

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE VITAMINAS TIAMINA B₁, RIBOFLAVINA B₂, NIACINA B₃ Y ÁCIDO FÓLICO B₉ UTILIZANDO HPLC

L. M. Moncada y J. Ruiz***

Aprobado: Septiembre 8/2000

Key words: Vitamins, Complex B, HPLC.

RESUMEN

En la separación, identificación y cuantificación convencional de las vitaminas del complejo B, se utilizan métodos físicos, químicos y microbiológicos para cada una de ellas en forma independiente, lo que hace necesaria la preparación diversa de la muestra de análisis, incrementando el costo y el riesgo de deterioro de las vitaminas durante la determinación. En este trabajo se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), con una columna Purospher RP-18 encapped y usando como fase móvil el gradiente acetonitrilo: buffer fosfato en dos concentraciones (0,04 y 0,02 M) pH 2,8 y detección en rango ultravioleta 261 y 267 nm en un tiempo de análisis de 30 minutos. Se obtuvo una separación bien definida en la secuencia: tiamina, ácido nicotínico, nicotinamida, ácido fólico y riboflavina. El método fue validado en las condiciones del laboratorio y se concluyó que los resultados obtenidos para las diferentes vitaminas muestran que el método se puede aplicar y reproducir en forma adecuada y confiable con los siguientes valores de referencia: precisión en

función del coeficiente de variación: para B₁(0,087), B₂(0,019), B₃ ácido y amida(0,02 y 0,075), B₉(0,015); exactitud en función del porcentaje de recuperación para B₁(100,7), B₂(99,9), B₃ ácido y amida(84,7 y 96,2), B₉(96,5); linealidad en función de la ecuación de regresión R² B₁(0,984), B₂(0,998), B₃ ácido y amida(0,998 y 0,999), B₉(0,983); límites de detección en mg/l B₁(3,25), B₂(0,242), B₃ ácido(2,48), B₉(0,10) y límites de cuantificación en mg/l B₁(13,76), B₂(0,40), B₃ ácido y amida(3,57 y 0,293), B₉(0,41).

Este método fue aplicado para determinar el contenido de vitaminas B₂ y B₃ en 5 muestras de cereal de trigo fortificadas en ejercicios de eficiencia con 25 laboratorios miembros, obteniendo para la riboflavina 2,34 - 1,87 - 2,28 mg/100 g y para la niacina 26,04 - 24,35 mg/100 g con respecto al promedio del grupo 2,04 - 1,88 y 2,79 para riboflavina, 26,88 y 30,20 mg/100 g para niacina respectivamente.

ABSTRACT

In the conventional separation, identification and quantification of vitamins of the complex B, physical, chemists and microbiology methods are used an inde-

* Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

** Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos.
E-mail: luzmym@latino.net.co

pendent form for each one of them. That makes necessary the preparation of diverse the sample analysis, increasing the cost and the risk of deterioration of the vitamins during the determination. In this work the Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was used, with a column Purospher RP-18 encapped and using as mobile phase the gradient acetonitrile:Buffer phosphate in two concentrations (0,04 and 0,02 M) pH 2,8 and detection in an ultraviolet range 261 and 267 nm in an analysis time of 30 minutes. A very defined separation was obtained in the sequence: thiamin, nicotinic acid, nicotinamide, folic acid and riboflavin. The method was validated in laboratory conditions and concluded that the results obtained for the different vitamins show that it could be applied and reproduce in appropriated and reliable form with the following reference values. Precision in function of the variation coefficient for B₁(0,087), B₂(0,019), B₃ acid and amide(0,02 y 0,075), B₉(0,015); accuracy in function of the recovery percentage for B₁(100,7), B₂(99,9), B₃ acid and amide(84,7 y 96,2), B₉(96,5), linearity in function of the regression R² for B₁(0,984), B₂(0,998), B₃ acid and amide(0,998 y 0,999), B₉(0,983), detection limits in mg/L B₁(3,25), B₂(0,242), B₃ acid(2,48), B₉(0,10) and quantification limits in mg/L B₁(13,76), B₂(0,40), B₃ acid and amide(3,57 y 0,293), B₉(0,41).

This method was applied to determine the vitamins content for B₂ and B₃ in 5 samples of fortified wheat cereal in exercises of efficiency with 25 laboratories members, obtaining for the riboflavin 2,34 - 1,87 - 2,28 mg/100 g and for the niacin 26,04 - 24,35 mg/100g with regard to the average of the group 2,04 - 1,88

and 2,79 for riboflavin; 26,88 and 30,20 mg/100 g for niacin respectively.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de la desnutrición causada por deficiencia de micronutrientes es un problema de salud pública en Colombia, lo que generó el desarrollo de una estrategia de prevención y control mediante la reglamentación oficial (1) que estableció la fortificación de la harina de trigo que se comercializa en el país con hierro y vitaminas (tiamina B₁, riboflavina B₂, niacina B₃, ácido fólico B₉). Con el fin de brindar apoyo analítico al sector de la salud y de la industria molinera y modificar el criterio de utilización de métodos tradicionales para la determinación de cada una de las vitaminas (2, 3) en este trabajo se validó el método para la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) para la determinación simultánea de las 4 vitaminas del complejo B. Se fundamentó en la metodología descrita por Harvey (4) a longitud de onda fija de 210 nm y un gradiente acetonitrilo buffer fosfato. Para la validación se utilizaron estándares grado cromatográfico de ácido nicotínico, nicotinamida, tiamina, HCl, ácido fólico y riboflavina. Para la determinación de los criterios de la validación se aplicaron las principales herramientas de la estadística básica (5, 6, 7) y las específicas descritas para cromatografía líquida (8).

PARTE EXPERIMENTAL

Estándares

Se prepararon soluciones acuosas concentradas (100 mg/L) de patrones grado

cromatográfico de tiamina, ácido nicotínico, nicotinamida, ácido fólico y riboflavina y a partir de ellas, mezclas de los 5 componentes en rangos de concentración entre 1 y 60 mg/L, durante un tiempo de análisis de 36-48 horas. Para la evaluación de estabilidad se mantuvieron todas las soluciones en refrigeración (4°C) envasadas en recipientes de vidrio, debidamente tapadas y protegidas de la luz.

Para la determinación de estabilidad de las soluciones acuosas de las diferentes vitaminas se realizaron inyecciones sucesivas durante un período de varios días, encontrando en todos los casos un tiempo de análisis adecuado dentro de las primeras 12 horas de preparada la solución, ya que posteriormente se disminuyó la concentración entre 5 y 20% dependiendo de cada vitamina. Para evaluar la precisión y exactitud se realizaron inyecciones sucesivas de 7 a 10 réplicas de soluciones de las vitaminas independientes y sus mezclas dentro de las primeras 12 horas de preparadas. Las series de datos obtenidas permitieron aplicar los criterios estadísticos necesarios (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación). El porcentaje de recuperación se evaluó en función de la exactitud de cada medición con relación al promedio de la serie. Una vez obtenida esta información y fundamentados en la respuesta lineal de la determinación aplicando ajuste por regresión R^2 y R ($y = mx + b$) para cada vitamina, se procedió a calcular para cada vitamina los límites de detección (0,10-3,25 mg/L) y los límites de cuantificación (0,29-13,75 mg/L), en función de los interceptos y la desviación estándar de los blancos.

Para la extracción de las vitaminas presentes en mezclas multivitaminicas y harina de trigo se utilizó solución de bicarbonato de sodio 1% con el fin de solubilizar el ácido fólico, y posteriormente se adicionó HCl 0,1 N con agitación permanente y sonicado para eliminar por completo la efervescencia por el CO_2 residual en la solución; luego de aforado se agitó y filtró o centrifugó antes de pasarlo por membrana de 0,5 μm antes de la inyección.

Condiciones cromatográficas

Se usó un cromatógrafo líquido Merck Hitachi con bomba cuaternaria Lachrom L-7100, detector UV-VIS Lachrom 7400, registrador D-7500, automuestreador Lachrom 7200; como fase estacionaria una columna Lichocart 250-4 Purospher RP-18 encapped 5 μm , con precolumna Lichocart 4-4 Lichrospher 100 RP-18 5 mm y como fase móvil un gradiente con los siguientes solventes: **A:** Acetonitrilo; **B:** Buffer fosfato 0,04 M pH 2,8; **C:** Buffer fosfato 0,02 M pH 2,8 en la siguiente composición: A/B/C de 0 a 2 min 0/100/0; de 2 a 3 min 2/0/98; de 3 a 8 min 12/0/88; de 8 a 16 min 17/0/83; de 16 a 20 min 50/0/50; de 20 a 30 min 0/100/0; flujo de 1 mL/min; con inyecciones de 20 ml; la longitud de onda utilizada fue de 261 nm en el intervalo 0 a 8 minutos y de 267 nm de 8 a 30 minutos.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Con base en los espectros de absorción obtenidos en las condiciones de ensayo contra blanco de fase móvil en el tiempo de retención de cada una de las vitaminas, se estableció un programa de análisis a longitud de onda de máxima absorbancia,

261 nm para tiamina y niacina ácida y amida, y 267 nm para ácido fólico y riboflavina. Los resultados obtenidos en la validación del método RP-HPLC en este trabajo (tabla 1), mostraron que la determinación simultánea de cuatro de las vita-

las que se presentó interferencia de matriz, en particular para la tiamina y el ácido fólico. Se han adelantado algunas etapas para optimizar el proceso de extracción y cuantificación en harinas de trigo fortificadas por legislación oficial

Tabla 1. Validación del método RP-HPLC para la determinación simultánea de las Vitaminas B1, B2, B3, B9

	Vitamina B1	Vitamina B2	Vitamina B3		Vitamina B9
	Tiamina	Riboflavina	Nicotínico	Nicotinamida	Ac. Fólico
Longitud de onda (nm)	261	267	261	261	267
Tiempo de retención (min)	2,8-3,5	15,9-16,5	4,8-5,5	8,3-9,0	13,5-14
Precisión (CV)	0,087	0,019	0,02	0,075	0,015
Exactitud	1,007	0,999	0,847	0,962	0,965
Linealidad (Y = mx b)					
Pendiente (m)	35423	79555	33233	3815	32892
Intercepto (b)	2858	719,8	23836	6675	6324
Ecuación de regresión R ²	0,9843	0,998	0,998	0,999	0,9825
Ecuación de regresión R	0,9921	0,9989	0,9989	0,999	0,9912
Límite de detección (mg/l)	3,25	0,242	2,48	—	0,10
Límite de cuantificación (mg/)	13,76	0,40	3,57	0,293	0,41
Estabilidad solución %	90	98	81	85	80

minas del complejo B, tiamina, niacina, ácido fólico y riboflavina por el método RP-HPLC y la detección UV presenta una calidad analítica confiable para los diferentes criterios estadísticos y gráficos tenidos en cuenta.

Como resultado de la determinación por RP-HPLC se obtuvo un cromatograma (figura 1) cuyas características y tiempos de retención permitieron identificar con muy buena resolución cada una de las vitaminas.

El método fue aplicado en mezclas multivitaminicas con excelentes resultados, no así en muestras de alimentos en

con estas cuatro vitaminas con resultados prometedores principalmente para la riboflavina y la niacina. El método valida-

Tabla 2. Valor promedio en mg/100 g de niacina y riboflavina, obtenidos en ejercicios interlaboratorio con muestras de cereales industrializados fortificados.

Vitamina	Laboratorios participantes	Nuestro laboratorio
Niacina	26,88	26,04
	30,20	24,35
	2,04	2,34
Riboflavina	1,88	1,87
	2,79	2,28

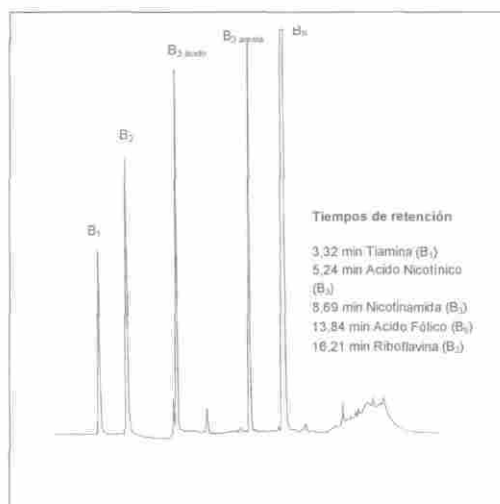


Figura 1. Cromatograma de vitaminas obtenido por RP-HPLC con columna RP-18-encapped, gradiente acetonitrilo buffer fosfato, detección ultravioleta.

do se ha utilizado en ejercicios de eficiencia interlaboratorio a nivel internacional, con 25 laboratorios y utilizando muestras de formulación de cereales de trigo para desayuno fortificados. Los resultados obtenidos fueron comparables con el promedio del grupo para estas dos vitaminas como se ilustra en la tabla 2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Salud. Harina de trigo fortificada. *Decreto 1944 de 1996*.
2. Deutsch, M. J. (1998). Vitamins and other nutrients in: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Maryland, USA. 16 edición, capítulo 45, 1-79.
3. Approved Methods of Vitamins (1995) *American Association of Cereal Chemists*. USA, (2), capítulo 86.
4. Harby, A. (1997). Separation of vitamin C and the vitamin B-group or purosphere RP-18e. *HPLC application note 960634 Merck*. Alemania.
5. Navarro, J. (1995). Estadística aplicada, Ediciones Díaz de Santos; Madrid, pp. 11-137.
6. Baird, D. C. (1988). Experimentación. *Una buena introducción a la teoría de mediciones y al diseño de experimentos*, Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México, pp. 111-172.
7. Miller, J. C., Miller, J. N. (1993). *Estadística para la Química Analítica*, Addison Wesley Iberoamericana S.A. Wilmington, pp. 87-119.
8. Quatrucci, O., Abelaira, S. I. Laba, R. F. (1992). Validación de métodos. *Introducción a la HPLC, aplicación y práctica*, Buenos Aires, p. 301.