.5.2 Precisión	49
3.5.3 Exactitud	49
3.5.4 Estabilidad	50
3.5.5 Robustez	52
3.6 Niveles de ácido fólico en cereales enriquecidos	53
4. DISCUSIÓN	56
4.1 Condiciones cromatográficas	56
4.1.1 Cálculo de N	58
4.1.2 Selección del porcentaje de la fase móvil y velocidad de flujo	58

4.2 Tratamiento previo de la muestra y purificación	59
4.2.1 Análisis de una muestra virgen	59
4.2.2 Método de tratamiento previo de la muestra	59
4.2.3 Purificación	60
4.3 Validación	62
4.3.1 <i>Linealidad y límites de detección y</i> <i>cuantificación</i>	62
4.3.2 Precisión y exactitud	63
4.3.3 Estabilidad	64
4.3.4 Robustez	64
4.4 Niveles de ácido fólico	66
5. CONCLUSIONES	67
5.1 Conclusiones	67
BIBLIOGRAFÍA	69

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Niveles de nutrimentos en mg/Kg en harina de trigo	11
II	Niveles de nutrimentos en mg/Kg en maíz	11
III	Condiciones de CLAR usados en estudios comparativos	14
IV	Selección de condiciones cromatográficas para el análisis de ácido fólico	37
V	Resultados de la precisión intradía del estándar de ácido fólico de 1 ppm	38
VI	Resultados de la precisión interdía del estándar de ácido fólico de 1 ppm	39
VII	Coeficiente de variación de los factores de respuesta de las curvas de calibración de ácido fólico	41
VIII	Datos para calcular los límites de detección y cuantificación	42
IX	Límites de detección y cuantificación para el ácido fólico	43
X	<i>Comparación de los métodos de purificación</i>	46
XI	Resultados de la precisión del método para determinar ácido fólico	49
XII	Resultados de la exactitud del método para determinar ácido fólico	50
XIII	Cambios en el proceso de extracción para evaluar la robustez del método	52
XIV	Cambios en el proceso de cuantificación para evaluar la robustez del método	53
XV	Niveles de ácido fólico en cereales enriquecidos	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fórmula estructural del ácido fólico	2
2	Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/min y detección a 280 nm.	34
3	Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/min y detección a 280 nm.	34
4	Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/min y detección a 280 nm.	35
5	Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil ácido trifluoroacético 0.1% : acetonitrilo (85:15), fase estacionaria columna de fase inversa Atlantis dC18 5 µm de diámetro de partícula 4.6 X 150 mm, flujo 1.4 mL/min y detección a 280 nm.	36
6	Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil ácido trifluoroacético 0.1% : acetonitrilo (85:15), fase estacionaria columna de fase inversa Atlantis dC18 5 µm de diámetro de partícula 4.6 X 150 mm, flujo 1.4 mL/min y detección a 280 nm.	36
7	Curva de calibración de ácido fólico, área vs concentración.	40
8	Cromatograma de la muestra virgen eluída a pH de 4.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.	43
9	Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico eluída a pH de 4.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas	44
10	Cromatograma de la muestra virgen eluída a pH de 2.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.	44
11	Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico eluída a pH de 2.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.	45

12	Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico 1 ppm con una filtración como método de purificación bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.	45
13	Curva de calibración de ácido fólico. Área vs concentración.	48
14	Curva de valoración para la estabilidad del estándar de ácido fólico.	51
15	Cromatograma para demostrar la estabilidad de las muestras fortificadas	51
16	Cromatograma de una muestra de cereal de corn flakes de Kellog's lote B1. Pico cromatográfico correspondiente al ácido fólico con un tiempo de retención de 2.997 min.	55

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura

AcN	Acetonitrilo
°C	Grados centígrados
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de Variación
D	Dalton
DHF	Dihidrofolato
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
FA	Factor de Asimetría
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
FI-THF	N-5 formiiminotetrahidrofolato
FM	Fase móvil
FR	Factor de Respuesta
F-THF	N-10 formiltetrahidrofolato
g	Gramo
g/mL	Gramo por mililitro
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HK	Enzima de riñón de cerdo
HP	Plasma humano liofilizado
ICH	Comité Internacional de Armonización
k'	Factor de capacidad

M	Molaridad
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	milímetro
N	Número de platos teóricos
n	Tamaño de muestra
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
R²	Coefficiente de correlación lineal
SAX	Intercambio aniónico fuerte
SD	Desviación estándar
TBA	Tetra butil amonio
THF	Tetrahidrofolato
to	Tiempo muerto
tr	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
w	Ancho de base de pico
\bar{X}	Promedio
μm	Micrómetro
μL	Microlitro

λ

Longitud de onda

5-Me-THF

N-5 metiltetrahidrofolato

5,10-CH₂-THF

Ácido 5,10 metilentetrahidrofólico

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Vitaminas

1.1.1 Definición

La nutrición es un importante factor en la salud, es la causa y tratamiento de varias enfermedades. El hombre requiere en su dieta de varias moléculas orgánicas complejas y varios minerales inorgánicos. Existen seis categorías de nutrientes: agua, minerales, proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (menos de 1550 D), no pueden ser sintetizadas por el hombre o sólo lo son en cantidades insuficientes. Estos compuestos son importantes porque tienen un papel central en el metabolismo. Para mantener una salud óptima, deben ser adquiridas de una fuente exógena.

1.1.2 Clasificación

Las vitaminas se dividen en dos grupos: hidrosolubles y liposolubles; las liposolubles son las vitaminas A, D, E, y K; las hidrosolubles son las vitaminas B1 o tiamina, B2 o riboflavina, B3 o niacina, B5 o pantotenato, B6 o piridoxina, B9 o ácido fólico, B12 o cianocobalamina, la vitamina C y la biotina. (1)

1.2 Ácido Fólico

1.2.1 Estructura química y derivados

El ácido fólico o pteroilglutámico es un nutriente clasificado entre las vitaminas del complejo B. Está formado por una pteridina consistente en un núcleo nitrogenado de dos anillos, un ácido p-aminobenzoico y un ácido glutámico. (2) Figura 1

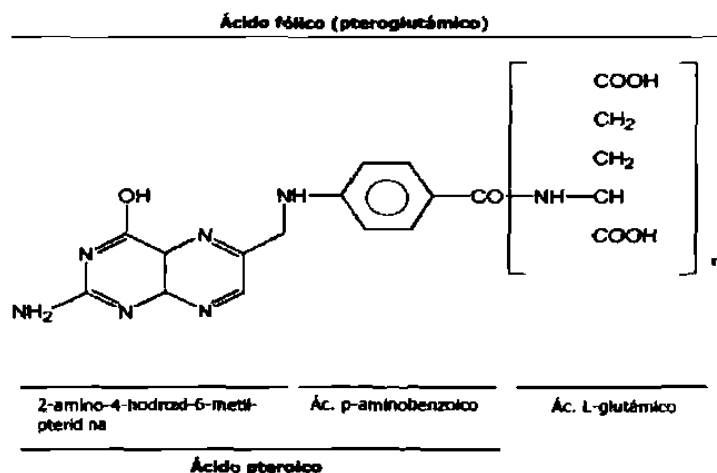


Figura 1. Fórmula estructural del ácido fólico.

Las vitaminas interrelacionadas varían solamente en el número de glutamatos, y los más frecuentes son los que contienen 3 y 7 residuos. Los glutamatos están unidos entre sí por enlaces peptídicos, que deben ser hidrolizados para llevar la estructura hasta folato libre, forma en que se absorben las vitaminas de este grupo. En el ser humano, la hidrólisis se lleva a cabo por la acción de la conjugasa, una enzima de la mucosa intestinal que cumple numerosas funciones en el organismo. (3)

Los análogos estructurales del ácido fólico son los compuestos metabólicamente activos referidos como folatos. Los folatos son poliglutamatos del ácido pterico, que exhiben actividad biológica similar a la del ácido fólico. La palabra folato deriva del latín "folium" que significa hoja. Lucy Wills identificó el folato como un nutriente necesario para prevenir la anemia de las mujeres embarazadas; demostró que la anemia podía ser corregida con un extracto de levadura. El folato fue identificado como una sustancia constituyente del extracto de levadura en los años 30s y fue extraído de las hojas de las espinacas en 1941. Se pueden encontrar hasta ocho residuos de glutamato en estos compuestos que existen naturalmente. Dentro de los folatos se encuentran el ácido fólico o pteroilmonoglutamato, el dihidrofolato (DHF), el tetrahydrofolato (THF), el N-5-metiltetrahydrofolato (5-Me-THF), el ácido 5,10-metilentetrahydrofólico (5,10-CH₂-THF), el ácido hidroximetiltetrahydrofólico, el N-5-formiliminotetrahydrofolato (FI-THF) y el N-10-formiltetrahydrofolato (F-THF, ácido folínico). (4)

1.2.2 Metabolismo.

Los poliglutamatos de folatos que existen en la naturaleza se hidrolizan a monoglutamatos antes de su absorción (la cual tiene lugar principalmente en el yeyuno proximal), por las células de la mucosa intestinal. Después de esto, el folato entra al hígado a través de la circulación porta. El hígado convierte algunos de estos monoglutamatos de folato a poliglutamatos, los que probablemente son luego almacenados; otra fracción del folato se excreta en la bilis como 5-Me-THF, el cual es reabsorbido y es la forma circulante principal de folato; en la forma de monoglutamato, entra rápidamente al plexus coroideo y al líquido cefalorraquídeo (LCR). El ácido fólico es transportado rápidamente desde el LCR hasta el plasma. Se ha identificado una proteína fijadora de folato en el plexus coroideo, probablemente responsable de la alta relación LCR/plasma. El catabolismo del folato involucra ruptura del anillo de pterina, seguido de acetilación para formar el producto excretado, ácido p-acetamidobenzoilglutámico. (4)

1.2.3 Función

Los folatos funcionan metabólicamente como coenzimas que participan en diversas reacciones de transferencia de un carbono, incluyendo síntesis de purina, así como interconversiones de aminoácidos. Los folatos son esenciales en muchos procesos celulares incluyendo la síntesis de DNA y replicación celular. El folato y la vitamina B12 están muy relacionados metabólicamente. (5)

1.2.4 Efectos y requerimientos.

La deficiencia de folato produce alteraciones en la división celular y en la síntesis proteica. Esta deficiencia es frecuente, y se observa en diversas afecciones clínicas. Muchos fármacos anticonvulsivos que se emplean para tratar la epilepsia conducen al desarrollo de deficiencias de folato. Está demostrado que *otros fármacos interfieren en el metabolismo del folato, entre los que se cuenta la sulfosalacina, isoniacida y cicloserina, para el tratamiento de la tuberculosis, y los anticonceptivos orales.* (5)

Existen evidencias epidemiológicas que sugieren que la homocisteína elevada en plasma es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares; una alta ingesta de ácido fólico reduce los niveles de homocisteína. (5,6)

Otros ejemplos sobre un gran requerimiento de folatos incluyen las anemias hemolíticas, deficiencia de hierro, premadurez y mieloma múltiple. Los pacientes que reciben tratamiento de diálisis pierden folato rápidamente. La deficiencia de folato debido a una mala absorción da lugar a enfermedad celíaca, enfermedades inflamatorias del intestino, paro cardíaco e infecciones bacterianas sistémicas. Tanto las condiciones ácidas como las básicas pueden interferir con el transporte intestinal; los aniones orgánicos que se acumulan en la uremia también alteran la absorción del folato. Se han reportado alteraciones genéticas en la mayoría de las enzimas que interconvierten el folato. Se han descrito algunos casos de niños mentalmente retardados, incapaces de transferir folatos de la

sangre al LCR; esto se debe probablemente a sistemas anormales de unión a transportadores de folato en el sistema nervioso central. (7)

Otro hallazgo reciente es que el ácido fólico, conjuntamente con el cinc, ayuda a mejorar la cantidad y calidad de los espermatozoides en el semen de hombres que padecen de problemas de infertilidad. Además, el ácido fólico puede ser útil para aumentar la respuesta de los medicamentos antidepresivos como Prozac y Paxil. (7)

Los folatos juegan un papel importante en los defectos del tubo neural. Expertos han hecho énfasis en la necesidad de ingerir ácido fólico durante el embarazo ya que los defectos en el sistema neurológico del bebé se desarrollan durante las primeras semanas. (8)

Los defectos del tubo neural (DTN) anencefalia, espina bífida y encefalocele son un problema de salud pública en el ámbito mundial. México ocupa el segundo lugar en incidencia, con una tasa de 36 por 10 000 nacidos vivos, precedido solamente por China. (9)

En Nuevo León, estas malformaciones son una causa muy importante de mortalidad y morbilidad infantil. De 1994 a 1998, la tasa promedio de mortalidad por DTN observada en menores de un año fue de 9.0 por 10 000. En 1997, se presentaron en Nuevo León 73 casos de defunción por DTN en menores de un año, de los cuales 56 fueron anencefalia y 17 espina bífida. (9)

Estos defectos han sido asociados a la deficiencia de ácido fólico y se consideran dentro de los defectos congénitos que se pueden prevenir. En varios países se han desarrollado diversas estrategias para llevar a cabo una reducción de dichos defectos con la ingesta o administración de ácido fólico. Estas estrategias han consistido en fomentar una dieta bien balanceada, incrementar el consumo de alimentos ricos en ácido fólico y fortificar harinas y cereales con esta vitamina. (9)

Las necesidades diarias de folatos son de 0.400 miligramos diarios. En el embarazo, las necesidades aumentan hasta 0.800 miligramos diarios.

Las personas que padecen de epilepsia no deben ingerir dosis mayores a los 4000 microgramos ya que existe la posibilidad de que pueden provocar un aumento en la actividad convulsiva. Además, una dosis por arriba de 1000 microgramos diarios puede enmascarar una anemia por deficiencia de vitamina B12. (7)

1.2.5 Fuentes

Algunas de las principales fuentes alimentarias de ácido fólico son los vegetales de hojas verdes, el hígado, los granos integrales, los cítricos, las nueces, las legumbres y la levadura de cerveza. Algunas sustancias interfieren con la absorción y utilización del ácido fólico, entre las que destacan el alcohol,

los estrógenos, medicamentos anticonvulsivantes y algunas drogas utilizadas en la quimioterapia.

Otro dato importante es que el ácido fólico se destruye con el calor, por lo que al cocinar los alimentos más tiempo de lo necesario se reduce la cantidad de éste. Los alimentos que se almacenan a temperatura ambiente durante mucho tiempo también pierden gran parte del ácido fólico. (6,7)

1.3 Fortificación o enriquecimiento de alimentos.

1.3.1 Definiciones

Estos dos términos, aunque con matices diferentes, se emplean generalmente como sinónimos y se utilizan indistintamente para indicar que un alimento o producto alimenticio se le han añadido algunos nutrientes, especialmente vitaminas o minerales, para restaurar o aumentar su valor nutricional. (10)

Algunos procesos tecnológicos, como el refinado de las harinas y de los cereales en general, provocan importantes pérdidas de minerales y vitaminas con respecto al contenido del grano entero. También la eliminación de la grasa de muchos alimentos para reducir su valor calórico, conlleva la pérdida de las vitaminas liposolubles, como la A o la D. Por ello mediante el enriquecimiento se

restauran o incluso se superan los niveles iniciales de los nutrientes perdidos durante la manipulación de los alimentos. El término fortificación, sin embargo, se aplicaría a aquellas situaciones en las que se añade un determinado nutriente a un alimento que originalmente carecía de él. La adición de yodo a la sal de mesa sería un buen ejemplo de fortificación. (11)

Un aspecto importante en la fortificación es elegir el alimento idóneo y los nutrientes a añadir. Respecto al primero, aparte de tomar en cuenta los problemas que pueden surgir desde el punto de vista tecnológico, es imprescindible que el alimento escogido forme parte de los hábitos alimentarios del grupo al que va destinado. Por ejemplo, un alimento muy útil para añadir vitaminas liposolubles es la margarina. Sin embargo, en los grupos de población en los que no se consuma habitualmente, la fortificación de la margarina puede ser totalmente ineficaz. Por el contrario, la leche sería un alimento ideal para fortificar con ciertos nutrientes, especialmente aquellos dirigidos a los niños.

1.3.2 Cereales

Los cereales desempeñan un papel predominante en el aporte de nutrientes a la población; constituyen la principal fuente de energía y por ende son la base de la alimentación. Se utilizan ampliamente como vehículo de vitaminas hidrosolubles. (10,11)

1.3.3 El ácido fólico como auxiliar para prevenir enfermedades.

En condiciones normales nutricionales las personas ingieren cantidades suficientes de ácido fólico para sus necesidades. Sin embargo, en años recientes se ha hecho evidente que es importante que la mujer que planifica quedar embarazada o ya lo está, ingiera una cantidad mayor de ácido fólico (800 microgramos al día). Esto se ha asegurado a través de la fortificación o enriquecimiento de productos alimenticios como granos, pan, pastas, arroz, harina y cereales. (4,5,6)

Debido a la incertidumbre de los niveles de varios folatos y a la conocida inestabilidad de muchas formas de éstos bajo las condiciones del proceso térmico, los productos como las fórmulas infantiles son fortificados con una forma sencilla y estable de la vitamina para alcanzar los niveles regulatorios y nutricionales. El ácido fólico es una de las vitaminas de elección para los productos fortificados. Las comidas fortificadas contienen una forma sintética de ácido fólico que es más fácil de absorber por el cuerpo.

1.3.4 Legislación

En 1996 la FDA (Administración de Alimentos y Drogas), organismo encargado del control de medicinas y alimentos en Estados Unidos, ordenó la

adición de ácido fólico en ciertas harinas incluyendo las más enriquecidas: pan, granos, arroz, comidas de maíz y diversas pastas. (10)

Los niveles que se recomienda para la adición de vitaminas y minerales a las harinas de trigo y maíz en México se muestran en las tablas I y II. (12)

Nutrientes	Nivel mínimo	Nivel recomendado	Nivel máximo
Riboflavina	2.4	3.0	5.0
Niacina	28	35	45
Ácido Fólico	1.6	2.0	3.2
Hierro	24	30	40

Tabla I. Niveles de nutrimentos en mg/Kg en harina de trigo.

Nutrientes	Nivel mínimo	Nivel recomendado	Nivel máximo
Riboflavina	2.4	3.0	5.0
Niacina	28	35	45
Ácido Fólico	0.4	0.5	0.8
Hierro	24	30	40

Tabla II. Niveles de nutrimentos en mg/Kg en maíz.

1.4 Métodos para la determinación de ácido fólico.

1.4.1 Método microbiológico

El método oficial para la determinación de ácido fólico es el microbiológico. (12). Este ensayo está basado en la medición del crecimiento del microorganismo *Lactobacillus casei*, el cual requiere ácido metiltetrahidrofólico para su desarrollo. El crecimiento del microorganismo está directamente relacionado con la concentración de folato en la muestra y es monitoreado por medición de la turbidez de la solución de crecimiento. (13)

Aunque el ensayo microbiológico es altamente sensible, es tardado, laborioso y de reproducibilidad no consistente. La respuesta en el crecimiento del microorganismo varía dependiendo de las diferentes formas de folato. Además, ciertos compuestos del mismo alimento pueden estimular o inhibir el crecimiento bacteriano, dando resultados no confiables. Por esta razón, el método microbiológico es un método no deseable para el análisis de ácido fólico. (14-17)

1.4.2 Métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Se han reportado numerosos artículos acerca de la determinación de ácido fólico y folatos en diferentes alimentos por Cromatografía de Líquidos de Alta

Resolución; en ellos los resultados demuestran que el método asegura la separación y determinación de ácido fólico y de los diferentes tipos de folatos. (18-23)

En la tabla III se presenta los resultados de un estudio Inter-laboratorio para la determinación de ácido fólico en donde se muestra que, en general, todos los métodos llevan a cabo un proceso de extracción, purificación y análisis; sin embargo cada uno de ellos emplea diferentes condiciones de trabajo.

Los resultados de precisión reportados, demuestran que la variación tanto intralaboratorio como interlaboratorio, para la determinación de folato, es menor cuando se emplea Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que cuando se emplea el método Microbiológico. (24)

	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3
Extracción	Buffer de acetatos HK	Buffer de fosfatos HK-HP	Buffer de acetatos HK-HP
Purificación	SAX Sephadex A25	SAX Merck	Filtro 0.45 μ m
Columna	C18	Merck RP-18	ODS Hypersil
Fase Móvil	$\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}$ 90 :10	$\text{H}_3\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ 86.5:11:2.5	$\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 70:30

Tabla III. Condiciones de CLAR usados en estudios comparativos

1.5 Descripción del problema

La necesidad de métodos analíticos rápidos para la cuantificación de vitaminas en alimentos fortificados es cada vez mayor, debido al incremento del proceso de fortificación y al énfasis en la información nutricional que deben mostrar los alimentos enriquecidos con ácido fólico.

Debido a la importancia clínica del Ácido Fólico y dadas las bondades que ofrece el método de CLAR, consideramos importante implementar en nuestro medio un método analítico alternativo al microbiológico que permita la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos de una manera rápida, sencilla y confiable.

1.6 Objetivos

Por lo anterior, el presente trabajo se llevó a cabo bajo el siguiente objetivo:

1.6.1 Objetivo general

Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos.

1.6.2 Objetivos específicos

1.-Desarrollar un método de análisis de ácido fólico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

2.-Desarrollar un método de extracción de ácido fólico en cereales enriquecidos.

3.- Validar el método analítico desarrollado.

4.- Aplicar el método desarrollado para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Equipo, material y reactivos

2.1.1 Equipo

- a) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters 2690 con Detector UV-Visible 996 con arreglo de diodos.
- b) Baño de agua con control de temperatura CRAFT.
- c) Potenciómetro Beckman 61
- d) Balanza analítica Sartorius modelo BA-1105
- e) Bomba de vacío Gast Emerson
- f) Placa de agitación.

2.1.2 Materiales

- a) **Cartuchos SAX Strata SAX (55 μ m, 70 $^{\circ}$)**
- b) **Columna fase reversa ODS Beckman 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6mm x 150 mm**
- c) **Columna fase reversa dC₁₈ Atlantis 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 x 150 mm**
- d) **Sistema de filtración Millipore**
- e) **Pipeta automática de 10 a 100 μ L y puntillas**
- f) **Pipeta automática de 100 a 1000 μ L y puntillas**
- g) **Matraces de aforación de 10, 50, 100, 250 y de 1000 mL**
- h) **Tubos de ensaye de 13 X 100 mm**
- i) **Agitadores de vidrio**
- j) **Vasos de precipitado de 10, 50, 150, 250 y 400 mL**
- k) **Matraces Erlenmeyer de 250 mL**
- l) **Papel parafilm**
- m) **Barras magnéticas**
- n) **Papel filtro Whatman No. 40 de 7 cm de diámetro**
- o) **Mortero y pistilo de porcelana**
- p) **Pipetas lineales de 10 mL**
- q) **Filtros para solventes Millipore GV 0.22 μ m**
- r) **Filtros para agua Millipore HA 0.45 μ m**
- s) **Termómetro**
- t) **Embudos de filtración**

- u) Espátulas
- v) Guarda columna Sentry Guard Holder Universal 50 x 75 mm

2.1.3 Reactivos

- a) Estándar de ácido fólico Sigma
- b) Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4)
- c) Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4)
- d) Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- e) Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) al 5%
- f) Fosfato de tetra butil amonio Backer Analyzed grado HPLC (TBA)
- g) Ácido ascórbico al 0.05%
- h) Ácido trifluoroacético al 0.1%
- i) Enzima alfa amilasa Sigma 250,000 U
- j) Acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 0.1M

2.1.4 Solventes

- a) Metanol (MeOH) grado HPLC
- b) Acetonitrilo (AcN) grado HPLC
- c) Hexano

2.2 Establecimiento de las condiciones de análisis de ácido fólico por CLAR

Para el establecimiento de las diferentes condiciones de análisis cromatográfico se trabajó con el estándar de ácido fólico de 1 ppm y se probaron dos sistemas:

Sistema 1.

- ❖ **Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución**
- ❖ **Detector UV-Vis con arreglo de diodos a una λ de 280 nm.**
- ❖ **Columna de fase inversa ODS Beckman de dimensiones 4.6 mm x 150 mm y 5 μ m de diámetro de partícula**
- ❖ **Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M en una relación 24:76**
- ❖ **Elución isocrática**
- ❖ **Velocidad de flujo de 1 mL/min.**
- ❖ **Volumen de inyección 10 μ L.**

Sistema 2.

- ❖ **Columna de fase inversa Atlantis dC18 dimensiones 4.6 x 150 mm y 5 μ m de diámetro de partícula**

- ❖ Fase móvil ácido trifluoroacético 0.1%:acetonitrilo relación 85:15
- ❖ Elución isocrática
- ❖ Velocidad de flujo de 1.4 mL/min.
- ❖ Volumen de inyección 10µL.
- ❖ Detección a 280 nm.

Se hicieron cambios en la composición de la fase móvil y en la velocidad de flujo y se inyectó el estándar de ácido fólico en cinco ocasiones bajo las diferentes condiciones de ensayo. Los porcentajes de la fase móvil que se probaron fueron: 83:17, 85:15, 87:13 de ATF 0.1% : AcN respectivamente, cada uno de ellos a tres diferentes velocidades de flujo: 1.2, 1.4 y 1.6 mL/min.

2.2.1 Evaluación de parámetros cromatográficos.

Para seleccionar las mejores condiciones de análisis se evaluaron los siguientes parámetros: el Número de Platos Teóricos (N), el Factor de capacidad (k') y el Factor de Asimetría (FA), los cuales fueron calculados a partir de los cromatogramas obtenidos por medio de las siguientes ecuaciones: (22)

$$N= 16 (tr/w)^2 \quad \text{(ecuación 1)}$$

donde:

tr= tiempo de retención en minutos.

w= ancho de base en minutos.

$$k' = (tr - to)/to \quad \text{(ecuación 2)}$$

donde:

to= tiempo muerto.

tr= tiempo de retención.

$$FA = A/B \quad \text{(ecuación 3)}$$

donde:

A= distancia medida en la base, del inicio al centro del pico

B= distancia medida en la base, del centro al final del pico

2.2.2 Validación del sistema

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas se validó el sistema con los siguientes parámetros:

2.2.2.1 Linealidad.

Para establecer la linealidad del sistema desarrollado se empleó el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta.

Se prepararon estándares de ácido fólico en la fase móvil seleccionada en el rango de 0.1 a 4.0 ppm para la elaboración de una curva de calibración, se graficó la respuesta del detector en función de la concentración. Se calcularon los factores de respuesta (FR) para cada uno de los puntos de la curva empleando la ecuación: (25-28)

$$FR = \text{respuesta del detector} / \text{concentración del estándar.} \quad (\text{ecuación 4})$$

Para nuestro caso la respuesta del detector correspondió al área del pico. Una vez obtenidos los factores de respuesta en cada uno de los puntos de la curva de calibración se calculó el coeficiente de variación (CV) con la ecuación:

$$CV = (SD \times 100) / \bar{X} \quad (\text{ecuación 5})$$

donde:

CV= es el porcentaje del coeficiente de variación

SD= desviación estándar de los factores de respuesta calculados empleando el programa Microsoft excel.

\bar{X} = promedio de los factores de respuesta.

2.2.2.2 Precisión

Para evaluar la precisión del sistema se empleó un estándar de 1 ppm, el cual se inyectó y analizó bajo las condiciones cromatográficas previamente seleccionadas, en cinco ocasiones consecutivas y en tres días diferentes.

De los cromatogramas obtenidos se tomaron los datos de tiempo de retención y área del pico cromatográfico.

Con los 15 datos obtenidos tanto del tiempo de retención como del área del pico se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación haciendo uso del programa Microsoft excel.

2.2.2.3 Límite de detección.

El límite de detección del método desarrollado se determinó basándonos en el método descrito por Quatrocchi (22) y que consiste en considerar tres desviaciones estándar del blanco, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de detección} = Y_{bl} + 3 (S_{bl} / b) \quad (\text{ecuación 6})$$

donde:

b= pendiente de la curva de calibración (área vs concentración)

Y_{bl} = respuesta del blanco, estimada por extrapolación de la respuesta a concentración cero en la curva de calibración obtenida a concentraciones bajas.

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta del blanco. (Y_{bl})

2.2.2.4 Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación se obtuvo considerando 10 veces la desviación estándar del blanco; se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación} = Y_{bl} + 10 (S_{bl} / b) \quad (\text{ecuación 7})$$

2.3 Desarrollo de un procedimiento para la extracción de ácido fólico en cereales.

Antes de empezar a trabajar con las muestras comerciales, se procedió a analizar una muestra de cereal no fortificada a la que le llamamos virgen, para conocer la presencia o ausencia de ácido fólico. Ésta fue proporcionada por la empresa Kellogg's, y se almacenó en un recipiente metálico de tapa hermética, para evitar la humedad y el contacto con la luz.

El desarrollo del procedimiento para la extracción de ácido fólico en cereales se llevó a cabo en dos etapas: la primera consistió en el tratamiento previo de la muestra y la segunda correspondió al proceso de purificación.

2.3.1 Tratamiento previo de la muestra

El método consistió en homogenizar 2 g de la muestra en 45 mL de K_2HPO_4 0.1M a un pH entre 8 y 9, y llevar a agitación constante por espacio de 1 hora. Después de la hora se ajustó a un pH de 7 para poder llevar a cabo la digestión enzimática, para lo cual se adicionó 1mL de la enzima alfa amilasa (a una concentración de 25 mg/mL) por cada gramo de muestra en un baño de agua a 65 °C por 1 hora. Después de la hora se inactivó la enzima elevando la temperatura a 90°C, se enfrió la muestra y se aforó a 50 mL con buffer de fosfatos, posteriormente se filtró con papel filtro Watman No. 40. (29)

2.3.2 Purificación

Los filtrados obtenidos del tratamiento previo de la muestra fueron sometidos a una extracción en fase sólida empleando cartuchos SAX de intercambio aniónico fuerte. El proceso consistió en activar los cartuchos con 3mL de hexano seguido de 3mL de metanol y 5 mL de K_2HPO_4 0.1M a un pH de 7. Posteriormente se pasaron 4 mL del filtrado por el cartucho a un flujo de 0.3 mL/min; finalmente se eluyó el ácido fólico del cartucho con 4 mL de una mezcla de acetato de sodio 0.1M (pH 4.5), Na_2HPO_4 5%(p/v) y 0.05% de ácido ascórbico. (29,30)

2.3.3 Selección del método de extracción

Los extractos purificados fueron analizados por CLAR con las condiciones establecidas durante el desarrollo y optimización del método; los parámetros evaluados fueron la reproducibilidad y la recuperación.

2.4 Validación del método

Para validar el método desarrollado para el análisis de ácido fólico en cereales enriquecidos se emplearon los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y robustez.

2.4.1 Linealidad.

Para establecer la linealidad del método desarrollado se empleó el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta.

Se prepararon estándares de ácido fólico los cuales fueron adicionados a la muestra de cereal virgen en el rango de 0.1 a 4.0 ppm para la elaboración de una curva de calibración; se graficó la respuesta del detector en función de la concentración. Esto se realizó por triplicado. Se calcularon los factores de respuesta (FR) para cada uno de los puntos de la curva.

FR= respuesta del detector/concentración del estándar (ecuación 4)

Para nuestro caso la respuesta del detector correspondió al área del pico. Una vez obtenidos los factores de respuesta en cada uno de los puntos de la curva de calibración se calculó el coeficiente de variación (CV) con la ecuación:

$$CV= (SD \times 100) / \bar{X} \quad (\text{ecuación 5})$$

donde:

CV= es el porcentaje del coeficiente de variación

SD= desviación estándar de los factores de respuesta calculados empleando el programa Microsoft excel.

\bar{X} = promedio de los factores de respuesta.

2.4.2 Precisión

La precisión del método se realizó a 3 niveles de concentración: bajo, medio y alto.

Se tomaron 5 muestras virgen adicionadas para cada nivel de concentración y se procesaron de acuerdo con el método de tratamiento previo y purificación seleccionados. Estas muestras se inyectaron en el cromatógrafo y de los cromatogramas obtenidos se tomaron los datos de tiempo de retención, área y altura del pico cromatográfico.

Con los 15 datos obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación; se usó el programa Microsoft excel.

2.4.3 Exactitud.

La exactitud se obtuvo como el porcentaje de recuperación. Se realizó a tres niveles: bajo, medio y alto. Se adicionó a la muestra virgen 0.2, 1.2 y 3.2 ppm de ácido fólico. Se tomaron 5 muestras por cada nivel, se procesaron bajo las condiciones ya establecidas y se obtuvieron los cromatogramas. Con los datos obtenidos de las áreas de los picos se calculó el porcentaje de recuperación aplicando la ecuación:

$$\% \text{ de recuperación} = (A.M.C. - A.M.S.C.) 100 / A.St. \quad (\text{ecuación 8})$$

donde:

A.M.C. = es el promedio de las áreas de las muestras contaminadas.

A.M.S.C.= es el promedio de las áreas de las muestras sin contaminar.

A. St.= promedio de las áreas de las áreas del estándar.

Las muestras fueron tratadas de acuerdo al método de extracción y purificación seleccionadas.

2.4.4 Estabilidad

La estabilidad se probó tanto para el estándar como para las muestras. El estándar de ácido fólico se preparó y se inyectó al cromatógrafo el mismo día para obtener el área del pico cromatográfico. Posteriormente fue guardado en refrigeración a 4°C y en oscuridad. Periódicamente se inyectaba ese estándar para obtener el área del pico cromatográfico y compararla con la obtenida el día de su preparación. De la misma manera se hizo para las muestras; por medio de una gráfica de área vs los días de almacenamiento, se obtuvo la estabilidad del estándar y de las muestras.

2.4.5 Robustez

Para medir la robustez del método se realizaron modificaciones en el proceso de extracción y en el proceso de análisis cromatográfico.

Proceso de extracción:

Se modificó la cantidad de amilasa agregada; aumentando a 2mL de solución/g de muestra, se procesó y analizó bajo esta condición; se obtuvo el porcentaje de recuperación y por medio de una prueba estadística se observó si había diferencia significativa.

Proceso de análisis cromatográfico:

Se modificó el porcentaje de fase móvil a dos niveles: uno por encima y otro por debajo de los porcentajes óptimos de análisis. Se inyectó un estándar de 1 ppm de ácido fólico en 5 ocasiones consecutivas bajo estas condiciones, así como también en las condiciones ya establecidas.

Se calculó el factor de capacidad, el número de platos teóricos y el tiempo de retención. Los nuevos parámetros obtenidos con los pequeños cambios realizados se compararon con los obtenidos bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas empleando una prueba t student de dos colas. (31,32,33)

2.5 Aplicación del método desarrollado para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey.

2.5.1 Selección de muestras

Se seleccionaron 10 muestras al azar de cereales enriquecidos que se expenden en la zona metropolitana de Monterrey para determinar los niveles de ácido fólico aplicando el método desarrollado; se verificó que proveyeran de diferentes lotes.

2.5.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron aplicando el método seleccionado de tratamiento previo de la muestra y purificación, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos y se trabajó bajo las condiciones previamente establecidas.

Los niveles de ácido fólico fueron reportados en $\mu\text{g}/100\text{ g}$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Condiciones cromatográficas

Para el establecimiento de las diferentes condiciones de análisis cromatográfico se trabajó con el estándar de ácido fólico de 1 ppm y se probaron dos sistemas que fueron descritos en el capítulo 2.

3.1.1 Sistema 1.

Se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en las figuras 2, 3 y 4. La figura 2 muestra un pico simétrico que corresponde al estándar de ácido fólico de 1 ppm, con un tiempo de retención de 14.870 min.

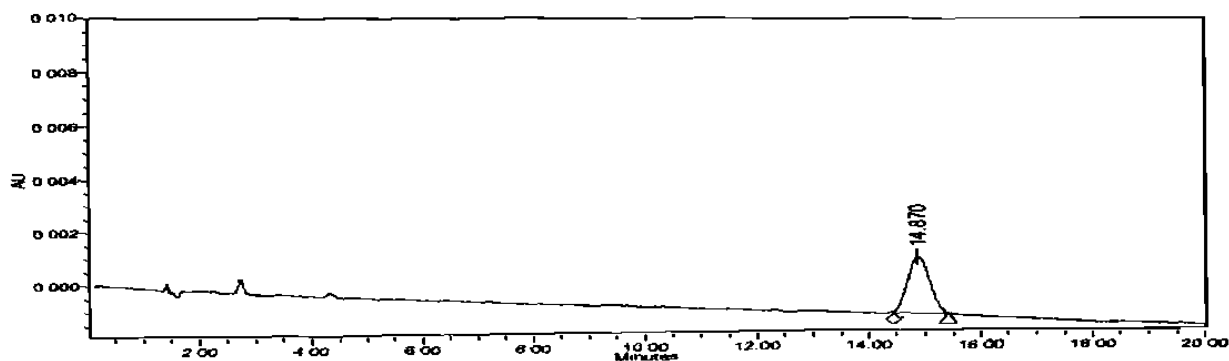


Figura 2. Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/minuto y detección a 280 nm.

Sin embargo, al tratar de reproducir las condiciones, no se obtuvo el mismo pico cromatográfico, lo que se observa en las figuras 3 y 4. La figura 3 muestra un cromatograma con un pico ancho con un tiempo de retención de 17.367 que corresponde al estándar de ácido fólico de 1 ppm inyectado por segunda vez.

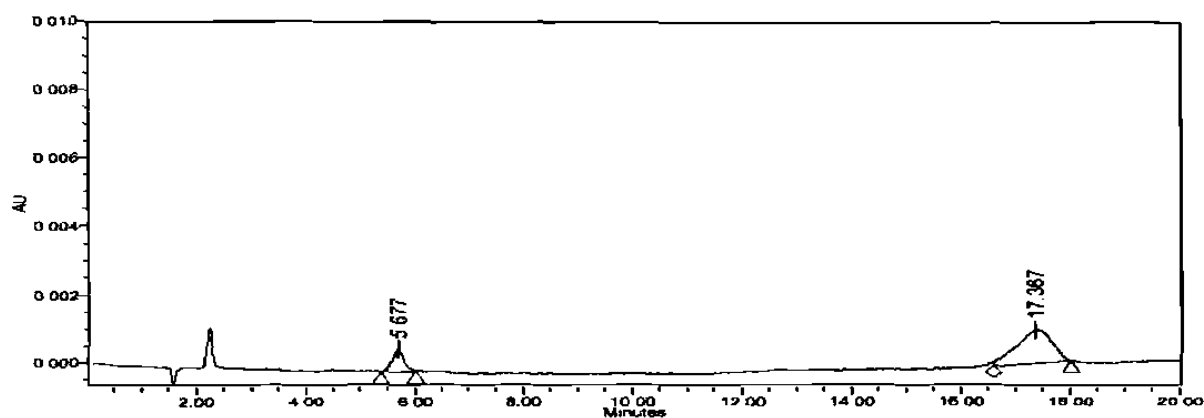


Figura 3. Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/minuto y detección a 280 nm.

La figura 4 muestra un cromatograma con un pico muy pequeño y deforme con un tiempo de retención de 12.061 min, que corresponde a la tercera inyección del estándar de ácido fólico de 1 ppm.

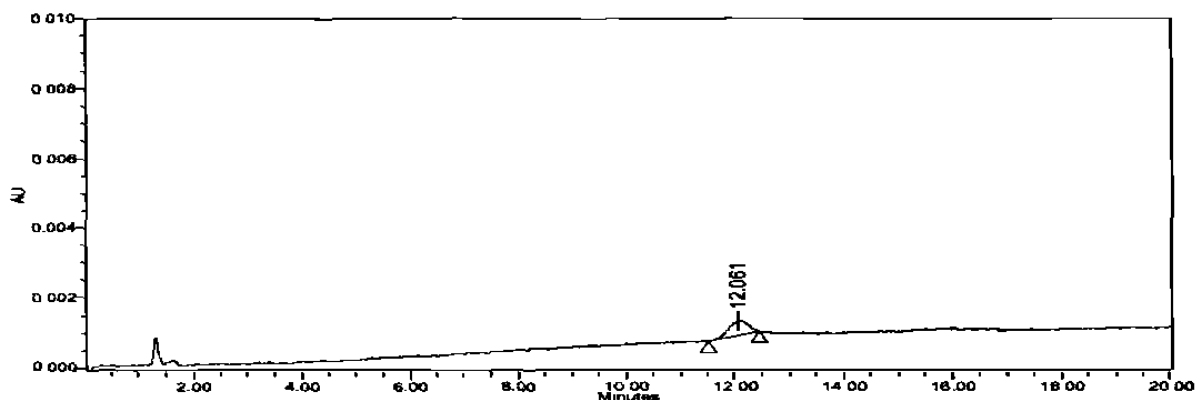


Figura 4. Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil metanol:buffer de fosfatos pH 7 con TBA 0.005M (24:76), fase estacionaria columna de fase inversa C18, flujo 1 mL/minuto y detección a 280 nm

Como podemos observar el pico cromatográfico no permanece constante, se deforma y el tiempo de retención varía, es decir la precisión no es buena, por lo que decidimos probar el sistema 2.

3.1.2 Sistema 2

Se obtuvieron los cromatogramas mostrados en las figuras 5 y 6. La figura 5 muestra un cromatograma con un pico simétrico con un tiempo de retención de 2.963 min que corresponde al estándar de ácido fólico de 1 ppm.

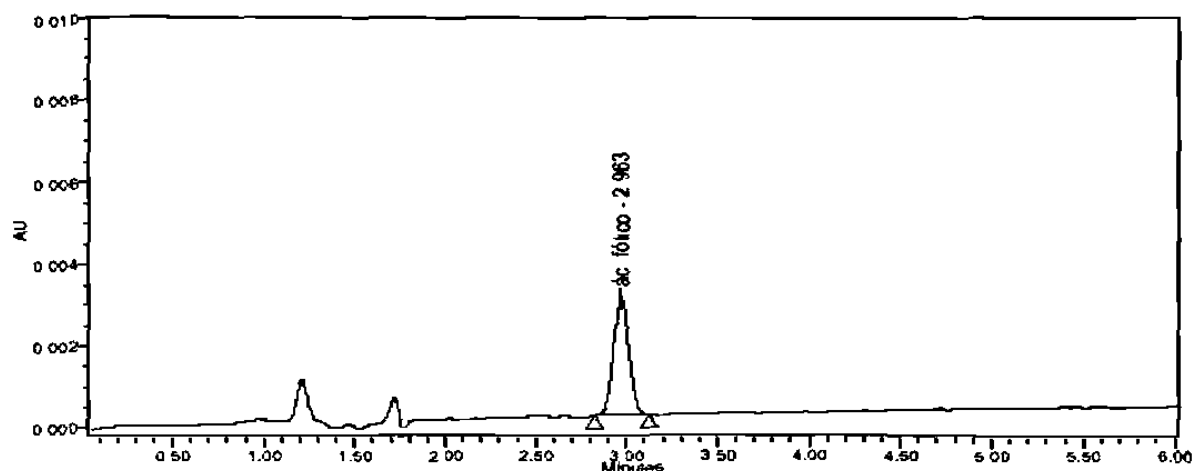


Figura 5. Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil ácido trifluoroacético 0.1% : acetonitrilo (85:15), fase estacionaria columna de fase inversa Atlantis dC18 5 μ m de diámetro de partícula 4.6 x 150 mm., flujo 1.4 mL/minuto y detección a 280 nm.

Posteriormente, se decidió inyectarlo en 5 ocasiones para observar la precisión. La figura 6 muestra un cromatograma con un pico simétrico con un tiempo de retención de 2.963 min, que corresponde al estándar de ácido fólico de 1 ppm.

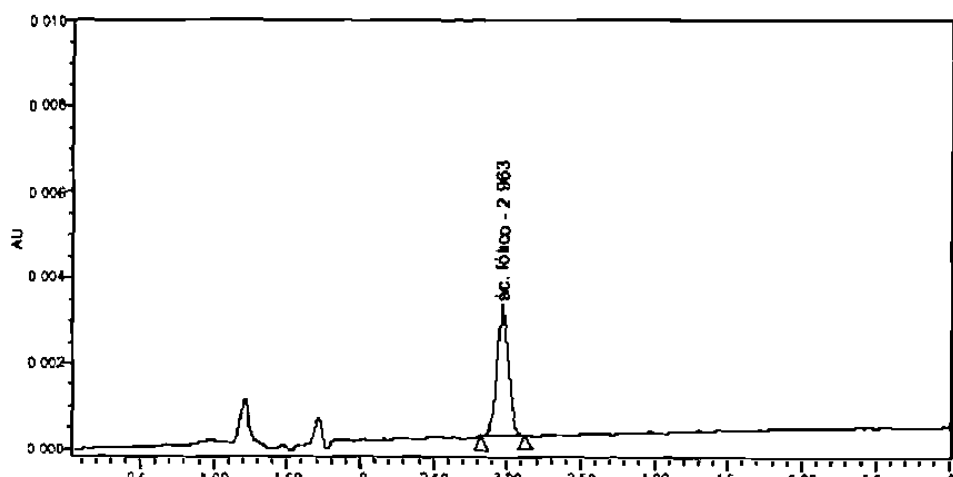


Figura 6. Cromatograma del estándar de ácido fólico de 1 ppm. Fase móvil ácido trifluoroacético 0.1%:acetonitrilo (85:15), fase estacionaria columna de fase inversa . Atlantis dC18 5 μ m de diámetro de partícula 4.6 x 150 mm, flujo 1.4 mL/minuto y detección a 280 nm

En las siguientes inyecciones se obtuvieron los mismos resultados: el pico cromatográfico permaneció constante y presentó una buena precisión, por lo que decidimos optimizar y validar estas condiciones cromatográficas.

3.2 Optimización de parámetros cromatográficos

Para la optimización se hicieron cambios en los porcentajes de la fase móvil y en la velocidad de flujo, y se evaluaron los parámetros de N, k' y FA; se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla IV. Las condiciones cromatográficas seleccionadas para el resto del estudio son las resaltadas en negrita.

ATF 0.1% : AcN	83:17			85:15			87:13		
Velocidad de Flujo mL/min	1.2	1.4	1.6	1.2	1.4	1.6	1.2	1.4	1.6
Parámetros									
tr	2.461	2.381	2.191	3.040	2.979	2.558	4.191	4.016	3.080
N	2192	2267	2276	2187	2271	1675	2189	2867	2243
k'	0.311	0.320	0.360	0.580	1.030	0.598	1.121	1.231	1.114
F.A.	1.06	1.06	1.06	1.03	1.03	1.08	1.10	1.10	1.08

Tabla IV. Selección de condiciones cromatográficas para el análisis de ácido fólico.

3.3 Parámetros de validación del sistema

Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros de precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, obteniéndose los resultados mostrados en las tablas de la V a la IX, así como en la figura 7.

3.3.1 Precisión intradía

En la tabla V se muestran los resultados de la precisión intradía para el estándar de 1 ppm de ácido fólico

	tr	área	altura
	2.875	17776	3091
	2.903	17163	3008
	2.902	17102	2995
	2.885	16938	2996
	2.864	17269	3051
	2.835	17122	3094
	2.812	17015	3108
	2.792	17298	3140
	2.799	17300	3130
	2.862	17251	3059
X=	2.852	17223	3067
S=	0.041	229	54
%CV=	1.44	1.33	1.76

Tabla V. Resultados de la precisión intradía del estándar de ácido fólico de 1 ppm. (n=10)

3.3.2 Precisión interdía

En la tabla VI se muestran los resultados de la precisión interdía para el estándar de 1 ppm de ácido fólico

	tr	área	altura
	2.963	16328	2825
	2.928	16114	2836
	3.011	16343	2743
	3.024	15954	2673
	3.044	15961	2683
	3.042	16159	2713
	2.988	17108	2926
	2.875	17776	3091
	2.903	17163	3008
	2.902	17102	2995
	2.885	16938	2996
	2.864	17269	3051
	2.835	17122	3094
	2.812	17015	3108
	2.792	17298	3140
	2.799	17300	3130
	2.862	17251	3059
	2.959	15515	2646
	2.849	15782	2816
	2.831	15649	2807
	2.821	16100	2884
	2.816	15944	2894
	2.806	15672	2885
	2.797	15850	2899
	2.787	16225	2971
	2.796	16039	2881
	2.866	15662	2759
X=	2.883	16468	2908
S=	0.083	672	149
%CV=	2.88	4.07	5.13

Tabla VI. Resultados de la precisión interdía del estándar de ácido fólico de 1 ppm. ($n=27$)

3.3.3 Linealidad

En la figura 7 se muestra la curva de calibración para el ácido fólico, donde se observa la linealidad en el rango de 0.1 a 4 ppm, se presentó un coeficiente de correlación lineal de 1 con coeficiente de variación de 3.27%

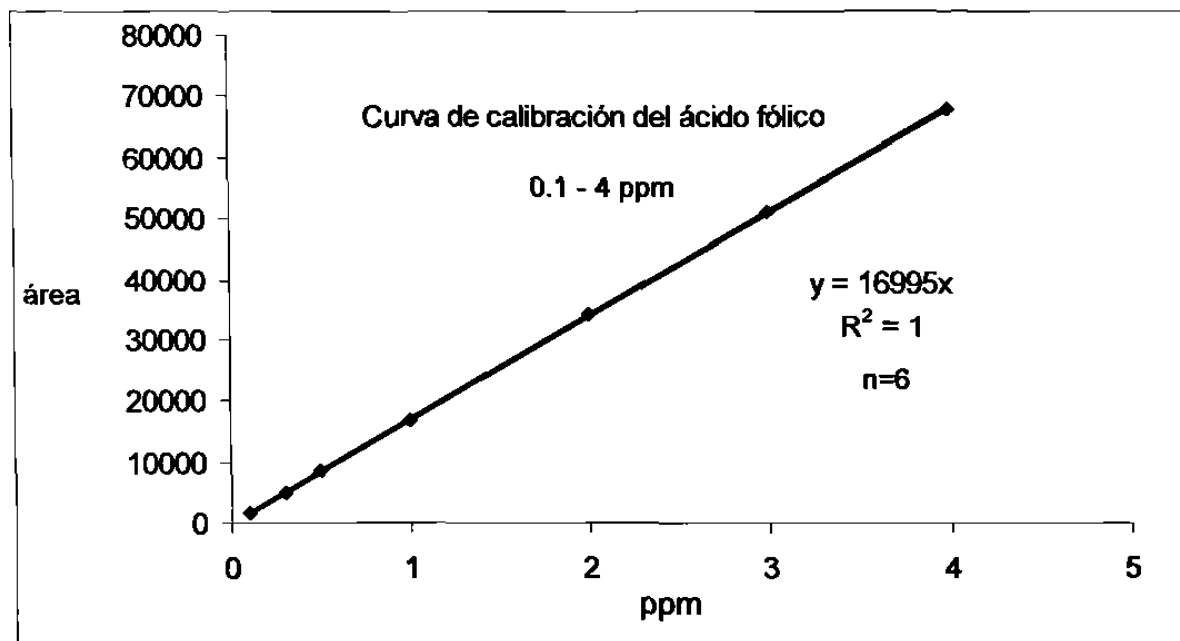


Figura 7. Curva de calibración de ácido fólico, área vs concentración.

Se realizaron 6 curvas de calibración; se obtuvieron las siguientes ecuaciones de la recta:

$$y = mx + b$$

$$1.- y = 17500 X - 470 \quad r^2 \approx 0.9996$$

$$2.- y = 16834 X + 139 \quad r^2 \approx 0.9998$$

$$3.- y= 16800 X - 191 \quad r^2 = 0.9997$$

$$4.- y= 16820 X + 108 \quad r^2 = 0.9998$$

$$5.- y= 17300 X - 184 \quad r^2 = 0.9999$$

$$6.- y= 17200 X - 77.8 \quad r^2 = 0.9999$$

Curva de calibración de ácido fólico promedio $y= 17037 X - 119.43 \quad r^2 = 1$

Se obtuvo también el coeficiente de variación de los factores de respuesta, mostrado en la tabla VII.

[] ppm	FR área/[]
0.1	15511.90
0.3	16987.03
0.5	16783.10
1	16822.72
2	17070.30
3	17077.79
4	17010.91
X	16708.80
S	547.00
%CV	3.27

Tabla VII. Coeficiente de variación de los factores de respuesta de las curvas de calibración de ácido fólico.

3.3.4 Límites de detección y cuantificación

$$LD=Y_{bl}+3S_{bl}/b \quad \text{y} \quad LC=Y_{bl}+10S_{bl}/b$$

donde:

Y_{bl} = intercepto de la curva de linealidad

S_{bl} = intercepto de la gráfica S vs. []

b = pendiente de la curva de linealidad

Los datos para la determinación de la desviación estándar del blanco se muestran en la tabla VIII.

	concentración en ppm										
	0.03	0.04	0.05								
área	427	845	895								
	560	762	855								
	598	686	976								
	692	716	865								
	464	740	850								
X	548	750	888								
S	106	60	52								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>ppm</th> <th>S</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.03</td> <td>106.156</td> </tr> <tr> <td>0.04</td> <td>60.251</td> </tr> <tr> <td>0.05</td> <td>52.093</td> </tr> </tbody> </table>				ppm	S	0.03	106.156	0.04	60.251	0.05	52.093
ppm	S										
0.03	106.156										
0.04	60.251										
0.05	52.093										
<table border="1"> <tbody> <tr> <td>S_{bl}</td> <td>180.959</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>-2703.15</td> </tr> </tbody> </table>				S_{bl}	180.959	b	-2703.15				
S_{bl}	180.959										
b	-2703.15										

Tabla VIII. Datos para calcular los límites de detección y cuantificación.

Los resultados para los límites de detección y cuantificación se presentan en la tabla IX.

Curvas de linealidad	Límite de detección en ppm	Límite de cuantificación en ppm
1	0.041	0.076
2	0.040	0.115
3	0.020	0.096
4	0.038	0.113
5	0.020	0.093
6	0.027	0.098
X	0.031	0.098

Tabla IX. Límites de detección y cuantificación del ácido fólico.

3.4 Extracción y purificación de la muestra

En las figuras 8 y 9 se muestran los cromatogramas obtenidos de la muestra virgen y de la muestra virgen contaminada con ácido fólico, ambas eluidas a pH de 4.5

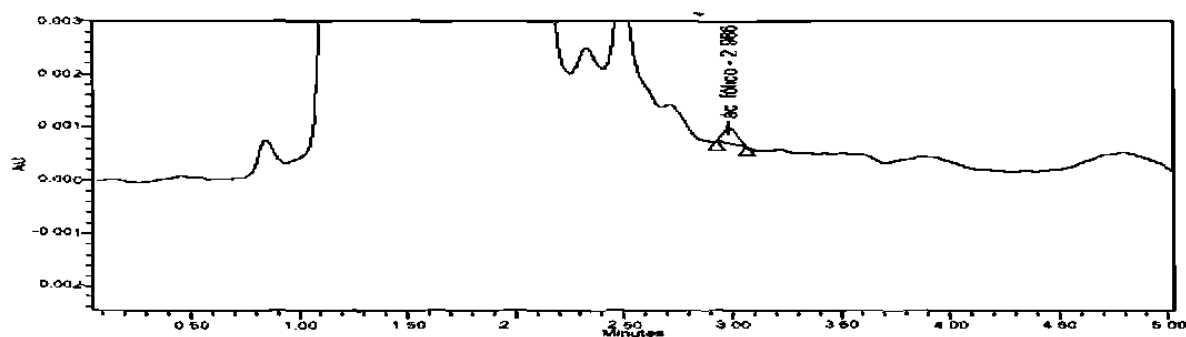


Figura 8. Cromatograma de la muestra virgen eluida a pH de 4.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

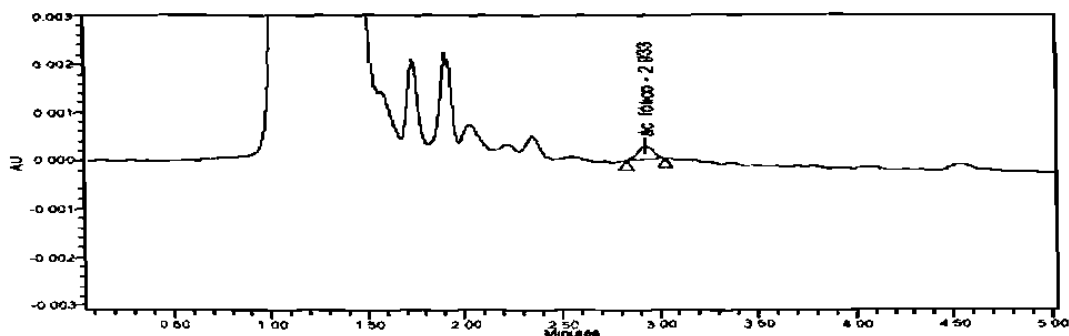


Figura 9. Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico 1ppm eluida a pH de 4.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

El cromatograma de la muestra adicionada muestra una señal muy pequeña de ácido fólico, similar a la muestra virgen, ambas eluidas a pH 4.5. Bajo estas condiciones se obtuvo un porcentaje de recuperación de 29.81%, el cual era muy bajo, por lo se decidió cambiar el pH de elución de 4.5 a 2.5

En las figuras 10 y 11 se muestran los cromatogramas obtenidos de la muestra virgen y de la muestra contaminada con ácido fólico, ambas eluidas a pH de 2.5 .

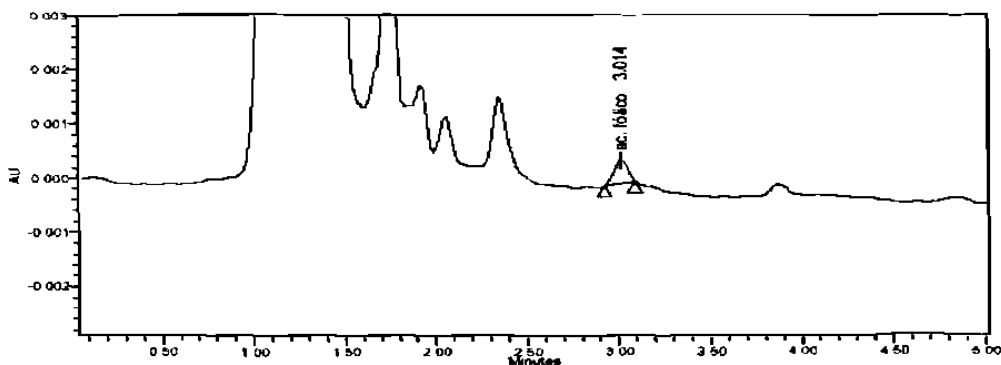


Figura 10. Cromatograma de la muestra virgen eluida a pH de 2.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

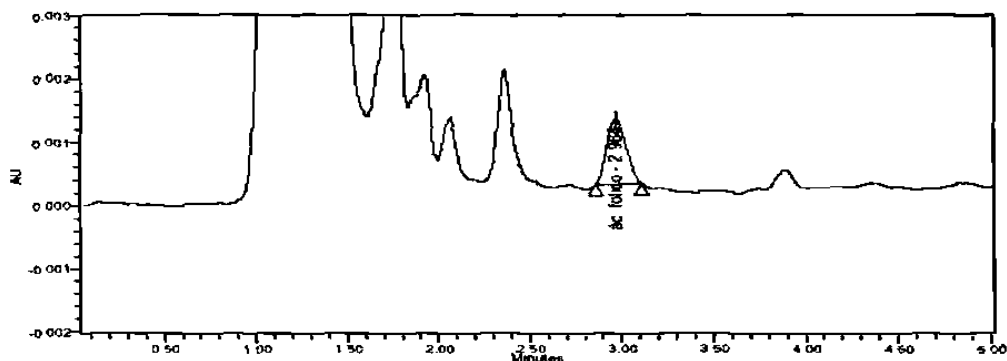


Figura 11. Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico 1ppm eluida a pH de 2.5 bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

Con estas condiciones el porcentaje de recuperación aumentó a 43%, sin embargo seguía bajo.

La figura 12 muestra el cromatograma obtenido de la muestra virgen contaminada con ácido fólico de 1 ppm inyectado directamente empleando sólo la filtración, se aumentó el porcentaje de recuperación a 61.33%. Cabe mencionar que se utilizó una guarda columna para alargar la vida media de la columna

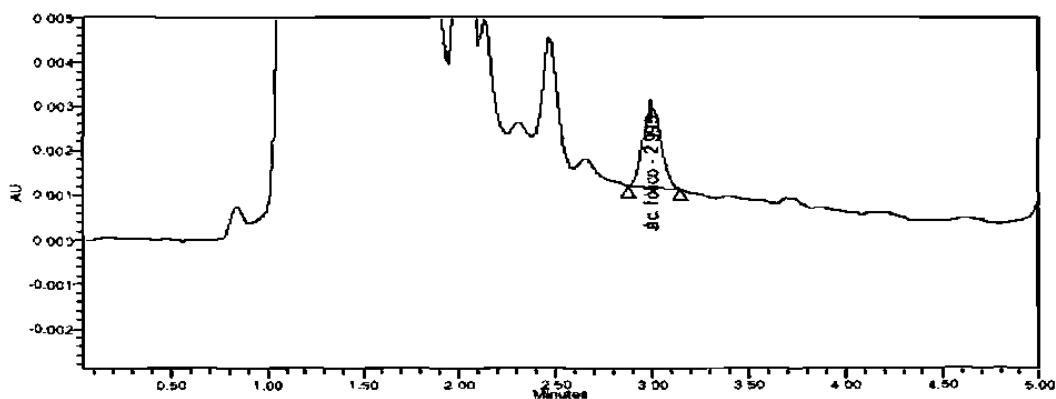


Figura 12. Cromatograma de la muestra virgen + ácido fólico 1 ppm con una filtración como método de purificación bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

3.4.1 Porcentajes de recuperación

En la tabla X se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación y reproducibilidad del método de extracción, comparando las dos condiciones empleadas.

Purificación Parámetro	Extracción en fase sólida	Filtro Millipore (0.45 μm)
Reproducibilidad %CV	4.20	0.67
Recuperación %R	43.00	61.33

Tabla X. Comparación de los métodos de purificación.

Considerando estos resultados, el método desarrollado de extracción y purificación de la muestra fue el siguiente:

Extracción

- Triturar la muestra en un mortero de porcelana
- Homogenizar 2 g de la muestra en 45 mL de K_2HPO_4 0.1M a un pH entre 8 y 9

- Llevar a agitación constante en una placa de agitación por espacio de 1 hora
- Después de la hora ajustar a un pH de 7
- Realizar una digestión enzimática, la cual se lleva a cabo adicionando 1 mL de la enzima alfa amilasa (a una concentración de 25 mg/mL) por cada gramo de muestra en un baño de agua a 65 °C por 1 hora
- Después de la hora inactivar la enzima elevando la temperatura a 90°C
- Enfriar la muestra a temperatura ambiente
- Aforar a 50 mL con buffer de fosfatos
- Filtrar con papel filtro Watman No. 40

Purificación

- Filtrar a través de una membrana de 0.45 µm.
- Inyectar en el cromatógrafo

3.5 Validación del método desarrollado

3.5.1 Linealidad

En la figura 13 se muestra la curva de calibración promedio para el ácido fólico graficando el área vs la concentración, en un rango de 0.1 a 4 ppm, con un coeficiente de correlación de 0.9994 y coeficiente de variación de los factores de respuesta de 9.82%.

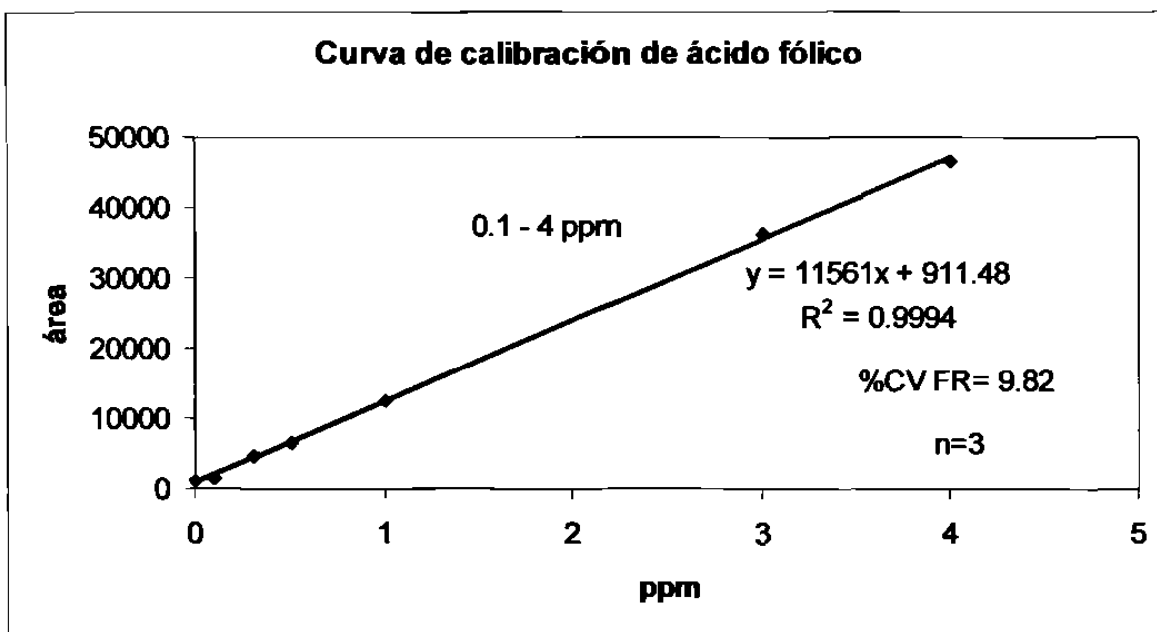


Figura 13. Curva de calibración de ácido fólico. Área vs concentración.

3.5.2 Precisión

Los resultados de la precisión del método a los tres niveles de concentración, para tr, área y altura de pico se muestran en la tabla XI.

Parámetro Nivel de concentración	tr %CV	Área %CV	Altura %CV
Bajo 0.2 ppm	0.06	1.50	4.77
Medio 1ppm	0.03	0.67	2.03
Alto 3.2 ppm	0.03	2.03	4.83

Tabla XI. Resultados de la precisión del método para determinar ácido fólico. (n=15)

3.5.3 Exactitud

Los resultados de la exactitud del método a los tres niveles de concentración, por medio de la evaluación del porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación se muestran en la tabla XII.

Nivel de concentración	Parámetro	% de Recuperación	% CV
Bajo	0.2 ppm	62	1.90
Medio	1.2 ppm	60	1.02
Alto	3.2 ppm	62	3.00

Tabla XII. Resultados de la exactitud del método para determinar ácido fólico. (n=15)

3.5.4 Estabilidad

La estabilidad se probó tanto para el estándar como para las muestras fortificadas.

La figura 14 muestra la curva de valoración para la estabilidad del estándar de ácido fólico de 1 ppm; en ella se graficó el área del pico cromatográfico promedio $\pm 2S$ vs días de almacenamiento a 4°C. Se observó que es estable hasta 74 días después de ser preparado.

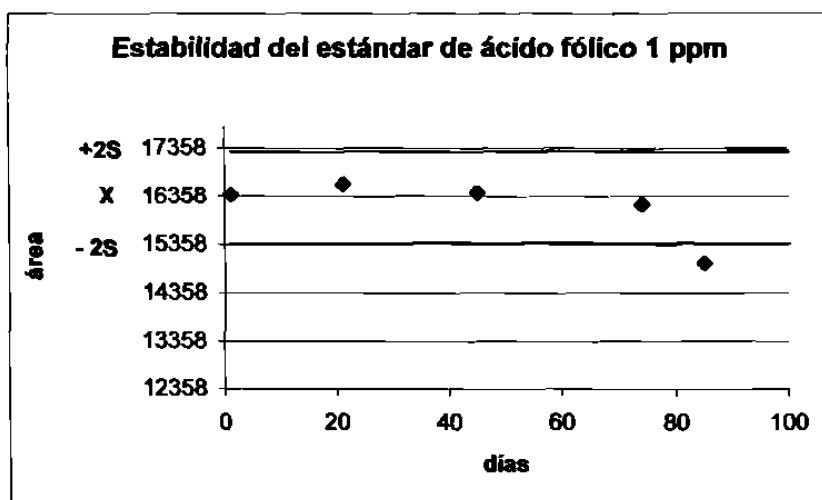


Figura 14. Curva de valoración para la estabilidad del estándar de ácido fólico.

La inestabilidad de una muestra de cereal fortificado, 2 días después de su procesamiento, se observa en la figura 15; en donde es notable la disminución del área del pico cromatográfico, así como una pérdida de simetría del mismo.

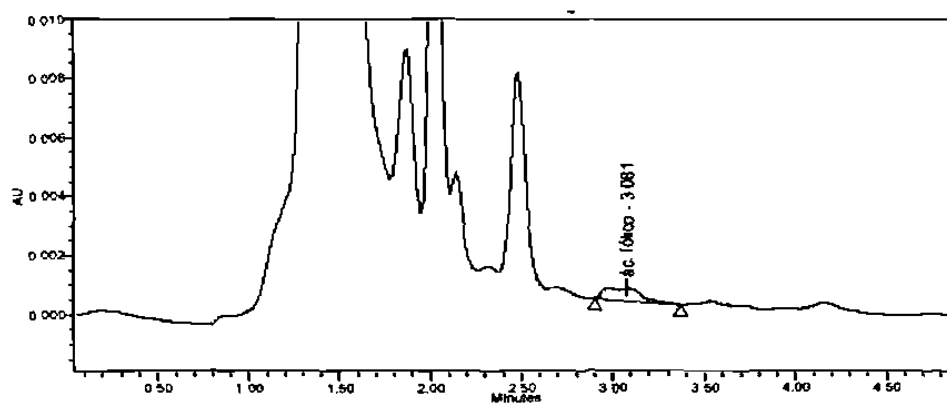


Figura 15. Cromatograma para demostrar la estabilidad de las muestras fortificadas.

3.5.5 Robustez

En las tablas XIII y XIV se muestran los resultados que se obtuvieron al realizar pequeños cambios tanto en el proceso de extracción como en el proceso de cuantificación, respectivamente. Al comparar estos resultados con los parámetros obtenidos bajo las condiciones ya establecidas empleando una prueba estadística de t de dos colas, se observó que, no hay diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de recuperación, sin embargo en el proceso de análisis, sí existe diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los parámetros evaluados.

Amilasa 25mg/mL	% Recuperación	Prueba t de dos colas
1mL/g	62%	No existe diferencia significativa
2mL/g	58%	

Tabla XIII. Cambios en el proceso de extracción para evaluar la robustez del método.

Parámetro	Cambio realizado	Parámetro evaluado		
		N	k'	tr
Composición de fase móvil (85:15)	83:17	no	si	si
	87:13	si	si	si
Velocidad de Flujo (1.4 mL/min)	1.2 mL/min	no	si	si
	1.6 mL/min	si	si	si

Tabla XIV. Cambios en el proceso de cuantificación para evaluar la robustez del método. Los valores óptimos están en paréntesis. no = no existe diferencia significativa, si = si existe diferencia significativa. Prueba t de dos colas.

3.6 Niveles de ácido fólico en cereales enriquecidos

Los niveles de ácido fólico determinados en cereales enriquecidos en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ se muestran en la tabla XV. Se analizaron un total de 10 muestras, de las cuales 7 corresponden a *Corn Flakes* de la marca *Kellog's* de diferentes lotes, y el resto de otras marcas.

PRODUCTO	LOTE	Fecha de caducidad	Ácido fólico determinado en $\mu\text{g}/100\text{g}$	Ácido Fólico Reportado etiqueta en $\mu\text{g}/100\text{g}$
Corn Flakes Kellog's	B8	02/01/04	642.36	666.66
Corn Flakes Kellog's	C8	16/02/04	764.17	666.66
Corn Flakes Kellog's	A10	11/03/04	1174.66	666.66
Corn Flakes Kellog's	C10	22/03/04	795.82	666.66
Corn Flakes Kellog's	C12	01/04/04	975.00	666.66
Corn Flakes Kellog's	B1	12/05/04	1040.00	666.66
Corn Flakes Kellog's	C3	27/05/04	599.20	333.33
Corn Flakes Hill Country	J1	22/06/04	305.95	400
Corn Flakes Nestlé	3B	12/04/04	670.85	400
Corn Flakes Quaker	7MA	24/09/04	293.00	320

Tabla XV. Niveles de ácido fólico en cereales enriquecidos.

En la figura 16 se presenta un cromatograma representativo de una muestra de cereal enriquecido.

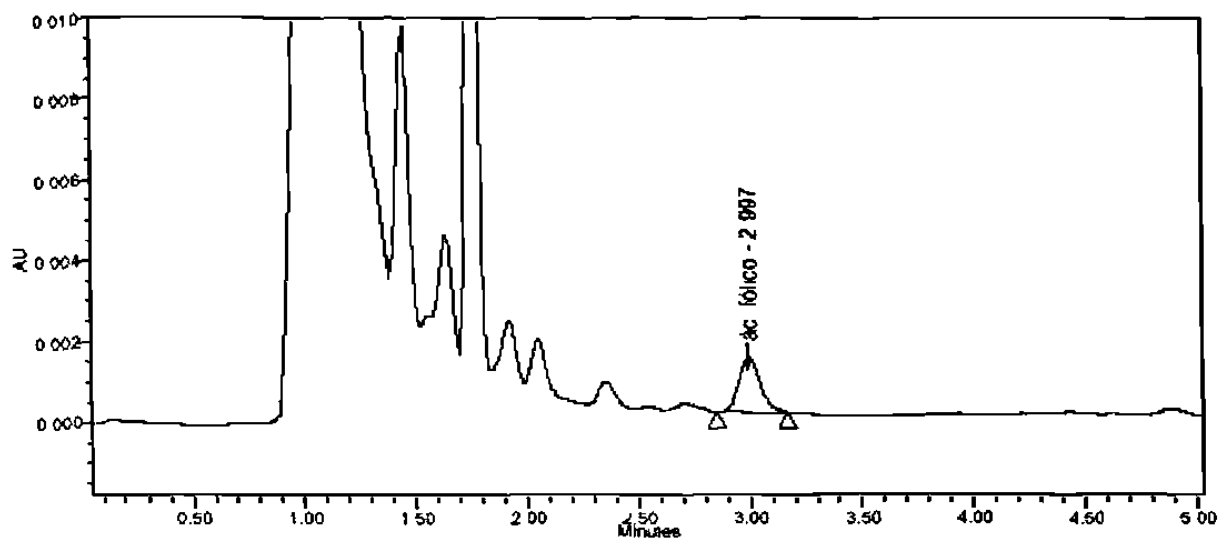


Figura 16. Cromatograma de una muestra de cereal de corn flakes de Kellog's lote B1. Pico cromatográfico correspondiente al ácido fólico con un tiempo de retención de 2.997 min.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Condiciones cromatográficas

El ácido fólico es una vitamina que se encuentra en muy pequeñas cantidades en alimentos enriquecidos, incluyendo los cereales; además se descompone fácilmente con la luz y el calor, por lo que es muy difícil su determinación. Por esta razón se requieren de métodos muy sensibles tales como el empleo de métodos cromatográficos.

En el presente trabajo primero se empleó el sistema cromatográfico reportado por Eolo S. Ossey (29), el cual consistió en el uso de un agente par iónico, el fosfato de tetra butil amonio. Como fase estacionaria se empleó una columna C₁₈ de fase inversa; como fase móvil se usó un buffer de fosfatos y metanol. Inicialmente se obtuvieron buenos resultados, sin embargo, se observó una deformación y pérdida de simetría del pico cromatográfico. El tiempo de retención no presentaba una buena precisión ya que variaba de inyección a

inyección. Por otra parte, el tiempo necesario para acondicionar la columna era muy prolongado y no se podían realizar muchas inyecciones el mismo día debido a que ésta se saturaba fácilmente.

Observando estos inconvenientes, aunado a los tiempos de corrida prolongados (de 20 a 25 minutos por corrida) y el gasto de reactivos, se vio la necesidad de cambiar las condiciones de nuestro sistema.

Se probó una columna Atlantis dC₁₈ marca Waters que tiene la particularidad de que, además de separar compuestos no polares, puede separar también compuestos polares permitiendo el uso de fases móviles muy acuosas.

(34)

Se utilizó como fase móvil ácido trifluoroacético y acetonitrilo, según las condiciones recomendadas en las especificaciones de la columna para la separación de vitaminas hidrosolubles; se observaron mejores resultados, un pico cromatográfico muy simétrico, reproducible y con tiempo de retención muy corto, por lo que se pudo continuar con la optimización del sistema.

4.1.1 Cálculo de N

Para el cálculo de número de platos teóricos a partir de los picos cromatográficos se decidió emplear la ecuación $N = 16(t_r/w)^2$, ya que los picos eran muy simétricos.

4.1.2 Selección del porcentaje de la fase móvil y velocidad de flujo

La selección de las condiciones finales se hizo bajo el criterio de tratar de obtener el mayor número de platos teóricos, con el menor factor de asimetría y una k' entre 2 y 10. (25)

Se calcularon los parámetros de número de platos teóricos (N), el factor de capacidad (k') y el factor de asimetría (FA). Como se observa en la tabla IV, el mayor número de platos teóricos se obtuvo con la composición 87:13 con una velocidad de flujo de 1.4 mL/min. Sin embargo, el pico cromatográfico era ancho y menos simétrico que el de la proporción 85:15. A pesar de que esta proporción presentaba menor número de platos teóricos a 1.4 mL/min, el pico cromatográfico era más angosto y simétrico que el anterior; por lo que se decidió trabajar con esta proporción (85:15) en el desarrollo del método.

4.2 Tratamiento previo de la muestra y purificación

4.2.1 Análisis de una muestra virgen.

La muestra virgen, es decir, libre de ácido fólico fue, proporcionada por la empresa Kellog's.

Los resultados del análisis de la muestra virgen confirman la presencia, en forma natural, de ácido fólico en este producto, como se muestra en la figura 10, debido a que en los cromatogramas obtenidos se observa una pequeña señal con un tiempo de retención igual al del ácido fólico; además su espectro de absorción es el mismo. De esta manera, se tuvo que restar la cantidad de ácido fólico de la muestra virgen y así obtener la cantidad real de ácido fólico en las muestras enriquecidas.

4.2.2 Método de tratamiento previo de la muestra

Como primera opción se desarrolló el tratamiento previo de la muestra según reporta Eलो S. Ossey (29); éste consistió en una homogenización con K_2HPO_4 con agitación constante por 1 hora, y posteriormente, una hidrólisis enzimática en un baño de agua a 65°C también por 1 hora.

La enzima que se utilizó fue alfa amilasa, la cual requiere un pH de 7.0, por lo que fue necesario llevar la muestra a ese pH antes de la hidrólisis. Este procedimiento se efectuó para poder hidrolizar los carbohidratos presentes en la muestra y poder liberar todo el ácido fólico presente. Este tratamiento es muy sencillo y muy rápido, se debe tener control en la temperatura del baño ya que la temperatura óptima de trabajo de la enzima es de 65°C. Para inactivarla se elevó la temperatura del baño exactamente a 90°C debido que a una mayor temperatura se puede desnaturalizar y perder el ácido fólico.

4.2.3 Purificación

Al principio se probó el método de purificación utilizado por Elolo S. Ossey; se empleó una extracción en fase sólida, método también referido por Paul M. Finglas (24) en un estudio interlaboratorios de estandarización de técnicas por HPLC para la determinación de folatos en alimento. La recuperación obtenida fue muy baja (29.81%) de tal manera que se decidió probar un pH de elución menor (2.5), para tratar de asegurar que el ácido fólico estuviera en su mayor parte en forma no ionizada y se retuviera mayormente en la fase estacionaria del cartucho. El porcentaje de recuperación aumentó a 43%, sin embargo, seguía bajo, por lo que nos planteamos la pregunta ¿en qué paso se estaba perdiendo el ácido fólico, en el proceso de extracción o en el de purificación?

Se pasó el estándar de ácido fólico directamente por el cartucho y se observó que se perdía un 20% en el proceso de purificación; por lo que se inyectó la muestra directamente al cromatógrafo, previa filtración con una membrana de 0.45 μm y empleando una guarda columna. De esta manera el porcentaje de recuperación aumentó a 61.33%, por lo que se consideró que se podía eliminar el empleo del cartucho

Se compararon los resultados obtenidos mediante ambos métodos, el de *extracción en fase sólida* y el de *filtración*. El primero arrojó 4.20% de reproducibilidad y 43% de recuperación. En cambio, el segundo dio 0.67% de reproducibilidad y 62% de recuperación.

Finalmente, además de aumentar el porcentaje de recuperación y la reproducibilidad, el empleo de la filtración trajo la ventaja de reducción en el tiempo y gasto de reactivos.

A pesar de que el porcentaje de recuperación es bajo, el método es preciso, por lo que es aceptable. A partir del porcentaje de recuperación se calculó un factor de corrección el cual fue aplicado para la cuantificación de ácido fólico en las muestras estudiadas.

4.3 Validación

4.3.1 Linealidad y límites de detección y cuantificación

Para establecer la linealidad del método, se empleó la curva de calibración y su coeficiente de correlación lineal, además del factor de respuesta (FR), el cual representa la relación del área del pico entre la concentración (figura 13). El resultado que se obtuvo fue de 9.82%, el cual es aceptable según la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), ya que ésta considera que el coeficiente de variación de los factores de respuesta debe estar por debajo del 15%. (26)

El rango lineal que se obtuvo fue de 0.1 a 4.0 ppm, el cual permitió cuantificar los niveles de ácido fólico en nuestras muestras de cereal.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos por nuestro sistema permiten detectar y cuantificar adecuadamente los niveles esperados de ácido fólico en las muestras problema.

4.3.2 Precisión y exactitud

Se evaluó la precisión a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) seleccionando el área del pico cromatográfico para la cuantificación. Se obtuvo una excelente precisión en los tres casos, ya que los valores de CV fueron menores del 15%, como lo recomienda la FDA ; dichos resultados se muestran en la tabla XI del capítulo 3,

Estos resultados de precisión, tanto para el sistema como para el método, permitieron cuantificar correctamente los niveles de ácido fólico en los cereales, aún cuando la recuperación del método fue de 62%.

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto); se obtuvo un valor muy semejante para los tres diferentes niveles.

Para determinar el porcentaje de recuperación fue necesario tomar en cuenta que la muestra virgen en forma natural tenía una cantidad detectable de ácido fólico.

4.3.3 Estabilidad

Para el estándar de 1 ppm de ácido fólico se comprobó que, una vez preparado, almacenado en refrigeración a 4°C y en oscuridad, permanecía estable hasta 74 días después de su preparación (figura 14). Después de ese tiempo empieza a descomponerse y se hace más difícil la integración del pico cromatográfico. Además, aparecieron otros picos que probablemente se deban a la formación de compuestos derivados del ácido fólico.

Por otro lado, las muestras de cereal fortificadas que se probaron, mostraron que aún en refrigeración y en oscuridad se descomponen fácilmente; desde el segundo día disminuyó la señal como se muestra en la figura 15. Por lo tanto, la muestra debe trabajarse el mismo día que se procesa.

4.3.4 Robustez

Según la ICH (Comité Internacional de Armonización), la robustez de un método indica el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Nuestros resultados de robustez arrojaron que ligeros cambios en la composición de la fase móvil producen cambios significativos en la eficiencia del método, demostrado en la tabla XIII. Debido a esto, se considera que es importante controlar estos parámetros para obtener resultados precisos. Sin embargo, un aumento en la concentración de la enzima, en el proceso de hidrólisis

de la muestra, no dio lugar a cambios significativos que puedan interferir en la eficiencia del método (tabla XIV).

En resumen, el método desarrollado y validado fue una modificación del usado por Eloilo S. Osseyi (29). Con respecto al tratamiento de la muestra, no hubo modificación. Sin embargo, en el análisis cromatográfico se modificaron tanto la fase móvil como la fase estacionaria. A pesar de que la recuperación que presenta Osseyi fue de 93%, no reporta datos de precisión del método. En el presente trabajo, si bien se tiene una recuperación del 61.33%, el CV es de 1.40%.

Con respecto al tiempo de análisis, se disminuyó considerablemente ya que Osseyi reporta un tiempo de retención de 15 minutos. En el método desarrollado el tiempo de retención fue de 2.9 minutos.

En cuanto al límite de detección, se obtuvo 0.031 $\mu\text{g/mL}$ que es menor que el reportado por Eloilo (0.1 $\mu\text{g/mL}$).

La simplicidad del método, la rapidez, además de su precisión, son ventajas que hicieron que este método se aplicara para la cuantificación de ácido fólico en cereales enriquecidos.

4.4 Niveles de ácido fólico

El alimento que se seleccionó para la determinación de ácido fólico fue cereal; esto debido a que los cereales *desempeñan un papel predominante en el aporte de nutrientes a la población y constituyen la principal fuente de energía; por ende son la base de la alimentación. Se utilizan ampliamente como vehículo de vitaminas hidrosolubles.*

Con el método establecido se analizaron muestras de cereal, específicamente corn flakes, y se compararon los resultados obtenidos con los valores marcados en la etiqueta del producto; se observaron valores por encima de lo reportado, tal como lo muestra la tabla XV. Es posible que durante la fortificación se adicione una cantidad mayor de ácido fólico para asegurar que el producto cumpla con las especificaciones de etiquetado al tiempo de su caducidad.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSIONES

1.- Se desarrolló y validó el método cromatográfico para el análisis de ácido fólico en cereales bajo las siguientes condiciones:

a) Tratamiento previo de la muestra:

- Hidrólisis enzimática
- Filtración

b) Condiciones cromatográficas:

- Fase móvil : ATF 0.1%-AcN 85:15
- Velocidad de flujo: 1.4 mL/min
- Fase estacionaria: columna fase inversa dC18 5µm de tamaño de partícula 4.6 x 150 mm.
- Detección : 280 nm.

- 2.- El método desarrollado y validado es sencillo, rápido y preciso.
- 3.- La eliminación del proceso de extracción en fase sólida dio como resultado un aumento tanto en el porcentaje de recuperación como en la reproducibilidad del método.
- 4.- El proceso de extracción en fase sólida fue sustituido por la filtración y el uso de una guarda-columna, sin observarse cambios en el cromatograma ni en los parámetros cromatográficos.
- 5.- La poca estabilidad evidencia que las muestras deben analizarse el mismo día del proceso.
- 6.- El método cromatográfico desarrollado es recomendado para el monitoreo de ácido fólico en cereales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roskoski R. *Bioquímica*. Mc Graw-Hill Interamericana. 1998. pp 28–29
2. <http://www.cerveza y salud. org/htm/body estudio4.htm>
3. Badui S. *Química de los alimentos*. Longman de México Editores, S.A de CV. 1999. Capítulo 6
4. Kaplan L., Pesce A., Kazmierczak S., *Clinical Chemistry*. Ed. Mosby Fourth Edition. 2003. pp 747-749
5. Anderson S., Cockayne S. *Química Clínica*. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill 1995. Cap 32. pp 604-609.
6. <http://www.saludparati.com/acidofolico.htm>
7. <http://www.terra.es/personal/nnuenez/acidofolico.htm>
8. Department of Health and Human Services, Public Health Service (DHHS/PHS). Recommendations for the Use of Folic Acid to Reduce the Number of Cases of Spina Bifida and Other Neural Tube Defects, Morbidity and Mortality Weekly Report, 41/No. RR-14, September 11 de 1992. pp 1-7
9. Laura E.Martínez-de Villarreal, M.C., Carmen Limón-Benavides, M.C.,Ramón Valdez-Leal, Q.C.B. , María Alejandra Sánchez-Peña, Lic. En Nutr., Jesús Z. Villarreal-Pérez, M.C. Efecto de la administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Salud Pública de México/ Vol. 43, No.2, marzo-abril 2001 pp 103-107*
10. http://www.alceingenieria.net/nutricio/manual/NUTRICIONFortificaci%3n_o_enriquecimiento .htm
11. Norma oficial NOM 131-SSA-1995. Bienes y Servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
12. Jorge L. Rosado, I.B. M. Sc., Ph. D., Rafael Camacho-Solís, M.C. Héctor Bourges, M.C., Ph. D. Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud Pública de México Vol. 41, No. 2, marzo-abril 1999. pp 130-137*
13. AOAC. Official Methods of Análisis of the Association of Oficial. Analytical Chemist. Método 992.05. Cap.50.16 Edición. Vol. 2. pp 21

14. Konings E. A Validated Liquid Chromatographic Method for Determining Folates in Vegetables, Milk Powder, Liver and Flour. *Journal of AOAC International*. Vol. 82 (1) 1999. pp 119-127
15. Jacoby B., Henry F., Liquid Chromatographic Determination of Folic Acid in Infant Formula and Adult Medical Nutritionals. *Journal of AOAC International*. Vol 75 (5) 1992. pp 891-898
16. Vatheristo L., Ollilainen Varo P., Liquid Chromatographic Determination of Folate Monoglutamates in Fish, Meat, Egg and Dairy Products Consumed in Finland. *Journal of AOAC International*. Vol. 80 (2) 1997. pp 373-378
17. <http://www.fda.gov>
18. Vatheristo L., Ollilainen V., Koivistoinen P., Improvements in the Analysis of Reduce Folate Monoglutamates and Folic Acid by High Performance Liquid Chromatographic. *J. Agric. Food Chem.*, Vol 44 1996. pp 477-482
19. Kirk R., Sawyer R., Egan H. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. 2ª Reimpresión. México 1999. Compañía Editorial Continental SA de CV. Cap. 8. pp 311
20. R. Matissek and R. Wittkowski. High Performance Liquid Chromatography in Food Control and Research. *J Agric. Food Chem.* 1999. pp 202-207
21. Pfeiffer, C.M., Rogers, L.M. & Gregory, J.F. III. Determination of Folate in Cereal-grain Food products using tri-enzyme extraction and combined Affinity and Reversed-phase Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45. 1997. pp 407-413
22. Llorence Monferrer-Pons, M. Elisa Capella-Peiró. Micellar Liquid Chromatography Determination of B Vitamins with Direct Injections and Ultraviolet Absorbance Detection. *Journal of Chromatography A*, Vol. 984. 2003. pp 223-231
23. Rychlik Michael. Simultaneous Analysis of Folic Acid and Pantothenic Acid Foods Enriched With Vitamins by Stable Isotope Dilution Assays. *Analytica Chimica Acta* Vol. 495 No. 1-2. 2003. pp 133-141
24. Paul M. Finglas, Karin Wigertz, Liisa Vahteristo, Cornelia Witthoft Sue, Southon, Isabelle de Froidmont-Gortz. Standardisation of HPLC Techniques for the Determination of Naturally-occurrign Folates in Food. *Food Chemistry*. Vol. 64. 1999. pp 245-255
25. Quattrocchi, Oscar Alberto. *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*

1992. Capítulos 11 y 12

26. ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products *Human Medicines Evaluation Unit*. Step 4, Consensus Guideline, 6 November 1996
27. J. Mark Green. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry* May 1, 1996
28. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001
29. Eolo S. Osseyi, Randy L. Wehling, Julie A. Albrecht. Liquid Chromatographic Method for Determining Added Folic Acid in Fortified Cereal Products. *Journal of Chromatography A*, Vol. 826. 1998. pp 235-240.
30. Eolo S. Osseyi, Randy L. Wehling, Julie A. Albrecht. HPLC Determination of Stability and Distribution of Added Folic Acid and Some Endogenous Folates During Breadmaking. *Cereal Chem.* , 78(4) 2001. pp 375-378
31. Wyne W. Daniel. *Bioestadística*, 3ª edición. Ed. Limusa. México, 1997. pp 345-397.
32. María José Marques de Cantú. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Biológicas*. McGraw-Hill 1991. pp 256-261
33. Helmut Günzler. *Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1994. pp 135-157
34. *Chromatography Columns and Supplies Catalog Waters 2003-2004*. pp 142



