



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES
CROMATOGRÁFICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y
SEPARACIÓN DE TIAMINA (B₁), RIBOFLAVINA (B₂) Y
NIACINA (B₃)**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERA
BIOTECNÓLOGA**

PRESENTA

CAROLINA BUENO SOLANO

DEDICATORIAS

A DIOS, por guiar mis pasos.

A mi FAMILIA, a quienes les agradezco todo lo que han hecho por mí, por permitirme compartir con ellos este gran esfuerzo y siempre estar a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por darme la oportunidad de vivir y cumplir mis sueños y por estar siempre a mi lado, gracias.

A mis PADRES Alfredo y Mary, por la confianza que siempre me han dado , por estar siempre conmigo en cada paso de mi camino, en los buenos y en los malos momentos, brindándome su apoyo, son para mi un ejemplo de lucha, voluntad y esfuerzo, estoy infinitamente agradecida.

A mis HERMANOS Alfredo, Francisco y Vero, por la paciencia que me tienen y por su apoyo durante todos estos años.

A los DOCTORES Jaime López y Dalia Sánchez, por su tiempo, sus enseñanzas, su dedicación y entusiasmo al trabajar conmigo, y brindarme la oportunidad de aprender de ellos.

A mis AMIGOS, Rubén, Irazema, Kitzia, José Alberto, Cris, Magda, Sayuri, Felipe, Keni y Oly, por trabajar y convivir durante todo este tiempo, por todas las experiencias que compartimos y los buenos recuerdos que nunca se olvidan.

A todos mis COMPAÑEROS de carrera, por pasar tantos momentos agradables en estos cuatro años y medio, de los cuales de cada uno de ellos me llevo algo de enseñanza, los aprecio mucho.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Condiciones cromatográficas para la determinación de las vitaminas B ₁ y B ₂ , propuestas por diferentes autores	25
2	Condiciones cromatográficas para la determinación de niacina según varios autores.....	26
3	Longitud de onda para la detección de las vitaminas con detector ultravioleta.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Estructura de tiamina	9
2	Estructura de riboflavina	11
3	Estructura de niacina	13
4	Espectro de absorción de las tres vitaminas. a: riboflavina, b: tiamina, y c: niacina	30
5	Cromatograma de las soluciones estándar de tiamina (a), riboflavina (b) y niacina (c) con buffer KH ₂ PO ₄ pH 4.11 y metanol como fase móvil.. ..	33
6	Comparación de cromatograma de la solución estándar de vitaminas en buffer KH ₂ PO ₄ a diferentes pH. a: pH 4.11 y b: pH 6.7.....	34

7	Cromatograma de la solución estándar de tiamina (a) y riboflavina (b), en fase móvil de buffer KH_2PO_4 pH 6.7 y metanol (60:40).....	35
8	Cromatograma de solución estándar de niacina en fase móvil de buffer KH_2PO_4 pH 6.7 y metanol (60:40)	36
9	Cromatograma de la mezcla de soluciones estándar de las tres vitaminas con buffer KH_2PO_4 5 mM pH 6.7 y metanol (60:40)	37
10	Cromatograma de la mezcla de soluciones estándares con buffer KH_2PO_4 20 mM pH 6.7 y metanol (65:35)	38
11	Cromatograma de una mezcla de tres soluciones estándares en buffer KH_2PO_4 40 mM pH 6.7 y metanol (56:44)	39
12	Cromatograma del análisis por HPLC de la mezcla de soluciones estándar realizado a 30 °C.....	40
13	Cromatogramas que ejemplifican la composición de la fase móvil. a: buffer KH_2PO_4 5 mM-metanol (60:40); b: buffer KH_2PO_4 5 mM-metanol (70:30) y c: buffer KH_2PO_4 5 mM-metanol (65:35)	43
14	Cromatograma de la mezcla de soluciones estándar con una relación buffer KH_2PO_4 20 mM–metanol (65:35)	43
15	Cromatograma de la solución estándar de las tres vitaminas con una relación buffer KH_2PO_4 40 mM–metanol (65:35).....	44
16	Cromatograma de la solución estándar de las vitaminas en fase móvil de buffer KH_2PO_4 40mM–metanol (56:44).....	45

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Vitaminas del complejo B.....	7
2.1.1 Tiamina.....	8
2.1.1.1 Estructura y propiedades generales.....	8
2.1.1.2 Estabilidad y formas de degradación.....	8
2.1.2 Riboflavina.....	9
2.1.2.1 Estructura y propiedades generales	9
2.1.2.1 Estabilidad y formas de degradación	11
2.1.3. Niacina	12
2.1.3.1 Estructura y propiedades generales	12
2.1.3.2 Propiedades fisicoquímicas	13
2.2 Cromatografía	14
2.2.1 Conceptos generales	14
2.2.2 Columnas	15
2.2.3 Tipo de detectores	16
2.2.4 Métodos de detección por espectrofotometría	18
2.2.4.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible ...	18
2.2.4.2 Espectrofotometría de fluorescencia	19
2.2.5 Migración cromatográfica: conceptos cinéticos	20

2.3 Antecedentes bibliográficos de los métodos para la determinación de las vitaminas seleccionadas.....	21
2.3.1 Determinación de tiamina	22
2.3.2 Determinación de riboflavina	23
2.3.3 Determinación de niacina	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Patrones y reactivos químicos	27
3.2 Equipo y condiciones HPLC	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Ensayos preliminares para la identificación de las vitaminas	29
4.2 Optimización de los parámetros cromatográficos	31
4.2.1 pH de la solución buffer	31
4.2.2 Concentración de la solución buffer K_2PO_4	36
4.2.3 Velocidad de flujo de la fase móvil y temperatura de la columna.....	40
4.2.4 Relación de los componentes de la fase móvil	41
4.2.5 Tiempo de uso de la columna	45
CONCLUSIÓN	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

Esta investigación fue realizada en el Instituto Tecnológico de Sonora, unidad Nainari, en los Laboratorios 700, y aquí se presenta un método HPLC para la determinación de las condiciones óptimas de identificación y separación de tiamina, riboflavina y niacina. Los ensayos de las soluciones estándar de cada vitamina fueron realizados en una columna SS Exsil ODS 5 μm (250 mm x 4.6 mm) y con detección ultravioleta, en donde se evaluaron los siguientes parámetros: componentes de la fase móvil, buffer KH_2PO_4 y metanol; diversas concentraciones y pH del buffer KH_2PO_4 ; diferentes proporciones de los constituyentes de la fase móvil; temperatura de la columna, y velocidades de flujo de la fase móvil. Se encontró que la mejor concentración de buffer KH_2PO_4 es de 20 mM (pH 6.7), con una proporción de buffer KH_2PO_4 y metanol de 65:35, a 0.8 ml/min de velocidad de flujo y 30 °C como temperatura de la columna. Con estas condiciones el método puede ser utilizado para la cuantificación de B_1 , B_2 y B_3 en preparados farmacéuticos y alimentos de matrices sencillas.

I. INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas que actúan en cantidades mínimas dentro de las células y junto con las proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos logran el buen funcionamiento del cuerpo.

Los requerimientos de vitaminas del hombre son mínimos, por lo que a estas sustancias se les considera como micronutrientes (Badui, 1990). Están presentes en los alimentos y son requeridos para un crecimiento normal y automantenimiento del cuerpo animal y humano (Ekinci, *et al.*, 2005).

Las vitaminas se clasifican en dos principales grupos, hidrosolubles y liposolubles (Lehninger, 1995). Las vitaminas hidrosolubles incluyen a la tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), piridoxina (B₆), cianocobalamina (B₁₂), ácido ascórbico (C), ácido fólico, biotina (H) y ácido pantoténico (Ponder, *et al.*, 2004).

Las coenzimas de la tiamina son tiamina pirofosfato y tiamina trifosfato, las dos tienen un papel esencial en la transformación de energía, transporte de la membrana y en las funciones del nervio (Sánchez-Machado, *et al.*, 2004). La riboflavina es una vitamina importante del complejo B, actúa como intermediario en la transferencia de electrones en las reacciones biológicas redox y participando en el crecimiento celular (Severo, *et al.*, 2005). Por su parte, la niacina esta presente en muchos alimentos y se puede encontrar como ácido nicotínico, nicotinamida, y la nicotinamida del nucleótido de la coenzima NAD y NADP (Vidal, *et al.*, 1997).

Los métodos de fluorescencia, microbiológicos y detección ultravioleta han sido utilizados para la medición del contenido de riboflavina, niacina y tiamina en alimentos. El método microbiológico muestra una alta especificidad y confiabilidad pero es muy tardado, mientras que la especificidad del método de fluorescencia es baja. Por esto, ambos han sido remplazados por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los cuales tienen una alta especificidad y sensibilidad, además que requieren un tiempo de análisis corto (Esteve, *et al.*, 2001).

1.1 OBJETIVO

Evaluar el efecto de diversos parámetros cromatográficos en la identificación y separación de tiamina, riboflavina y niacina a fin de optimizar la metodología para su cuantificación en preparados farmacéuticos y alimentos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En años anteriores los métodos instrumentales de análisis resultaban tediosos, requerían de mucho tiempo y en ocasiones eran poco precisos. Con el paso de los años se han desarrollado nuevas técnicas que acortan el tiempo de trabajo, permiten alcanzar altos niveles de selectividad, sensibilidad y resolución. Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad es la cromatografía. La cromatografía agrupa a un conjunto importante de métodos que permiten separar compuestos de mezclas complejas.

La técnica de cromatografía más utilizada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Su empleo se debe a su alta sensibilidad, su fácil adaptación y su gran aplicabilidad a sustancias de primordial interés. Entre los factores que intervienen en el proceso cromatográfico se encuentran, la velocidad de flujo de la fase móvil, la composición de la fase móvil, temperatura de la columna, la presión de la bomba y la concentración de la solución buffer.

Entre las muchas aplicaciones del HPLC se pueden mencionar la identificación de contaminantes o compuestos tóxicos para el consumo, conocer el grado de pureza e identificación de la composición de algún producto de interés.

En esta investigación se busca optimizar la metodología para la identificación y separación de las vitaminas B₁, B₂ y B₃, por medio de las soluciones estándar de cada vitamina mediante HPLC.

Posteriormente, se utilizarán estas condiciones para la cuantificación de tiamina, riboflavina y niacina que se encuentran presentes en el hidrolizado proteico obtenido de la fermentación láctica de la cabeza de camarón.

1.4 HIPÓTESIS

La identificación y separación de tiamina, riboflavina y niacina se puede realizar simultáneamente durante el análisis cromatográfico.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vitaminas del complejo B.

Las vitaminas comprenden un grupo diverso de compuestos orgánicos que son, desde el punto de vista nutritivo micronutrientes esenciales. Las funciones que desempeñan las vitaminas *in vivo* son diversas: a) como coenzimas o sus precursores (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantoténico, vitamina B₆, vitamina B₁₂ y folato); b) como componentes del sistema antioxidante; c) como factores implicados en la regulación genética y d) en funciones especializadas (Fennema, 2000). Según Badui, (1990), las vitaminas se encuentran en muchos alimentos en una forma química que no necesariamente corresponde a la actividad biológica, por lo que el organismo humano requiere convertirla a su estado activo.

Las vitaminas se dividen en dos grandes grupos, las hidrosolubles y las liposolubles.

Las vitaminas liposolubles comprenden a las vitaminas A, D, E y K. Solamente los animales superiores parecen precisarlas de procedencia exógena; no se ha podido establecer claramente el papel esencial de las vitaminas liposolubles en los vegetales y microorganismos (Lehninger, 1995).

Las vitaminas hidrosolubles incluyen la tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, ácido ascórbico, ácido fólico, biotina y ácido pantoténico. Estas vitaminas juegan un papel esencial en las funciones biológicas normales como coenzimas y antioxidantes (Ponder, *et al.*, 2004).

2.1.1 Tiamina

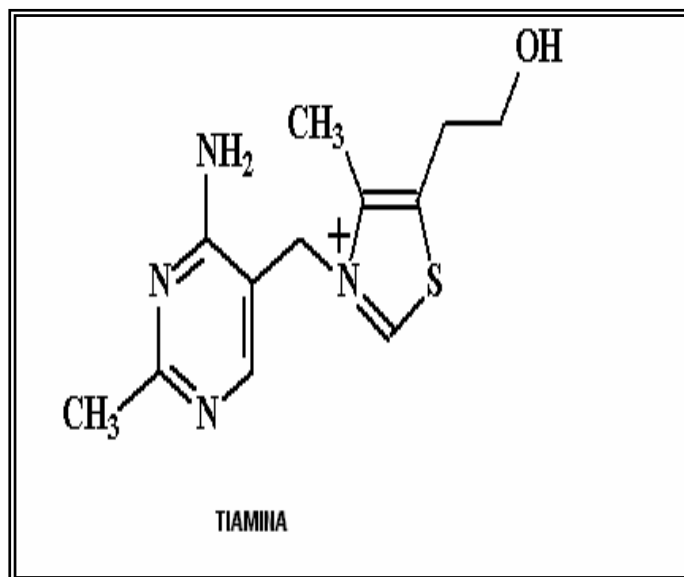
2.1.1.1 Estructura y propiedades generales

La tiamina se puede encontrar en diferentes alimentos como carnes (especialmente el cerdo), cereales, nueces y legumbres. En general, el contenido de tiamina en vegetales verdes, frutas y alimentos marinos es bajo. En alimentos, la tiamina endógena existe en cuatro formas: como tiamina, tiamina monofosfato (TMP), tiamina pirofosfato (TPP) y tiamina trifosfato (TTP) (Fennema, 2000).

2.1.1.2 Estabilidad y formas de degradación

Esta vitamina (figura 1) es relativamente estable a bajas temperaturas en estado seco y en oscuridad. En solución, son generalmente inestables a temperaturas elevadas o bajo condiciones alcalinas. La tiamina es estable a pH 2 - 4. En solución, TPP es estable a pH 2 - 6, si se guarda a bajas temperaturas. También es susceptible a su degradación por enzimas antagonistas presentes en los alimentos tales como pescado, café, té y algunas variedades de plantas.

Esta vitamina es soluble en agua, parcialmente soluble en alcohol y acetona, y es insoluble en solventes no polares como éter, benceno, hexano y cloroformo (Fennema, 2000).



Fuente: www.essex.ac.uk

Figura 1. Estructura de tiamina

2.1.2 Riboflavina

2.1.2.1 Estructura y propiedades generales.

La sustancia matriz de los compuestos de la familia de la riboflavina es la 7,8-dimetil-10(1'-ribitol) isoaloxacina (figura 2) y a todos los derivados se les aplica el nombre de flavinas (Fennema, 2000). La riboflavina está constituida por dos coenzimas, riboflavin mononucleótido (FMN) y un complejo químico llamada flavin-adenin-dinucleótido (FAD) (Analytical Methods Comité, 1999). Por otra parte, Valls, *et al.*, (1999), mencionan que tanto el FMN y el FAD, actúan como intermediarios en la transferencia de electrones en los procesos biológicos de oxidación-reducción.

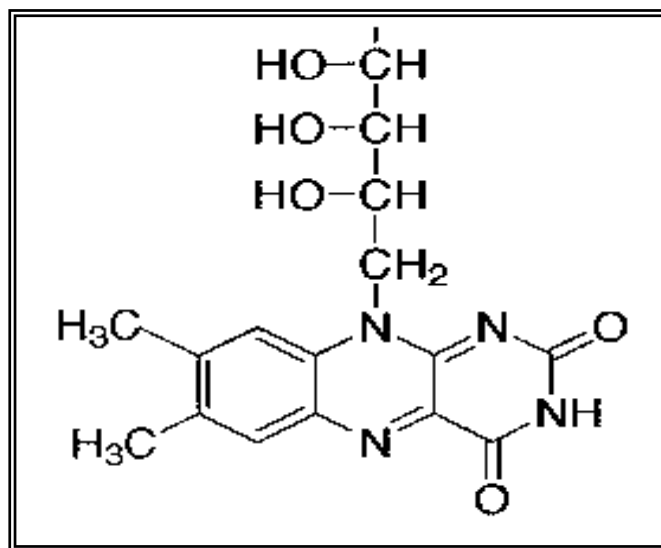
La asociación de químicos de vitaminas de España, (1969), definen a la riboflavina como un pigmento amarillo verdoso, fluorescente y soluble en agua, ampliamente distribuido en células vegetales y animales.

Es mucho menos soluble en agua y más resistente al calor que la tiamina. La vitamina es sensible a la luz solar; por ejemplo, si la leche se deja expuesta puede perder cantidades considerables de riboflavina. La riboflavina actúa como coenzima comprometida en la oxidación tisular.

La vitamina B₂ es requerida por el cuerpo para el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos. Así mismo, la riboflavina es necesaria para la activación de la vitamina B₆ y ayuda a la formación de la niacina (Ogles, *et al.*, 2004).

Esta vitamina es sintetizada por varios organismos fermentables pero los mamíferos, y en especial los humanos, no pueden sintetizarla (López y López, *et al.*, 1998). La vitamina B₂ se puede encontrar en productos como: carne, leche y huevos, los cuales tienen cantidades significantes de esta vitamina. Los alimentos derivados de plantas contienen bajos niveles de riboflavina (Russell, 2000). La dosis diaria de riboflavina es de 0.3 - 1.8 mg, es esencial para humanos pudiendo causar deficiencias (Lim, *et al.*, 2003).

Su deficiencia produce queilosis, dermatitis seborreica, vascularización corneal, coloración anormal de la lengua (Badui. 1990). Ogles, *et al.*, (2004), mencionan que la deficiencia de esta vitamina es regularmente relacionada con el alcoholismo, cataratas y anemia. Según Russell, (2000), puede causar lesiones en la piel, especialmente alrededor de la boca, nariz y orejas.



Fuente: www.pdrhealth.com

Figura 2. Estructura de riboflavina

2.1.2.2 Estabilidad y formas de degradación

La riboflavina exhibe su mayor estabilidad en medio ácido, es menos estable a pH neutro y rápidamente se degrada en condiciones alcalinas (Fennema, 2000). La riboflavina es estable durante procesos en los que se emplea calor, como son: la pasteurización, evaporación o condensación, teniendo un pequeño efecto en la variación de riboflavina presente en los alimentos (Severo, *et al.*, 2005).

La principal característica fisicoquímica que presenta la riboflavina es su fotosensibilidad. La exposición de la vitamina a la luz ultravioleta y a la luz visible tiene como resultado una fotoreducción irreversible perdiendo la actividad de la vitamina y produciendo dos productos biológicamente inactivos, la lumiflavina y el lumicromo (Russell, 2000). Numerosos estudios han mostrado que el procesamiento y almacenamiento de varios alimentos causa pérdida de la vitamina B₂ (Shimada, *et al.*, 1993). Las velocidades de degradación aumentan significativamente a una actividad de agua por encima del valor de la monocapa, cuando la temperatura es superior a la ambiente (Fennema, 2000).

Becker, *et al.*, (2003), mencionan que la vitamina puede absorber la luz y por su fotosensibilidad puede reaccionar activando al oxígeno y dando paso a la formación de radicales que provocan la degradación de lípidos y proteínas. Se ha encontrado que tanto la luz como el oxígeno inducen la degradación de la riboflavina. Por su sensibilidad a la luz, los análisis realizados para la determinación de esta vitamina se realizan en frascos oscuros previniendo la exposición por mucho tiempo con la luz. Tal es el caso de Gatti, *et al.*, (2005), que en su trabajo de determinación de vitaminas en la leche, explican que emplearon frascos ambar, y cubrieron los tubos y recipientes que utilizaron con papel aluminio para evitar la degradación de la vitamina.

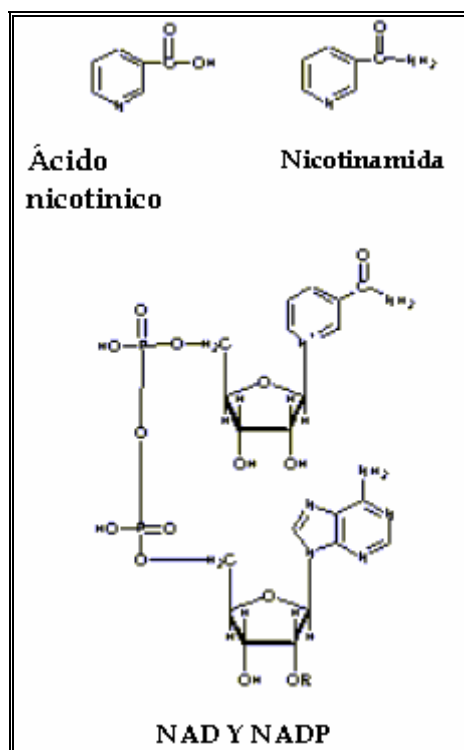
2.1.3 Niacina

2.1.3.1 Estructura y propiedades generales

La niacina es el término genérico que se aplica al ácido piridín-3-carboxílico (ácido nicotínico). (Figura 3) y a los derivados que exhiben una actividad vitamínica similar (Fennema, 2000). Las formas de coenzima de la niacina son nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD) y fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADP) (Vidal, *et al.*, 1991). El NAD y el NADP funcionan como coenzimas (en la transferencia de hidrógeno) en muchas reacciones de deshidrogenasa (Fennema, 2000).

La niacina se encuentra presente en varios alimentos como: cereales, semillas, carne y pescados. En general, la vitamina niacina en cereales y algunas semillas se encuentra principalmente en la forma de ácido nicotínico, por otra parte en carnes y en el pescado se encuentra en forma de nicotinamida (Russell, 2000).

Bioquímicamente las funciones de las coenzimas de la niacina son esenciales para la actividad de un gran número de sistemas enzimáticos (Lehninger, 1995). Están involucradas en el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. La nicotinamida puede también participar en la ribosilación de ADP (Russell, 2000). Su deficiente consumo da origen a la enfermedad llamada pelagra, que ocasiona problemas de diarrea, dermatitis y demencia (Badui, 1990).



Fuente: www.biopsicologia.net

Figura 3. Estructura de niacina

2.1.3.2 Propiedades fisicoquímicas.

La niacina, un derivado de la piridina, es una sustancia blanca cristalina, soluble en agua, sumamente estable y que ha sido sintetizada químicamente. Su función principal en el cuerpo es la oxidación tisular (www.fao.org). La niacina es una de las vitaminas hidrosolubles más estables (Russell, 2000).

La asociación de químicos de vitaminas,(1969), menciona que la niacina y la niacinamida son estables en forma seca y en soluciones acuosas, y no se ven afectadas por el pH. Es relativamente estable frente a agentes oxidantes fuertes.

Por su parte las coenzimas de la niacina son solubles en agua, pero su estabilidad depende del pH. Las formas reducidas NADH y NADPH, son estables en medios alcalinos pero se descomponen rápidamente en soluciones ácidas. En contraste, las formas oxidadas, NAD y NADP son inestables bajo condiciones alcalinas pero son estables en condiciones ácidas (Russell, 2000).

2.2 Cromatografía

2.2.1 Conceptos generales

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es la técnica de separación más ampliamente utilizada. La razón de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Skoog, *et al.*, 2001).

El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra llamada móvil, es desplazada al contacto con la primera (Rouessac y Rouessac, 2003).

Ayres,(1970), menciona que el análisis por elusión, es el procedimiento más utilizado en la cromatografía en columna. Una pequeña cantidad de la muestra se vierte en la parte superior de la columna, que previamente se ha saturado con disolvente puro. Después se añade de forma continua disolvente puro a la columna. Por una serie de desorciones y adsorciones sucesivas los componentes se trasladan a lo largo de la columna con velocidades diferentes, separados en zonas, y finalmente emergen de la columna. Según Tejeda, *et al.*, (1995), existen varias técnicas cromatográficas basadas en la interacción de una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Cuatro aspectos fundamentales permiten distinguir las semejanzas y diferencias entre ellas:

- El tipo de principio de separación que emplea cada una de ellas.
- Las características de las matrices que utilizan.
- La presión a la que se desarrollan
- La relación de equilibrio.

2.2.2 Columnas

La columna en cromatografía líquida se constituye normalmente en acero aunque también existen columnas construidas en vidrio, material polimérico y, en el caso de microcolumnas, sílice fundida. El material de relleno se mantiene en el interior del tubo mediante cierres porosos de metal o vidrio (Cela, *et al.*, 2002). El empaque de la columna esta constituido por partículas. El área de contacto y la eficacia en la separación de los componentes es función del tamaño de la partícula en el empaque (GBS Instrumentación, 2002). Skoog, *et al.*, (2001), reportan los típicos rellenos de las partículas porosas para cromatografía de líquidos los cuales están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm , con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado.

2.2.3 Tipo de detectores

El papel del detector es proporcionar información sobre la presencia de las especies separadas en la columna cromatográfica y, por tanto, al no existir un detector realmente universal deberá elegirse en función de las características de las especies de interés o bien, si no se dispone del detector más adecuado, se recomienda derivatizar las especies al objeto de hacerlas detectables con la instrumentación disponible. El detector más usual en los laboratorios analíticos es el de absorción UV/Visible (Cela, *et al.* 2002). Skoog, *et al.*, (2001), mencionan los detectores más comúnmente empleados en prácticas de laboratorio son:

- Detector ultravioleta-visible

En los detectores UV-vis, los equipos contienen una fuente de radiación para la región visible y otra para la región ultravioleta. Esta luz se hace incidir sobre una rejilla holográfica, lo cual dispersa esta luz y produce un espectro de diferentes longitudes de onda. Las diferentes longitudes de onda inciden sobre una abertura o rendija, ajustada de tal manera que solo pasa la línea o banda espectral deseada a través de ella. Esta luz de una longitud de onda específica se hace pasar por la muestra, la cual absorbe un porcentaje proporcional a la concentración del analito de interés. Después de pasar por la muestra, llega a un fotodetector que la convierte en una señal eléctrica y posteriormente esta señal es amplificada ya que es muy pequeña. Por último esta señal eléctrica se lleva a un registrador o un sistema de manejo de datos.

- Detector de índice de refracción

El disolvente en su camino hacia la columna pasa a través de la mitad de la cubeta y el efluente de la columna pasa por la otra mitad. Los dos compartimientos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo tal que si las dos disoluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación del haz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma.

- Detector de fluorescencia

Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia. El fenómeno de fluorescencia, se presenta cuando un electrón que ha sido desplazado a un nivel de energía más alto por la energía activante, vuelve a su nivel energético original liberando el exceso de energía que había absorbido o almacenado, provocando con ello radiación electromagnética visible. Si el átomo que lo contiene choca con otra partícula y le cede toda o parte de su energía, la fluorescencia o disminuye o se inhibe o no aparece. Un detector de fluorescencia consta de los siguientes componentes: una fuente de radiación luminosa, un monocromador de excitación, un monocromador de emisión, un sistema óptico, una microcelda de flujo y un tubo fotomultiplicador.

- Detector electroquímico

Estos dispositivos se basan en cuatro métodos electroanalíticos que incluyen la amperometría, la voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría. Ofrecen

las ventajas de una elevada sensibilidad, simplicidad, adecuación y una extensa aplicabilidad.

- Detector de conductividad

El detector de conductividad es un detector específico y sensible a los compuestos iónicos, por lo cual tiene un amplio campo de aplicación en muestras aniónicas, catiónicas, ácidos orgánicos, metales de transición y surfactantes.

2.2.4 Métodos de detección por espectrofotometría.

2.2.4.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible

La absorción de radiación ultravioleta o visible proviene de la excitación de los electrones enlazantes y como consecuencia, las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces que existen en las especies de estudio (Skoog, *et al.*, 2001).

Las aplicaciones cualitativas de la espectrometría de absorción dependen del hecho de que una cierta especie molecular sólo absorbe luz en regiones específicas del espectro y en grados variables característicos de dicha especie particular. Al resultado se le llama espectro de absorción de esa especie molecular y es la huella dactilar para propósitos de identificación (Willard, *et al.*, 1992).

Las características importantes de los métodos espectrofotométricos y fotométricos incluyen (a) amplia aplicabilidad tanto a sistemas orgánicos como inorgánicos, (b) sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-5} M, (c) de moderada a alta selectividad, (d) buena precisión y (e) fácil y adecuada adquisición de datos.

Las variables que influyen en el espectro de absorción de una sustancia incluyen la naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, las concentraciones elevadas de electrolito y la presencia de sustancias interferentes (Skoog, *et al.*, 2001).

2.2.4.2 Espectrofotometría de fluorescencia

El término que se aplica a la reemisión de luz previamente absorbida es luminiscencia. Dentro de la fotoluminiscencia molecular, los fotones de radiación electromagnética excitan a las moléculas, puesto que las moléculas que han absorbido luz están en estados electrónicos más altos, deben perder sus excesos de energía para regresar al estado normal. Si la molécula excitada regresa al estado normal emitiendo luz exhibe fotoluminiscencia. La espectroscopia de fluorescencia ha adquirido un papel de importancia en el análisis, debido a que en los compuestos aplicables la fluorescencia produce una alta sensibilidad y es un método muy específico. La alta sensibilidad resulta de la diferencia de longitudes de onda entre la radiación de excitación y la de fluorescencia. Esto produce una señal traza con una de fondo casi inexistente; siempre es más fácil medir directamente una señal pequeña que una diferencia entre dos señales de gran magnitud. El alto grado de resolución específica proviene de que este método se basa en dos espectros: de excitación y de emisión (Willard, *et al.*, 1992). Los espectros fluorescentes y fosforescentes implican excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión como función de la longitud de onda (Skoog, *et al.*, 2001).

2.2.5 Migración cromatográfica: conceptos cinéticos

La dispersión zonal en cromatografía se debe básicamente a tres factores: DA, difusión axial; MT, multiplicidad de trayectos; y RTM, resistencia a la transferencia de masa.

El primero presenta una dependencia inversamente proporcional con la velocidad de flujo de la fase móvil; el segundo es prácticamente independiente del flujo; y el tercero es directamente proporcional al flujo. Para conseguir la eficiencia máxima habrá que fijar un flujo de elución tal que el ensanchamiento sea mínimo; es decir, buscar una solución de compromiso entre dos factores que operan de forma inversa, la difusión axial y la resistencia a la transferencia de masa (García-Segura, *et al.*, 2002).

Al aumentar el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil disminuye el factor k (mayor o menor retención) de los solutos. Esta disminución es muy acusada, y así, como regla general, el factor k disminuye a la mitad por cada incremento del 10% en el disolvente orgánico. En equipos de HPLC es frecuente combinar eluciones isocráticas con gradientes continuos más o menos tumbados. De esta forma se pueden conseguir muy buenas separaciones, a la que contribuye la simetría esencial de los picos de elución resultantes.

En cromatografía de fase inversa sobre soportes de sílica, hay que tener presente la existencia de grupos silanoles. A pH en torno a la neutralidad, estos silanoles presentarán cargas negativas, dando cuenta de interacciones electrostáticas con los solutos básicos, y de repulsiones electrostáticas con los ácidos. Estos efectos se verán potenciados al aumentar el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil.

El resultado será que los solutos con cierto carácter iónico fluirán en forma de picos asimétricos; los de carácter ácido con menores tiempos de retención de lo que les correspondería, y los básicos con mayores. También es aconsejable trabajar con fase móviles de fuerza iónica moderada (0.1 – 0.3 M). Ello aumenta la retención hidrofóbica a la vez que disminuye las interacciones electrostáticas inespecíficas. En la elección de la fuerza iónica del tampón acuoso hay que tomar en consideración la solubilidad de la sal en el disolvente orgánico, a fin de prevenir posibles precipitaciones durante la elusión en gradiente. Los disolventes orgánicos más populares son el metanol y el acetonitrilo, pues tienen puntos de bloqueo ultravioleta relativamente bajos, viscosidades también bajas, y se pueden obtener con suficiente pureza (García-Segura, *et al.*, 2002).

Para manejar en forma adecuada de las muestras que tienen sustancias tanto de adsorción débil como de adsorción fuerte, las velocidades de la migración de bandas deben cambiarse durante el proceso cromatográfico programando el disolvente, con lo cual se logra en forma gradual el valor óptimo del factor de capacidad (k') para cada soluto. La programación del disolvente implica modificar la fase móvil sea en etapas o en forma continua, para aumentar la fuerza de dicha fase móvil como eluyente durante la separación.

La temperatura de la columna durante una prueba cromatográfica tiene ciertos efectos. Cuando la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición se mantienen constantes, los materiales que se separan a diferentes temperaturas son los mismos. Al aumentar la temperatura, los valores de k' disminuyen y los picos resultan más agudos (Willard, *et al.*, 1992).

2.3 Antecedentes bibliográficos de los métodos para la determinación de las vitaminas seleccionadas

Actualmente, la síntesis de las vitaminas se realiza sin problemas partiendo de sustancias químicas puras, sometidas a reacciones particulares y bajo la acción de agentes físicos y químicos (Gallot, 1981). El manual de la AOAC, (1984), usado para la estimación de vitaminas hidrosolubles emplea procedimientos de extracción y reacciones químicas, seguidos de métodos fluorométricos, espectrofotométricos y microbiológicos (Swan-Choo, *et al.*, 1996). Li, *et al.*, (2001), mencionan otros métodos de identificación como son de absorción atómica, electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución.

Siong, *et al.*, (1996), mencionan que los métodos empleados por la AOAC, son tediosos y requieren de mucho tiempo. Además, pueden ser no satisfactorios por la interferencia causada por otros componentes de la muestra (Fernando, *et al.*, 1990). La elección del método usualmente depende de la sensibilidad y la interferencia que se encuentre en la muestra (Hurtado, *et al.*, 1997). En años recientes se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de varios componentes incluyendo las vitaminas (Swan- Choo, *et al.*, 1996). EL método de HPLC con detector fluorimétrico y UV ha sido utilizado ampliamente por su alta sensibilidad y especificidad (Ndaw, *et al.*, 2002). Los detectores fluorimétricos y espectrofotométricos acoplados a HPLC han sido empleados para el análisis de las vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂ y la nicotinamida tanto en preparaciones farmacéuticas como en fuentes naturales (Fernández, *et al.* 2001 y Bianchini, *et al.*, 1998). La técnica de HPLC es más sensible y más selectiva que la mayoría de los otros métodos (Martínez, *et al.*, 2001).

2.3.1 Determinación de tiamina

Para la determinación de tiamina se requiere una hidrólisis ácida de la muestra y para una determinación total de tiamina, los ésteres fosfato son convertidos a tiamina usando hidrólisis enzimática. La detección se presenta a una absorbancia por UV en un rango de 230-270 nm. Sin embargo, puede haber interferencia por otros compuestos como los ácidos nucleicos. Con el interés de incrementar la sensibilidad y selectividad, la tiamina es derivatizada por oxidación alcalina para su determinación fluorimétrica. Su longitud de excitación es de 365 -375 nm y su emisión es de 425 – 435 nm (Fennema, 2000).

2.3.2 Determinación de riboflavina

Existen tres métodos generales para analizar la riboflavina; fluorimétrico, microbiológico y con animales en estudios de laboratorio (Asociación de químicos de vitaminas, 1969).

Las flavinas son compuestos muy fluorescentes en su forma de flavoquinona totalmente oxidada. Los procedimientos de ensayo tradicionales para determinar la riboflavina total en los alimentos implica la medida de la fluorescencia (Fennema, 2000).

La extracción de la riboflavina de los alimentos generalmente involucra una separación de las proteínas por una hidrólisis ácida (Sánchez-Machado, *et al.*, 2004), seguida por una desfosforilación enzimática (Esteve, *et al.*, 2001). La acidificación y la hidrólisis enzimática garantizan una hidrólisis completa del FAD y el FMN a riboflavina (Valla, *et al.*, 1999). Algunos autores como Esteve, *et al.*, (2001), y Hägg, (1994), utilizan al final de las hidrólisis el ácido tricloroacético para precipitar las proteínas presentes.

Las vitaminas generalmente se cuantifican por HPLC con detectores de fluorescencia o UV (Sánchez-Machado, *et al.*, 2004; Ndaw, *et al.*, 2002; Wehling *et al.*, 1984; Ang, *et al.*, 1980). Los métodos que utilizan detectores de fluorescencia son generalmente más sensibles y específicos que los U.V. (Sánchez – Machado, *et al.*, 2004).

2.3.3 Determinación de niacina

Varios métodos han sido usados para determinar los niveles de niacina en alimentos. Estos incluyen el procedimiento: tradicional colorimétrico; el microbiológico usando *Lactobacillus planrarium*, y varios métodos cromatográficos (Juraja, *et al.*, 2003). El análisis químico principal implica la reacción de la niacina con bromuro de cianógeno y ácido sulfúrico (Vidal, *et al.*, 1991), para rendir una piridina N-sustituida que reacciona después con una amina aromática formándose un cromóforo (Fennema, 2000).

La niacina está normalmente ligada a otros compuestos químicos, y tiene que ser liberada por hidrólisis con ácidos o álcalis fuertes o por tratamientos enzimáticos, antes de poder aplicar los métodos analíticos (Asociación de químicos de vitaminas, 1969). Se dispone de diversos métodos HPLC para la determinación del ácido nicotínico y la nicotinamida de los alimentos. La técnica con HPLC se ha utilizado para determinar individualmente las formas libres y ligadas de niacina (Fennema, 2000).

En las tablas 1y 2 se muestran algunas condiciones cromatográficas señaladas por algunos autores para la identificación y cuantificación de las tres vitaminas.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para la determinación de las vitaminas B₁ y B₂, propuestas por diferentes autores.

Referencia	Vitaminas	Columna	Fase móvil	Detección de B ₂	Detección de B ₁
Fernando y Murphy, (1990)	B ₁ , B ₂	C ₁₈ de 4.5 x 150 mm (R.p)	Acetonitrilo 0.01 M (pH 5.5) y acetato buffer (13: 87). Flujo 1.2 ml/ min	λ_{EX} : 436 nm λ_{EM} : 535 nm	λ : 364 nm
Ekinci y Kadakal, (2005)	Vitamina C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , piridoxina, ácido fólico, biotina.	C ₁₈ de 4.6 x 150 mm	0.1 M de KH ₂ PO ₄ (pH 7) y metanol (90:10) Flujo 0.7 ml/min	λ : 266 nm	λ : 234 nm
Presoto, et al., (2004)	B ₁ , B ₂	C ₁₈ de 4.6 x 250 mm	pH 3.6; ácido hexanosulfónico, hidróxido de amonio, acetonitrilo y agua (0.09:0.05:0.02:90.84) Flujo 1.0 ml /min	λ_{EX} : 450 nm λ_{EM} : 525 nm	λ : 245 nm
Ismail y Sook, (2003)	Vitamina C, β -caroteno, B ₂	C ₁₈ de 4.0 x 250 mm	Metanol-agua-ácido acético glacial (65:35:0.1) Flujo 1.0 ml/ min	λ : 270 nm	
Severo, et al., (2005)	B ₂	C ₁₈ de 4.6 x 250 mm, 5 μ m	0.1 mol/L acetato de sodio, 35 mmol/L cloruro de calcio, 25 mmol/L EDTA:metanol (65:35) Flujo 1.0 ml/min	λ_{EX} : 420 nm λ_{EM} : 530 nm	

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de niacina según varios autores.

Referencia	Vitaminas	Columna	Fase móvil	Detección de B ₃
Ekinci y Kadaka, I (2005)	Vitamina C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , piridoxina, ácido fólico, biotina	C ₁₈ de 4.6 x 150 mm	0.1 M de KH ₂ PO ₄ (pH 7) y metanol (90:10) Flujo 0.7 ml/min	λ: 261 nm
Swan-Choo y E-Siong, (1996)	Complejo B y ácido ascórbico.	C ₁₈ de 30 cm por 3.9 mm (I.D)	Metanol-ácido acético glacial – agua (24.5:0.5:75) con 5 mM PIC B-5	λ: 260 nm
LI y Chen, (2001)	Vitaminas del complejo B, Vitamina C, A, D ₃ , E, Biotina, ácido fólico.	C ₁₈ de 300 x 3.9 mm, 10 μm	Metanol – 0.1 M KH ₂ PO ₄ (pH 7.0)- agua (10:90:0) Flujo 1.5 ml/min	λ: 261 nm
Hurtado, <i>et al.</i> , (1997)	Nicotinamida, piridoxal, piridoxina, piridoxinamina, ácido fólico, riboflavina.	C ₁₈ de 4.6 x 250 mm	Metanol-agua (15:85), pH 3.6 Flujo 1.9 ml/min.	λ: 261 nm

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Patrones y reactivos químicos

Las soluciones estándar fueron preparadas de la siguiente manera: de tiamina (Fluka, Suiza) se pesaron 0.015 g y se disolvió en etanol al 20% (Bakei, Edo. México, México). El ácido nicotínico (Fluka, St. Louis, MO, USA), se preparó disolviendo 0.015 g del patrón en agua ultra pura (Nano pure Diamond, Barnstead). Para riboflavina (Fluka, Seelze, Alemania), se pesaron 0.015 g y se disolvieron en ácido acético 0.02 N (Productos químicos Monterrey, Nuevo León, México), todas las soluciones fueron preparadas en matraces volumétricos de 50 ml con sus respectivos disolventes.

La fase móvil esta constituida por dos soluciones: solución buffer KH_2PO_4 pH 6.7, ajustado con hidróxido de sodio 0.1 N (Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México) y metanol grado HPLC (Tedia Way, Fairfield, OH USA).

3.2 Equipo y condiciones HPLC

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un equipo HPLC-UV (GBC, Dandenong, Australia). Equipado con un auto muestreador LC1650, un desgasificador de solventes LC1460, una bomba LC1150, termostato de columna LC1150 y un detector fotodiodo en serie LC5100, los resultados obtenidos fueron analizados con el software WinCrom. El análisis cromatográfico fue realizado usando una columna analítica (250 mm x 4.6 mm) SS Exsil ODS con un tamaño de partícula de 5 µm.

Para obtener las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis, se evaluaron los siguientes parámetros: diferentes velocidades de flujo de la bomba (0.4 ml/min, 0.7 ml/min, 0.8 ml/min, 1.0 ml/min), diversas temperaturas de la columna (28°C, 30°C y 35°C) y varias concentraciones de buffer KH_2PO_4 (5mM, 20mM y 40mM), todo esto con la finalidad de que el método fuese más preciso y exacto. Las longitudes de onda que se manejaron se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Longitud de onda para la detección de las vitaminas con detector ultravioleta

Vitamina	Detección UV
Tiamina	Longitud de onda: 234 nm
Riboflavina	Longitud de onda: 266 nm
Niacina	Longitud de onda: 262 nm

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos preliminares para la identificación de las vitaminas.

Los ensayos se realizaron con el propósito de encontrar las condiciones óptimas para la identificación de las vitaminas y para lograrlo se probaron diferentes concentraciones y pH del buffer KH_2PO_4 que constituye la fase móvil; velocidades de flujo de la fase móvil; composición de la fase móvil y temperatura de la columna.

Inicialmente se determinó el espectro de absorción de cada una de las tres vitaminas utilizando en cada caso soluciones estándar, en la figura 4 se muestran los espectros de las vitaminas en el siguiente orden: (a) tiamina (B_1), (b) riboflavina (B_2), y (c) niacina (B_3), obtenidos a 30 °C; buffer 5 mM KH_2PO_4 (pH 6.7) – metanol (60:40) y flujo 0.8 ml/min, de acuerdo a las condiciones sugeridas por Ekinci y Kadakal, (2005) y Hägg, (1994), con algunas modificaciones.

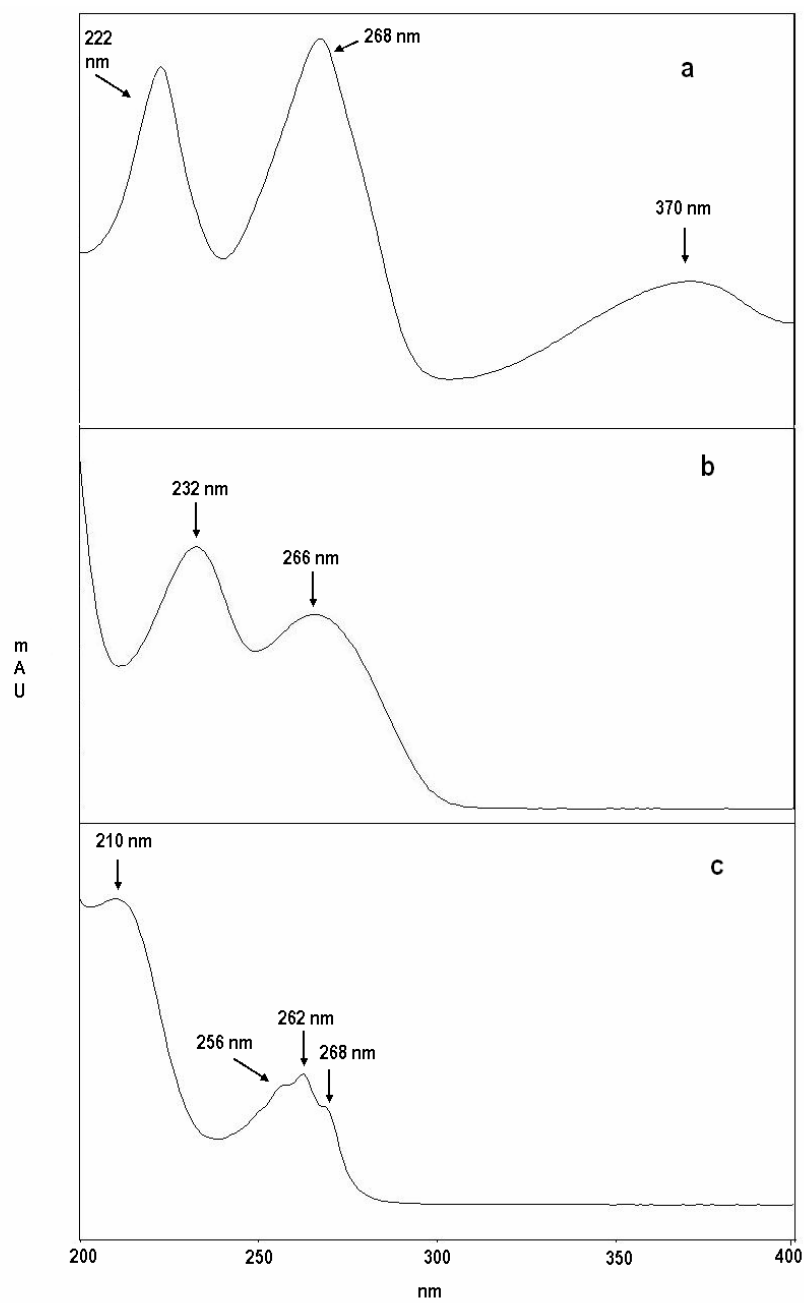


Figura 4. Espectro de absorción de las tres vitaminas: a: riboflavina, b: tiamina y c: niacina.

En lo que respecta al espectro de la vitamina B₁ se tuvieron dos máximos a una longitud de onda de 232 y 266 nm. Con. En el espectro de la vitamina B₂ se observan tres máximos a una longitud de onda de 222, 268 y 370 nm. En el espectro correspondiente a la vitamina B₃ se tienen cuatro máximos a una longitud de onda de 210, 256, 262 y 268 nm.

De acuerdo a Swan-Choo y Siong, (1996), las longitudes de onda de detección para las vitaminas B₁, B₂ y B₃ corresponden a 246, 266 y 260 nm, respectivamente. Mientras que Ponder, *et al.*, (2004), utiliza una longitud de onda de 254 nm para tiamina y niacina, y de 366 nm para riboflavina. Por otra parte, Li, *et al.*, (2001), emplean una longitud de onda para tiamina, riboflavina y niacina de 234, 266 y 261 nm, respectivamente. En esta investigación se utiliza una longitud de onda de 234, 266 y 262 nm para tiamina, riboflavina y niacina, respectivamente.

Algunos autores como Fernando y murphy, (1990), Presoto, *et al.*, (2004) y Severo, *et al.*, (2005), determinan las tres vitaminas con un detector de fluorescencia, la riboflavina al ser fluorescente se detecta fácilmente para el caso de la tiamina y niacina es necesario hacer una derivatización con ferrocianato de potasio, para que pueda ser detectada.

4.2 Optimización de los parámetros cromatográficos

4.2.1 pH de la solución buffer KH₂PO₄

Se probaron dos diferentes pH de la solución buffer, para lograr obtener la mejor resolución de los picos de interés. El primer pH que se utilizó fue de 4.11, que corresponde a la solución buffer KH₂PO₄ sin ajustar. A este pH se inyectaron las soluciones estándar de manera independiente y se registró un tiempo de retención

para tiamina 11.312 min, con una altura de 33.034 mAu, para riboflavina 11.584 min y una altura de 13.229 mAu y la niacina un tiempo de 3.140 min con una altura de 72.572 mAu, tal como se muestra en la figura 5. Posteriormente se inyectó una mezcla de las tres soluciones estándar que contenía 2 ml de niacina, 1 ml de tiamina y 1 ml de riboflavina, todas ellas tomadas de sus respectivas soluciones estándar con una concentración de 15 mg diluida en 50 ml de disolvente. La primera vitamina en eluir fue la niacina, a 3.229 min y una altura de 95.67 mAu, la cual tuvo una buena resolución, mientras que los picos de la vitamina B₁ y B₂ tuvieron un tiempo de retención de 11.637 y 11.135 min, respectivamente, al tener tiempos de retención similares sus picos estaban sobrepuestos. En la figura 6 se muestra el cromatograma de la mezcla de vitaminas a un pH 4.11. Ekinci y Kadakal, (2005), señalan que a pH inferiores de 7 se obtiene una pobre resolución de las vitaminas hidrosolubles, y con esto la probabilidad de picos empalmados.

De acuerdo a Sánchez Machado, *et al.*, (2004), al utilizar una solución buffer de acetato de amonio pH de 6.7 se obtiene una separación de tiamina y riboflavina, ya que la tiamina es iónica, mientras que la riboflavina no, permitiendo la separación de sus picos, ya que la tiamina se retiene por más tiempo en la columna.

Debido a lo anterior se realizaron ensayos utilizando un buffer de KH₂PO₄ 5mM ajustado a un pH de 6.7, este se prepara adicionando NaOH 0.1N a la solución buffer KH₂PO₄. Se inyectaron las soluciones estándar de manera independiente y los tiempos de retención para las vitaminas B₁ (c), B₂ (b) y B₃ son 17.913, 9.144 y 2.974 min, respectivamente, en las figuras 7 y 8 se muestran los cromatogramas bajo estas condiciones. También se analizó una mezcla con las tres vitaminas y se observó que con el cambio de pH se logró una buena separación de los picos de riboflavina y tiamina. Al igual que con un pH de 4.11, la niacina fue la primera en eluir con un

tiempo de retención de 2.935 min, la segunda fue la riboflavina con un tiempo de retención de 9.053 min y por último la tiamina con un tiempo de retención de 17.302 min, en la Figura 6 se ve con claridad la separación de las tres vitaminas.

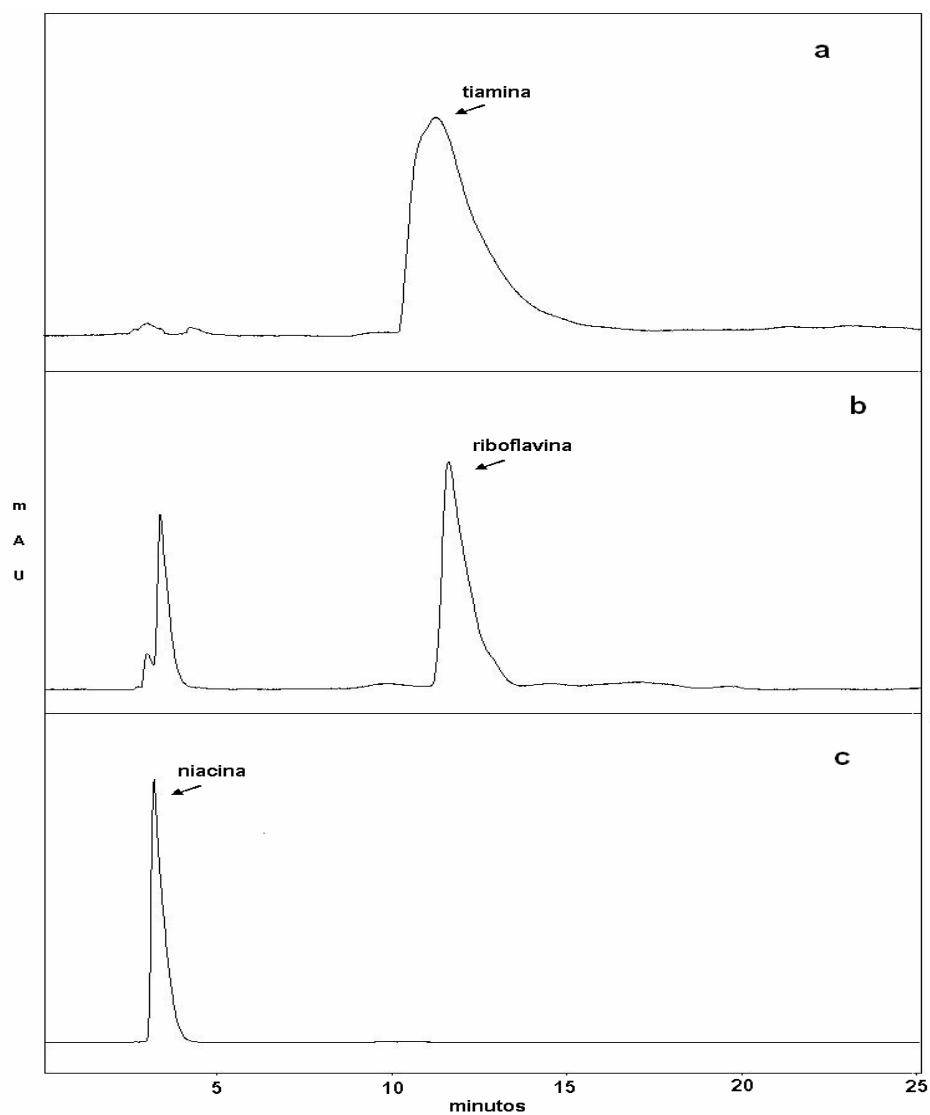


Figura 5. Cromatograma de las soluciones estándar de tiamina (a), riboflavina (b) y niacina (c) con buffer KH_2PO_4 (pH 4.11) y metanol como fase móvil

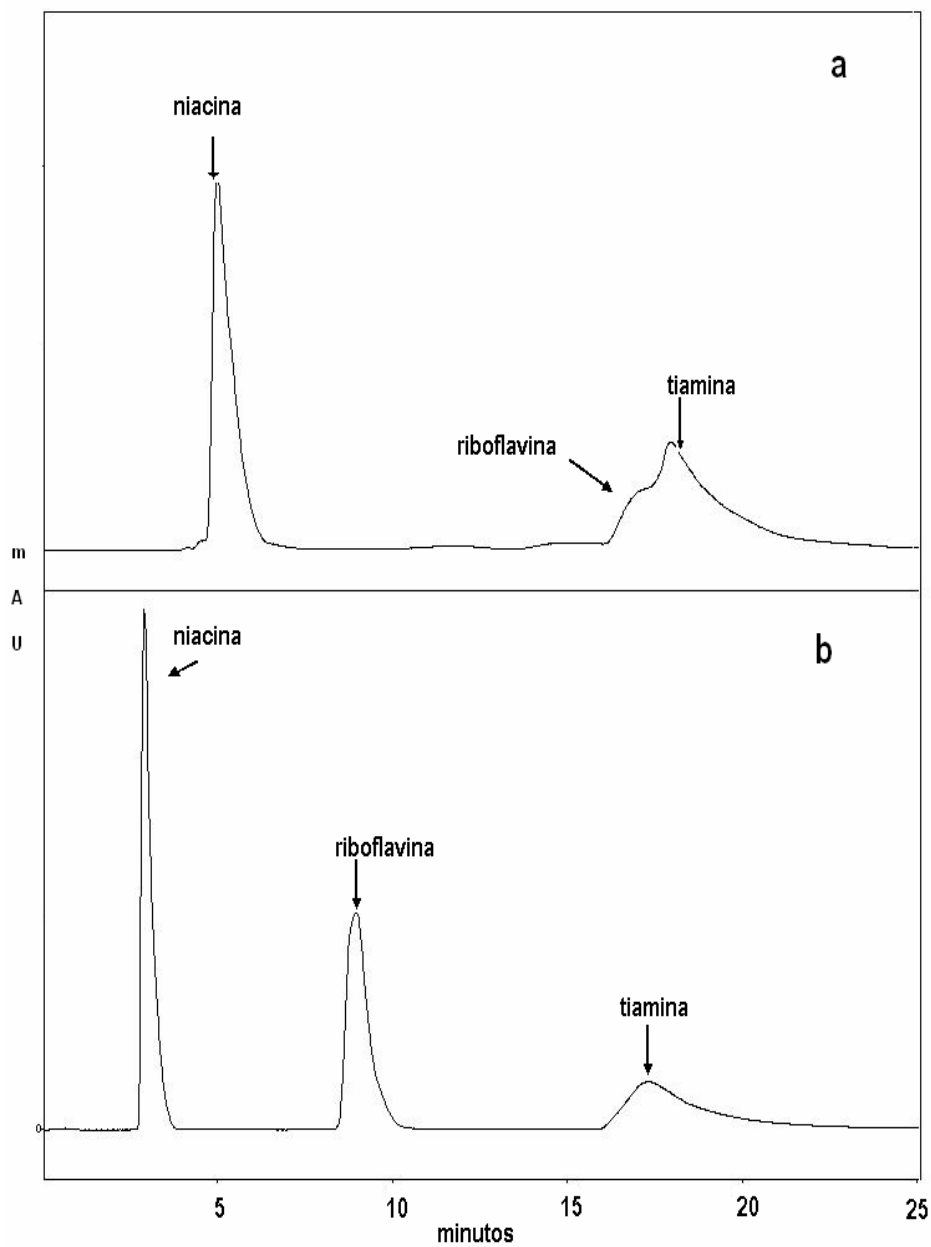


Figura 6. Comparación de cromatograma de la solución estándar de vitaminas en buffer KH_2PO_4 a diferentes pH. a: pH 4.11 y b: pH 6.7

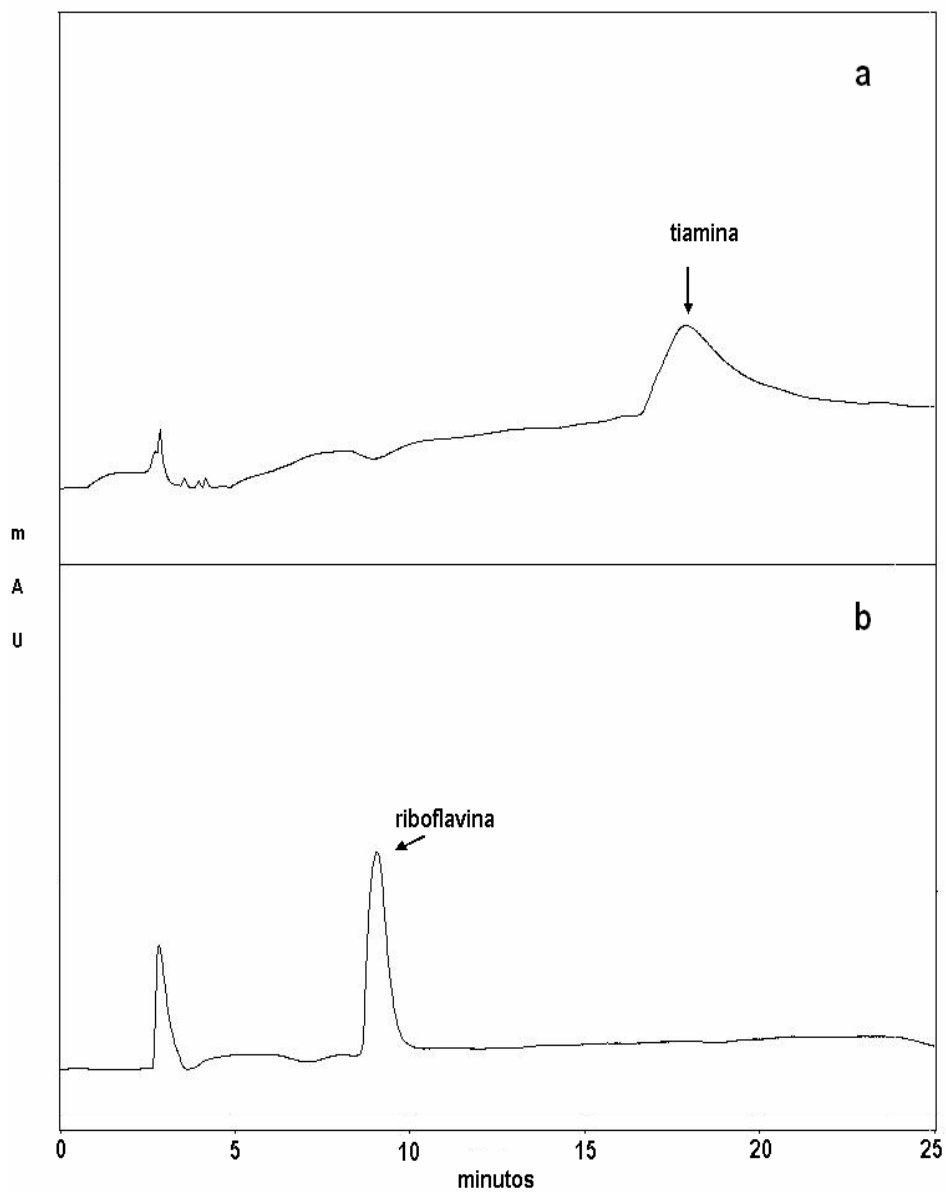


Figura 7. Cromatograma de la solución estándar de tiamina (a) y riboflavina (b), en fase móvil de buffer KH_2PO_4 pH 6.7 y metanol (60:40)

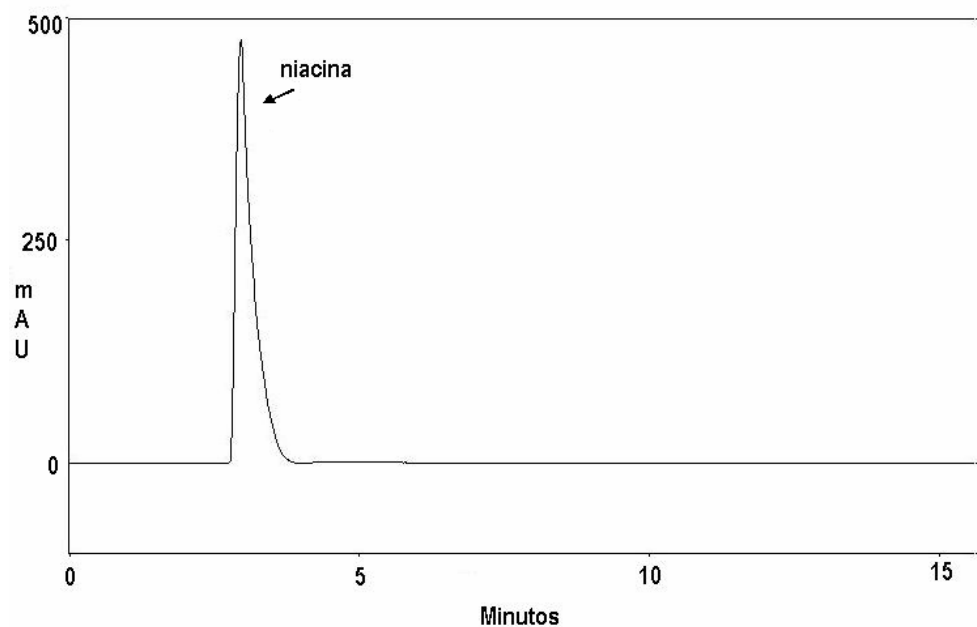


Figura 8. Cromatograma de solución estándar de niacina, con una solución buffer KH_2PO_4 pH 6.7 y metanol (60:40)

Por lo tanto, con una solución buffer KH_2PO_4 , pH 6.7, se tiene una mejor separación de los picos de interés que con un pH 4.11.

4.2.2 Concentración de la solución buffer KH_2PO_4

Según varios autores la solución buffer KH_2PO_4 , es utilizada para el análisis cromatográfico en la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles, tal es el caso de Ekinci y Kadakal, (2005), que utilizaron este buffer a 100 mM, y Dawson, *et al.*, (1988), utilizaron 20 mM.

En esta investigación se utilizaron concentraciones de 5, 20 y 40 mM, evitando altas concentraciones ya que pudieran ocurrir precipitaciones de la sal durante la elución y

ocasionar daños en el equipo. Según Willard, *et al.*, (1992), la adición de una pequeña cantidad de fosfato a la fase móvil suele agudizar los picos.

En la figura 9, se muestra el análisis cromatográfico de un mezcla de las tres vitaminas, realizado con una fase móvil compuesta de metanol y solución buffer de fosfato 5 mM (pH 6.7) y una temperatura de la columna de 30 °C.

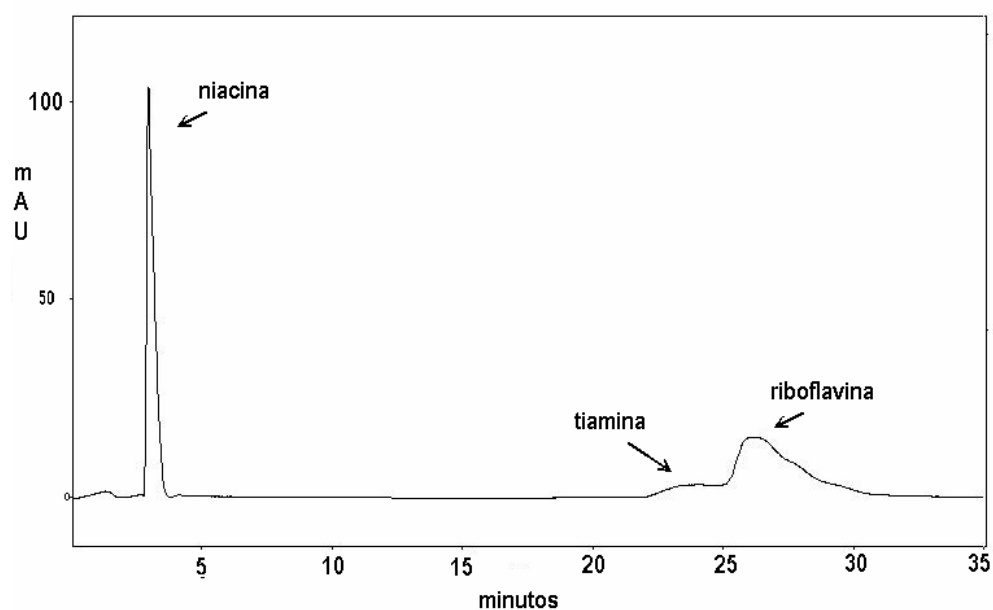


Figura 9. Cromatograma resultante de la mezcla de soluciones estándar de las tres vitaminas con buffer KH_2PO_4 5 mM (pH 6.7) y metanol (70:30)

La primera vitamina en eluir fue la niacina a un tiempo de retención de 2.986 min, después tiamina con un tiempo de 23.585 min y por último riboflavina con un tiempo de retención de 26.101 min. Como se puede observar los picos de la tiamina y riboflavina están sobrepuestos.

Posteriormente se trabajó con una solución buffer de concentración 20 mM (pH 6.7), se inyectó la mezcla de las tres soluciones estándar, a 30 °C. El cromatograma resultante se puede ver en la figura 10.

Se observó que con buffer KH_2PO_4 20 mM hay una mejor separación de los picos cromatográficos de las vitaminas que con la concentración de 5 mM, se muestran mejor resueltos y con tiempos de retención diferentes. A esta concentración la niacina tiene un tiempo de retención de 3.488 min, después eluyó la tiamina a 11.176 min, y por último la riboflavina a 18.255 min.

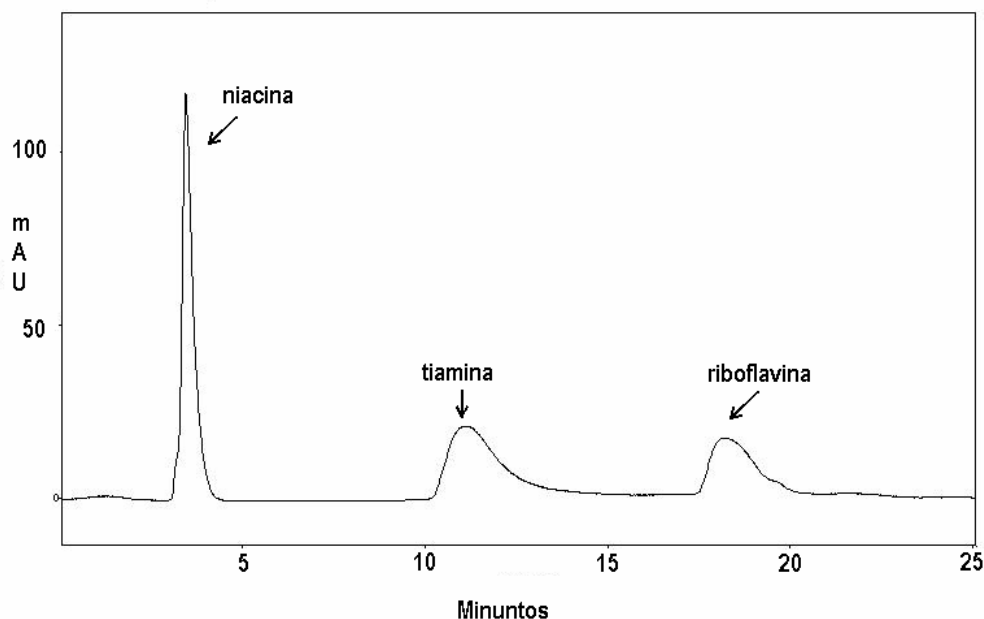


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de soluciones estándares con buffer KH_2PO_4 20 mM (pH 6.7) y metanol (65:35)

También se hicieron ensayos con KH_2PO_4 40 mM y pH 6.7, a 30 °C, inyectándose la mezcla de las tres vitaminas. El cromatograma resultante se muestra en la figura 11.

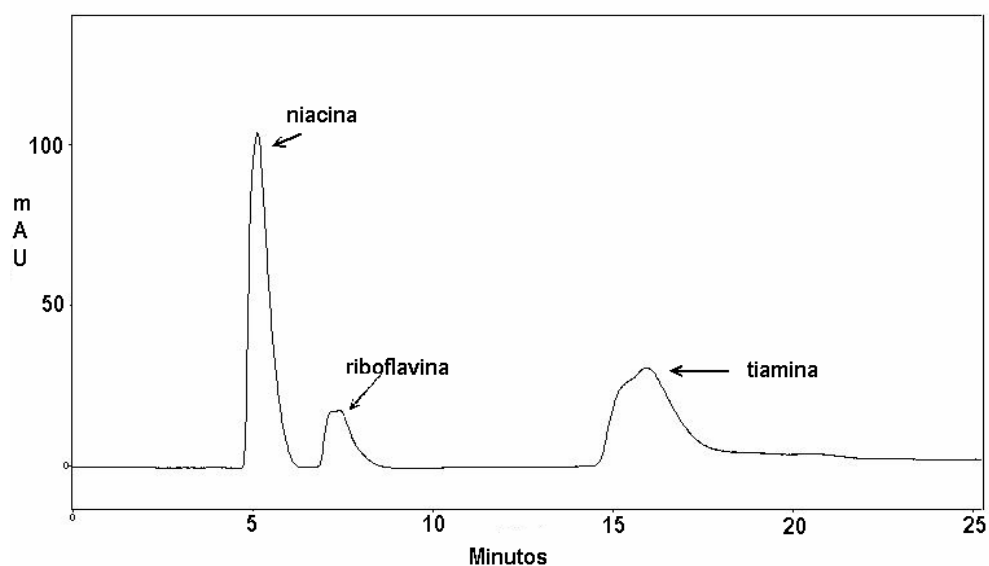


Figura 11. Cromatograma de una mezcla de tres soluciones estándares en buffer KH_2PO_4 40 mM (pH 6.7) y metanol (56:44)

A esta concentración se tiene una buena separación de los picos y los tiempos de retención cambian, la niacina tiene un tiempo de retención de 5.11 min, la riboflavina eluye primero que la tiamina con un tiempo de 7.462 min y 15.968 min, respectivamente.

A una concentración de 40 mM KH_2PO_4 se observa que los picos tienen una mejor resolución y se encuentran separados, que en la de 5 mM y 20 mM, además que toda las vitaminas disminuyen su tiempo de retención, optimizando el análisis.

4.2.3 Velocidad de flujo de la fase móvil y temperatura de la columna

En esta investigación se utilizaron varios flujos de la fase móvil con el propósito de encontrar el óptimo. Los flujos fueron 0.4 ml/min, 0.7 ml/min, 0.8 ml/min, 1.0 ml/min. Se encontró que el flujo de 0.8 ml/min era el mejor. A una mayor velocidad de flujo de la fase móvil se tendrá un menor tiempo de retención y a una menor velocidad de flujo se tiene un mayor tiempo de retención (García-Segura, *et al.*, 2002).

La temperatura de la columna en un análisis cromatográfico tiene efectos en los picos de elución, ya que al aumentar la temperatura disminuyen los tiempos de retención y si la temperatura desciende los tiempos de retención son mayores y los picos tienden a ensancharse (Skoog, *et al.*, 2001). En este trabajo se utilizaron principalmente tres temperaturas de columna de 28, 30 y 35 °C, siendo la mejor a 30 °C, tal como se muestra en la figura 12.

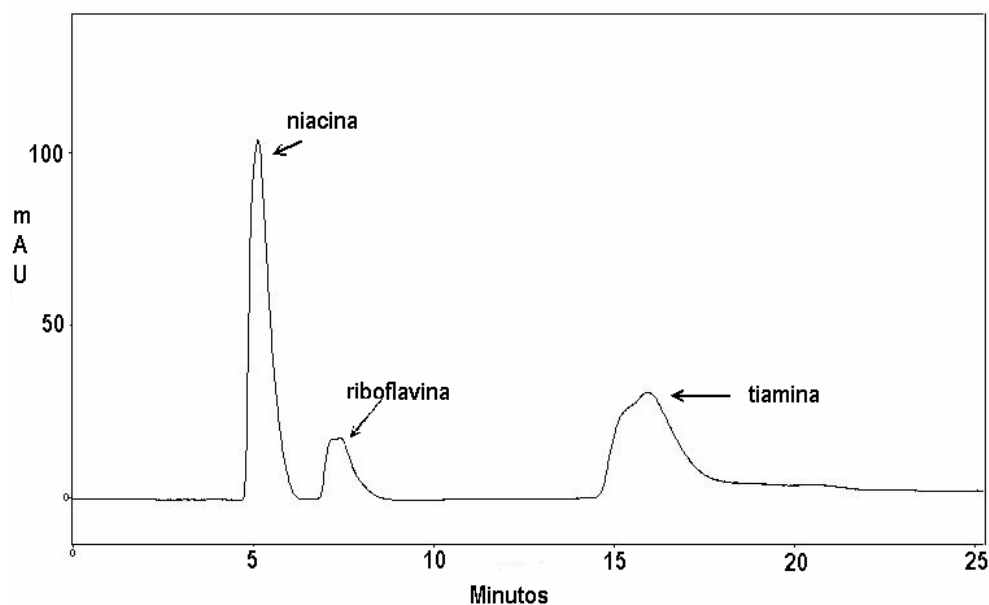


Figura 12. Cromatograma del análisis por HPLC de la mezcla de soluciones estándar realizado a 30 °C

4.2.4 Relación de los componentes de la fase móvil

Otro factor importante para lograr una buena resolución de los picos de elución es la proporción de cada componente de la fase móvil. En esta investigación se utilizaron dos componentes, el primero es una solución buffer KH_2PO_4 a un pH de 6.7, que actúa como regulador y el segundo es metanol utilizado como disolvente orgánico. El disolvente juega un papel importante dentro de la fase móvil, ya que su disminución o aumento afecta directamente la elución de los solutos. Se sabe que al aumentar el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil se disminuye el tiempo de retención de los solutos y se logra una mejor separación (García-Segura, *et al.*, 2002).

En investigaciones realizadas por varios autores, se sugieren diferentes composiciones de la fase móvil, tal es el caso de Hâgg, (1994), quien utilizó una relación de 35% de metanol y 65% de buffer KH_2PO_4 , teniendo una resolución óptima de los picos eluidos; Ekinci, *et al.*, (2005), emplearon una relación de metanol: buffer de 10:90, obteniendo una buena resolución de los picos de elución pero con un tiempo de retención largo; Dawson, *et al.*, (1988), utilizaron una relación de 70:30, buffer de fosfato: metanol, obteniendo picos sobrepuestos.

Se han utilizado otros buffer para la identificación de estas vitaminas, como buffer de ácido heptanosulfónico 5mM (pH 2.7) utilizado por Valls, *et al.*, (1999); acetato de sodio 10 mM (Silva, *et al.*, 2005) y Esteve, *et al.*, (2001), que utilizaron ácido octanosulfónico 5 mM.

Para conocer la proporción más adecuada de relación solución buffer de fosfato y metanol se manejaron diferencias relaciones: 60:40, 65:35, 70:30 y 56:44.

Para realizar una comparación entre el efecto de tres proporciones de buffer: metanol (60:40, 65:35 y 70:30), se inyectó una mezcla de soluciones estándar y las tres inyecciones tenían las mismas condiciones y una concentración de solución buffer 5mM (pH 6.7).

El pico que eluyó primero fue el correspondiente a la niacina a un tiempo de 3.229 min, el segundo fue la riboflavina a los 11.135 min y por último la tiamina a los 11.637 min. La tiamina y riboflavina sus picos están empalmados.

Posteriormente se inyectó la misma mezcla de estándares, a la misma concentración de buffer 5 mM (pH 6.7), con una relación metanol y buffer de 30:70. La vitamina B₃ fue la primera en eluir con un tiempo de retención de 2.995 min, la B₂ a 19.925 min y la B₁ con un tiempo de retención de 21.010 min.

La otra proporción que se utilizó para buffer KH₂PO₄ 5mM fue de 65% de buffer y 35% de metanol. Se inyectó la mezcla de estándares, bajo las mismas condiciones anteriores. Los tiempos de retención registrados fueron de 2.977 min para niacina, para riboflavina un tiempo de 11.913 min y la tiamina a un tiempo de 19.043 min.

En la figura 13 se muestra los picos sobrepuestos para las tres proporciones de buffer KH₂PO₄ 5mM: metanol de 60:40 (a); 70:30 (b) y 65:35 (c).

Se estudiaron las mismas proporciones pero con diferentes concentraciones de la solución buffer, en la figura 14 se muestra el cromatograma resultante de la inyección hecha a la mezcla de estándares, con una concentración de la solución buffer de 20 mM (pH 6.7) y una proporción de buffer–metanol de 65:35.

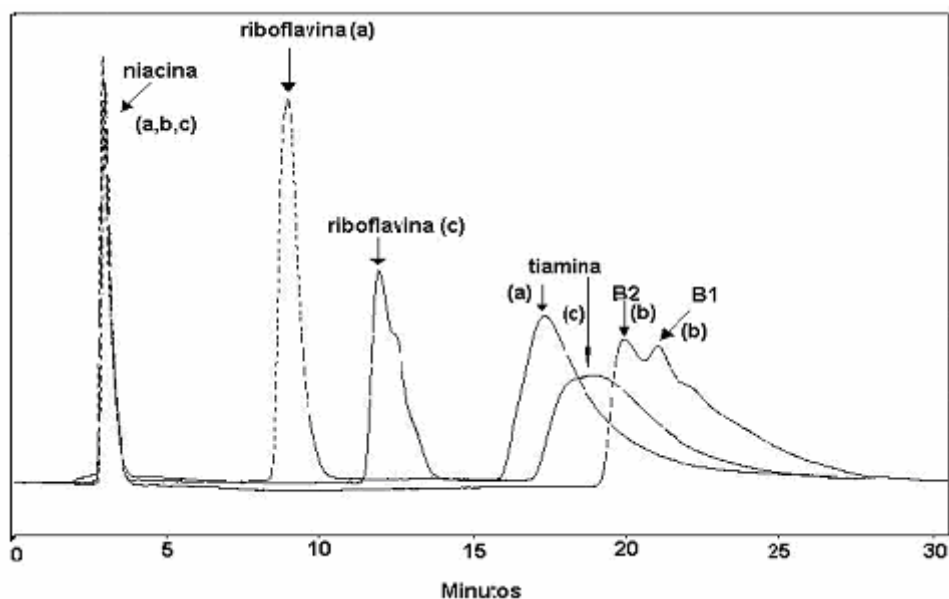


Figura 13. Cromatogramas que ejemplifican la composición de la fase móvil.
 a: buffer KH_2PO_4 5 mM-metanol (60:40); b: buffer KH_2PO_4 5 mM y metanol (70:30) y c: buffer KH_2PO_4 5 mM-metanol (65:35)

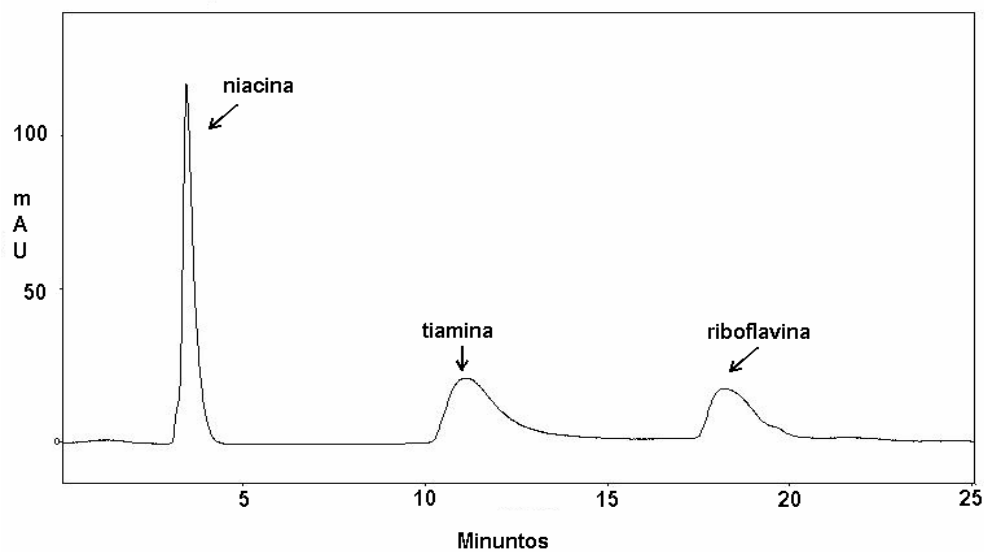


Figura 14. Cromatograma de la mezcla de soluciones estándar con una relación buffer KH_2PO_4 20 mM-metanol, 65:35

Se obtuvieron tiempos de retención de 3.488, 11.176 y 18.255 min para la niacina, tiamina y riboflavina, respectivamente y se tiene una buena separación de los picos de elución. Además, el orden de elución cambia, eluyendo primero la tiamina y después la riboflavina.

Con la solución buffer de fosfato 40 mM (pH 6.7), se experimentaron dos proporciones de buffer-metanol. En la figura 15, se observa la relación buffer-metanol de 65:35, realizada a la mezcla de estándares, registrando un tiempo de retención de 3.272 min para la niacina, 4.671 min para riboflavina y 6.646 min para tiamina.

A esta proporción de buffer-metanol, y con la concentración de 40 mM, se tiene una buena separación de los picos y las vitaminas tienen un tiempo de retención más corto que con las otras dos concentraciones de la solución buffer.

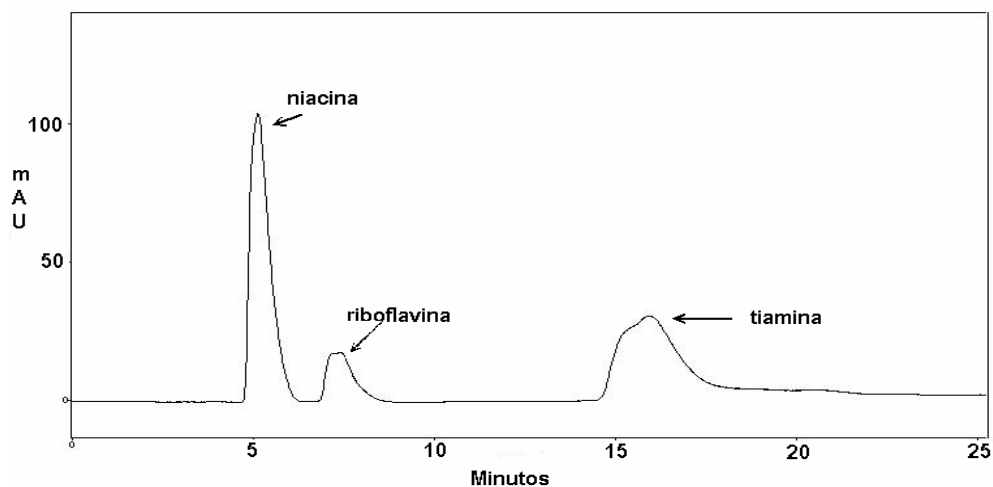


Figura 15. Cromatograma de la solución estándar de las tres vitaminas con una relación buffer KH_2PO_4 40 mM–metanol (56:44)

4.2.5 Tiempo de uso de la columna

Durante la investigación se reemplazó la columna por otra con menos tiempo de uso. En la figura 16, se muestra el cromatograma de la mezcla de estándares, con una proporción de buffer 40 mM–metanol, de 56:44. Se registró un tiempo de retención de 5.166, 7.462 y 15.968 min, para niacina, riboflavina y tiamina respectivamente.

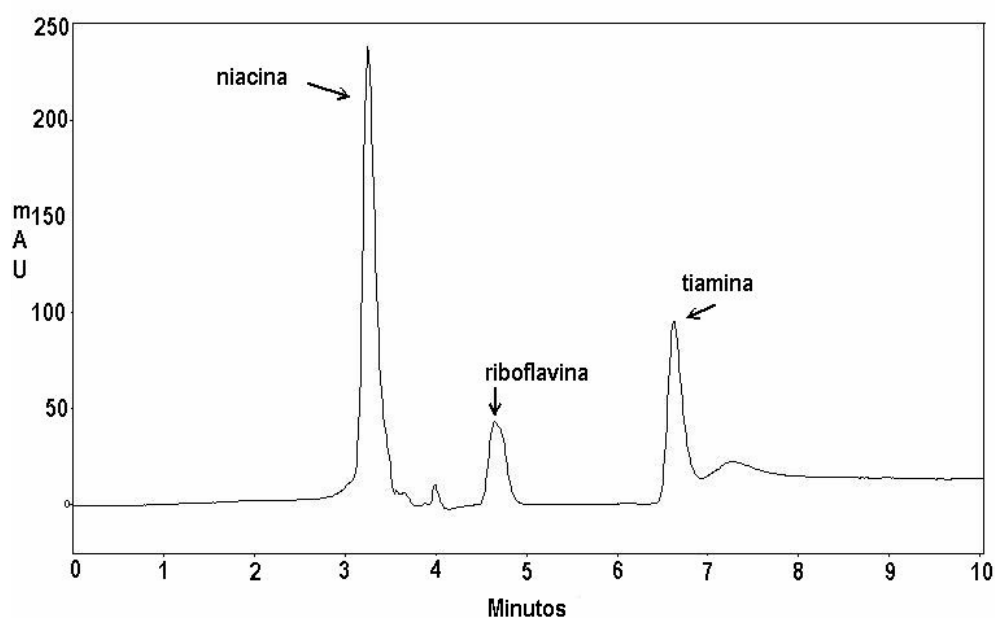


Figura 16. Cromatograma de la solución estándar de las vitaminas en una fase móvil de buffer KH_2PO_4 40mM–metanol, 65:35

Se puede observar el cambio que hubo en los tiempos de retención que se obtuvieron al cambiar de columna, siendo menores que los logrados con la columna anterior.

CONCLUSIÓN

- En este trabajo se logró desarrollar un método HPLC para la optimización de las condiciones de identificación y separación de las vitaminas B₁, B₂ y B₃, el cual podría ser utilizado para su cuantificación en soluciones estándar, preparados farmacéuticos y alimentos.
 - Se observó que al aumentar el pH y la concentración de la solución buffer KH₂PO₄ se tiene una adecuada resolución de las tres señales cromatográficas correspondientes a las vitaminas; además, la relación de los constituyentes de la fase móvil influyen en el tiempo de retención y al utilizar una mayor proporción de fase orgánica se obtienen tiempos de retención más cortos y una mejor resolución.
-
-

BIBLIOGRAFÍA

Albalá-hurtado S., Veciana-Nogués M.T., Izquierdo-Pulido M. y Mariné-Font Al. (1997). **Determination of water- soluble vitamin in infant milk by High Performance Liquid Chromatography**. Chromatography A. 778. 247- 253.

Analytical methods committee. (1999). **Determination of thiamine and riboflavin in pet foods and animal foodingstuffs**. Piccadilly, London.

Ang Y. W.C. y Moseley A.F. (1980). **Determination of thiamine and riboflavin in meat ans meat products by High Pressure Liquid Chromatography**. Agric food chem vol 23. No. 3. 483-486.

Asociación de químicos de vitaminas, inc. (1996). **Métodos de análisis de vitaminas**. Editorial Academia. España.

Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (A.E.F.I). (2000). **Validación de métodos analíticos**. Barcelona, España.

Ayes G (1970). **Análisis químico Cuantitativos**. Segunda edición. Editorial Aldina. Madrid. Pág. 181-182.

Badui S. (1990). **Química de los alimentos**. Tercera edición. Editorial Alambra Mexicana. México. Pág. 329

Bianchini R. y Camargo Penteado M. (1998). **Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em lentes bovinos comercializados na cidade de Sao Paulo**.

Becker M., Christensen J, Frederiksen C.S y Haugaard V.K. (2003). **Front-face fluorescente spectroscopy and chemometrics in análisis of yogurt: rapid analysis of riboflavin**. Dairy Sci. 86:2508-2515.

Cela R., Rosa L., Casais M. (2002). **Técnicas de separación en química analítica**. Primera edición. Editorial Síntesis. España.

Cuezva J., Vázquez J. y Mayor F., publicado en Herrera. **Bioquímica Tomo I**. España.

Dawson R. K.i, Unklesbay . F N. y Hedrick H. (1988). **HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate Heteroprocessing methods**. Agric food. Chem. 36: 1176-1179.

Ekinci R. y Kadakal C. (2005). **Determination of seven water soluble vitamins in tarhana, a traditional turkish cereal food, by High Performance Liquid Chromatography.** Acta chromatographica. No. 15. 289-297.

E- Siong T. y Swan Choo K. (1996). **Simultaneous determination of B-vitamins and ascorbic acid in multi-vitamin preparations by reversed-phase HPLC.** Mal J. Nutr 2; 176-194

Esteve M. J., Farré R., Frívola A., García Cantabella J. M. (2001). **Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in mushrooms by Liquid Chromatography.** Agric food chem. 49, 1450-1455.

Fennema O. (2000). **Química de los alimentos.** Segunda edición. Editorial Acribia. S.A. España.

Fernández C., González S. y Travieso L. (2001). **Determinación de vitaminas del complejo B en Arthrospira máxima por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.** Ars Pharmaceutia. 42: 3-4; 171-183.

Fernando M S. y Murphy P. (1990). **HPLC determination of thiamin y riboflavin in soybeans and tofu.** Agric food chem , 38. 163-167.

Gallot S. (1981). **Las vitaminas.** Primera Edición. Ediciones Oikos-tau. España. Pág. 57.

García-Segura J., Gavilanes J., Martínez del Pozo Á.o, Montero F., Oñaderra M. y Vivanco F. (2002). **Técnicas Instrumentales de análisis en bioquímica.** Segunda edición. Editorial Síntesis, S.A. Vallehermoso, Madrid.

Gatti R y Gioia MG. (2005). **Liquid Chromatographic determination with fluorescent detection of B₆ vitamins and riboflavin in milk and pharmaceutical.** Analytica Chimica, acta 538, 135-141.

GBC Instrumentación. (2002). **Curso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.** México.

Hägg M. (1994). **Effect of various Commercially Available enzymes in the Liquid Chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods.** Journal of AOAC International. Vol.77 No.3, 681-686.

Ismail A. y Sook Fun C. (2003). **Determination of vitamin C, β - carotene and riboflavin contents in five green vegetables organically and conventionally Grown.** Mal. J Nutr 9(1): 31-39.

Juraja S., Trenerry C. , Millar R., Scheelings, Buick D. (2003). **Asia Pacific food analysis network (APFAN) training exercise: the determination of niacin in cereals by alkaline extraction and high performance liquid chromatography.** Food composition and analysis. Vol 16, 93-106.

Lehninger L. A. (1995). **Bioquímica.** Segunda Edición. Ediciones Omega. S.A.P . Pág.341-348.

Li.B.H y Chen F. (2001). **Simultaneous determination of twelve water-and fat-soluble vitamins by High Performance Liquid Chromatography with diode array detection.** Chromatographia. Vol. 54. 270.273.

Lim Sung H., Ming H., Park E. y Choi J . (2003). **Improvement of riboflavin production using mineral support in the culture for *Ashbya gossypii***. Food Technol. Biotechnol. 41 (2), 137-144.

López y López-Leytón T.J, Large Yuste M.A y Álvarez Piñeiro M.E. (1998). **Constant- wavelength synchronous spectrofluorimetry for determination of riboflavin in anchovies**. Fresenius J.Anal Chem . 362: 341-343.

Martínez-Galera M, López-López T, Gil-García M.D, Martínez- Vidal J.L y Parilla Vázquez P. (2001). **Determination of benzoylureas in tomato by High Performance Liquid Chromatography using continuous on-line post- elution photoirradiation with fluorescent detection**. Chromatography A.918, 79-85.

Ndaw S, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner D. HasselmannC. (2002). **Extraction procedures for the Liquid Chromatography determination of thiamin, riboflavin and vitamina B₆ in foodstuffs**. Food Chemistry 71, 129-138 .

Ndaw S, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner D. HasselmannC. (2002). **Enzymatic extraction procedure of the Liquid Chromatography determination of niacin in foodstuff**. Food Chemistry 78, 129-134.

Otles S. y Hisil Y. (2004). **The vitamin B₂ content of fresh and stored hen eggs**. Electronic Journal of polish agricultural universities, food science and technology, volume 7, Issue 2 .

Presoto F. A., G.Rios M. D. y B. de Alemisa-Muradian L. (2004).**Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic analisis of vitamins B₁ , B₂ and B₆ in royal jelly**. Braz. Chem. Soc., Vol.15, No. 1, 136-139.

Ponder E.L, Fried B y Sherma J. (2004). **Thin –layer Chromatographic analysis of hidrophilic vitamins in stnadars and from *Helisoma trivolvis* snails.** Acta chromatographica. No. 14, 70-81.

Rouessac F y Rouessac, A. (2003) **Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas.** Ed. Mc. Graw Hill.

Russell Faley L. publicado en Mollet M.L. Leo. (2000). **Food análisis by HPLC.** Segunda edicion, editorial Board. USA. Pag. 634-692.

Sánchez- Machado D.I., López Cervantes J., López Hernández J. y Paseiro Losada P. (2004). **Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in Edible Marine Seaweeds by High Performance Liquid Chromatography.** Chromatographic Science, Vol. 42, 1-4.

Severo Silva Luiz, Trevisan G,M, Rath Susanne, J.Popi Ronei y G.R. Reyes Felix. (2005). **Chromatographic determination of riboflavin in the presence or tetracyclnes in skimmed and full cream milk using fluorescente detection.** Braz Soc., Vol 00, No. 001. 1-5.

Shimada K., Nakagawa S., Hotta K., Shibata K.i y Yagi T. (1993). **Effect of processing and storage an the fate of vitamins B₁, B₂ and B₆ and nicotinamide of sea Urchin Ganads.** Agric Food Chem, Vol 41. N0. 7, 1021-1025.

Skoog A. D., Holler F. J., Nieman A. T. (2001). **Principios de análisis instrumental.** Quinta Edición. Editorial Mc Grall Hill. España. Pág. 731, 1028.

Swan-Choo K. y E-siong T. (1996). **Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B- vitamins and ascorbic acid.** Mal. J. Nutr 2: 49-65.

Tejada A., Montesinos R., Guzmán R. (1995). **Bioseparaciones.** Editorial UNISON. México. Pág. 404, 417-431.

Valls F., Sancho M.T., Fernando-Muriño M.I y Checa M. A. (1999). **Determination of total riboflavin in cooked sausages.** Agric Food Chem. 47, 1067-1070.

Vidal-Valverde y Reche A. (1991). **Determination of available Niacin in Legumes and meta by High performance liquid chromatography.** Agric . Food, CHEM, 39, 116-121.

Willard H. H., Merritt L., Dean J., Settle F.. (1992). **Métodos Instrumentales de análisis.** Editorial continental, S.A. de C.V. México, Pág. 95, 133, 544.548, 563-566.

Waheling R. y Wetzel D. (1984). **Simultaneous cereal products by High Performance Liquid Chromatographic.** Agric Food Chem, 32. 1326-1931.

Digitografía:

- ❖ www.essex.ac.uk, consultado el día 18 de abril del 2006.
- ❖ www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/006/W0073S/w0073s0f.htm, consultado el día 21 de febrero del 2006.
- ❖ <http://www.biopsicologia.net/fichas/fig-08-0004.gif>, Consultado el día 26 de Mayo del 2006.