

# UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

## AREA DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA



DETERMINACION DE VITAMINAS EN PRODUCTOS CARNICOS COCIDOS MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA.

I-OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE EXTRACCION Y ANALITICOS

II-EVALUACION DE LAS PERDIDAS VITAMINICAS DURANTE EL PROCESO INDUSTRIAL DE FABRICACION



FELICIDAD VALLS GARCIA

1997

Faint, illegible text at the top of the page.

Faint, illegible text in the upper middle section.

Faint, illegible text in the middle section.

Faint, illegible text in the lower middle section.

X730069876

**JOSE LUIS CABEZAS JUAN, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**AUTORIZA** a Dña. Felicidad Valls García a presentar el trabajo titulado “DETERMINACION DE VITAMINAS EN PRODUCTOS CARNICOS COCIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA. I-OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE EXTRACCION Y ANALITICOS II-EVALUACION DE LAS PERDIDAS VITAMINICAS DURANTE EL PROCESO INDUSTRIAL DE FABRICACION” realizado bajo la dirección de la **Dra. Dña. María Teresa Sancho Ortiz** y el **Dr. D. Martín Andrés Checa Andrés**, en el Laboratorio de Investigación de la empresa CAMPOFRIO ALIMENTACION, S.A. de Burgos.



A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. L. Cabezas Juan', written over a vertical line.

Fdo.: Prof. Dr. D. J. L. Cabezas Juan

Burgos, mayo de mil novecientos noventa y siete

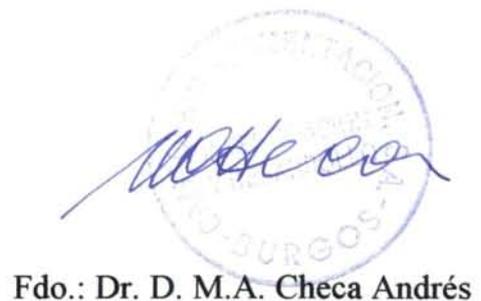
**MARIA TERESA SANCHO ORTIZ, PROFESORA TITULAR DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS Y MARTIN ANDRES CHECA ANDRES, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GESTION DE CALIDAD DE LA EMPRESA CAMPOFRIO ALIMENTACION, S.A.**

**CERTIFICAN:** Que la Tesis Doctoral titulada “DETERMINACION DE VITAMINAS EN PRODUCTOS CARNICOS COCIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA. I-OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE EXTRACCION Y ANALITICOS II-EVALUACION DE LAS PERDIDAS VITAMINICAS DURANTE EL PROCESO INDUSTRIAL DE FABRICACION”, presentada por la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. Felicidad Valls García, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Investigación de la empresa CAMPOFRIO ALIMENTACION, S.A.

Y para que conste, se expide la presente en Burgos, mayo de mil novecientos noventa y siete.



Fdo.: Prof. Dra. Dña. M.T. Sancho Ortiz



Fdo.: Dr. D. M.A. Checa Andrés

**AGRADECIMIENTOS**

Este estudio ha sido llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación de la empresa CAMPOFRIO ALIMENTACION S.A., durante 1992-1996.

Deseo expresar mi agradecimiento:

A los Directores de esta Tesis, Profesora Dra. Dña. María Teresa Sancho Ortiz y Dr. D. Martín Andrés Checa Andrés, sin cuyo apoyo e inestimable ayuda este trabajo no se hubiera realizado.

A la empresa Campofrío Alimentación S.A., por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por su amable colaboración en el suministro de todos los medios necesarios para el estudio. Al Departamento de Investigación y Desarrollo que se ha interesado por el trabajo.

Al Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Burgos que me ha animado en todo momento.

A mis padres especialmente, por su constante confianza y apoyo. A Luis por su paciencia y ayuda durante este tiempo.

Mi reconocimiento al Ministerio de Educación y Ciencia, que me concedió una beca de Formación de Personal Investigador para el desarrollo de esta memoria doctoral.

Y por último, a todos aquellos que de una u otra forma han colaborado también en esta labor.

Burgos, Mayo 1997

Fdo.: Felicidad Valls García



**A mis Padres**

**A mi Hermano**

**A Luis**

**ABREVIATURAS**

% = Tanto por ciento

± = Símbolo matemático de más/menos

$\lambda$  máx = Longitud de onda máxima

µg = Microgramo

µl = Microlitro

µm = Micrómetro

= = Símbolo matemático de igual

2,3-DCG = Acido 2,3-dicetogulónico

2,4-DNFH = 2,4-dinitrofenilhidracina

2,6-DCFI = 2,6- diclorofenolindofenol

a.C. = Antes de Cristo

AA-DHAA = Acido L-ascórbico / Acido dehidroascórbico

ACS = Reactivos especiales para aplicaciones específicas según ACS (American Chemical Society)

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

Apt = Apartado de correos

Art = Artículo

C/ = Calle

CAC = Ciclo del ácido cítrico

CAE = Código alimentario español

CDR = Cantidad diaria recomendada

cm = Centímetro

Co = Company

CoA = Acetilcoenzima A

Coef = Coeficiente

Ctra = Carretera

CV = Coeficiente de variación

d.C. = Después de Cristo

DAD = Detector de matriz de fotodiodos

DHEA = Acido dehidroeritórbico

DHIA = Acido dehidroisoascórbico

DI = Diámetro interno

- DL = Dextrógiro-Levógiro  
DPN = Difosfopiridinnucleótido  
EA = Acido eritórbico  
EDTA = Acido etilendiaminotetraacético  
et al = Y colaboradores  
FAD = Flavinadenindinucleótido  
FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación  
FL = Fluorescencia  
FMN = Flavinmononucleótido  
g = Gramo  
h = Hora  
HP = Hewlett Packard  
HPLC = High Performance Liquid Chromatography  
Hz = Hercio  
IAA = Acido isoascórbico  
IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry  
Kcal = Kilocaloría  
Kg = Kilogramo  
Km = Kilómetro  
l = Litro  
LPC = Cámara de baja presión  
M = Molar  
mAU = Miliunidades de absorbancia  
mg = Miligramo  
min = Minuto  
ml = Mililitro  
mM = Milimolar  
mm Hg = Milímetro de mercurio  
N = Normal  
n = Número de datos  
NAD = Dinucleótido de nicotinamida y de adenina  
NADP = Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina

---

ND = No detectado  
NEs = Equivalentes niacina  
ng = Nanogramo  
nm = Nanómetro  
Nº = Número  
o- = orto- (Posición de un sustituyente)  
°C = Grado centígrado  
OFDA = o-fenilendiamina  
p- = para- (Posición de un sustituyente)  
p/v = Porcentaje peso/volumen  
PA = Reactivos para análisis de uso general  
PL = Piridoxal  
PLP = Fosfato de piridoxal  
PM = Piridoxamina  
PMP = Fosfato de piridoxamina  
PN = Piridoxina  
PNP = Fosfato de piridoxina  
PP = Preventivo pelagra  
PRS = Productos y reactivos purísimos  
r = Coeficiente de correlación lineal  
R = Riboflavina  
r.p.m. = Revolución por minuto  
RE = Equivalentes retinol  
Ref = Referencia  
s = Segundo  
S.A. = Sociedad anónima  
S.E. = Sociedad española  
s/n = Sin número  
SD = Desviación típica o estándar  
sp = Especie  
SSA = Acido sulfosalicílico  
T = Tiamina  
Tª = Temperatura

TCA = Acido tricloroacético

TFA = Acido trifluoroacético

TPN = Trifosfopiridinnucleótido

TPNH<sub>2</sub> = Trifosfopiridinnucleótido reducido

TPP = Pirofosfato de tiamina

Tr = Traza

UI = Unidad Internacional

UV = Ultravioleta

V = Voltio

v/v = Porcentaje volumen/volumen

vs = Frente

$\bar{x}$  = Valor promedio

## **INDICE DE FIGURAS**

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
	—
1.- Fórmula estructural de HIDROCLORURO de TIAMINA .....	48
2.- Fórmula estructural de TIOCROMO .....	49
3.- Fórmula estructural de RIBOFLAVINA .....	50
4.- Fórmula estructural de ACIDO NICOTINICO .....	52
5.- Fórmula estructural de NICOTINAMIDA .....	52
6.- Fórmula estructural de HIDROCLORURO de PIRIDOXINA .....	54
7.- Fórmula estructural de HIDROCLORURO de PIRIDOXAL .....	55
8.- Fórmula estructural de DIHIDROCLORURO de PIRIDOXAMINA .....	55
9.- Fórmula estructural de ACIDO L-ASCORBICO .....	56
10.- Fórmula estructural de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL .....	58
11.- Fórmula estructural de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	60
12.- Fórmula estructural de ACETATO de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	61
13.- Sistema de bombeo isocrático del HP 1090 .....	151
14.- Etapas en el ciclo del inyector automático .....	153
15.- Sistema óptico del detector de matriz de fotodiodos .....	154
16.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de TIAMINA	161
17.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de TIAMINA .....	164
18.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de RIBOFLAVINA .....	169
19.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de RIBOFLAVINA .....	171
20.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACIDO NICOTINICO y NICOTINAMIDA .....	176
21.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de NIACINA .....	178
22.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL, DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA y FOSFATO DE PIRIDOXAMINA .....	183

---

23.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de FOSFATO DE PIRIDOXAL .....	184
24.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL .....	185
25.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de VITAMINA B <sub>6</sub> .....	187
26.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACIDO L-ASCORBICO .....	192
27.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de ACIDO L-ASCORBICO .....	194
28.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACETATO de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL .....	199
29.- Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACETATO de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	204
30.- Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	206
31.- Cromatograma de TIAMINA en Patrón (2 $\mu$ g; 3,929 min) .....	212
32.- Diagrama correspondiente al % de extracción de tiamina para los tratamientos enzimáticos aplicados a varios productos .....	217
33.- Curva de calibración para TIAMINA .....	222
34.- Cromatograma de TIAMINA en Lunch (0,503 mg/100 g; 3,771 min) ...	224
35.- Cromatograma de TIAMINA en Chopped pork (0,165 mg/100 g; 3,775 min) .....	224
36.- Cromatograma de TIAMINA en Chopped beef (0,145 mg/100 g; 3,768 min) .....	225
37.- Cromatograma de TIAMINA en Chopped pavo (0,041 mg/100 g; 3,786 min) .....	225
38.- Cromatograma de TIAMINA en Chopped vitaminado (0,413 mg/100 g; 3,784 min) .....	226
39.- Cromatograma de TIAMINA en Mortadela siciliana (0,139 mg/100 g; 3,755 min) .....	226
40.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Patrón (20 $\mu$ g; 4,032 min) .....	229

---

41.- Diagrama correspondiente al % de extracción de riboflavina para los tratamientos enzimáticos aplicados a varios productos .....	232
42.- Diagrama correspondiente al % de extracción media de tiamina y riboflavina para los diferentes tratamientos enzimáticos aplicados .....	233
43.- Curva de calibración para RIBOFLAVINA.....	238
44.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Lunch (0,187 mg/100 g; 4,042 min) .....	240
45.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped pork (0,148 mg/100 g; 4,054 min) .....	240
46.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped beef (0,152 mg/100 g; 4,039 min) .....	241
47.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped pavo (0,173 mg/100 g; 4,032 min) .....	241
48.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped vitaminado (0,637 mg/100 g; 4,036 min) .....	242
49.- Cromatograma de RIBOFLAVINA en Mortadela siciliana (0,116 mg/100 g; 4,046 min) .....	242
50.- Cromatograma de NIACINA en Patrón (Acido Nicotínico: 50 µg, 2,972 min; Nicotinamida: 50 µg, 3,515 min) .....	245
51.- Curva de calibración para ACIDO NICOTINICO .....	253
52.- Curva de calibración para NICOTINAMIDA .....	254
53.- Cromatograma de NIACINA en Lunch (Acido Nicotínico: 1,090 mg/100 g, 2,972 min; Nicotinamida: 2,439 mg/100 g, 3,560 min) .....	256
54.- Cromatograma de NIACINA en Chopped pork (Nicotinamida: 2,857 mg/100 g, 3,422 min) .....	256
55.- Cromatograma de NIACINA en Chopped beef (Nicotinamida: 2,807 mg/100 g, 3,564 min) .....	257
56.- Cromatograma de NIACINA en Chopped pavo (Acido Nicotínico: 1,247 mg/100 g, 2,973 min; Nicotinamida: 2,416 mg/100 g, 3,536 min) .....	257
57.- Cromatograma de NIACINA en Chopped vitaminado (Acido Nicotínico: 1,524 mg/100 g, 2,964 min; Nicotinamida: 8,513 mg/100 g, 3,556 min) .....	258

---

58.- Cromatograma de NIACINA en Mortadela siciliana (Acido Nicotínico: 0,869 mg/100 g, 2,965 min; Nicotinamida: 2,111 mg/100 g, 3,547 min) .....	258
59.- Cromatograma del vitámero PMP en Patrón (100 µg; 1,356 min) .....	261
60.- Cromatograma del vitámero PM en Patrón (100 µg; 1,503 min) .....	261
61.- Cromatograma del vitámero PL en Patrón (100 µg; 2,683 min) .....	262
62.- Cromatograma del vitámero PLP en Patrón (500 µg; 3,368 min) .....	262
63.- Cromatograma del vitámero PN en Patrón (100 µg; 3,723 min) .....	263
64.- Cromatograma de varios vitámeros en mezcla de Patrones (PMP: 100 µg, 1,410 min; PM: 100 µg, 1,527 min; PL: 100 µg, 2,605 min; PLP: 500 µg, 3,238 min; PN: 100 µg, 3,552 min) .....	263
65.- Curva de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAMINA .....	272
66.- Curva de calibración para DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA .....	273
67.- Curva de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL .....	274
68.- Curva de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAL .....	275
69.- Curva de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL .....	276
70.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Lunch (PMP: 0,157 mg/100 g, 1,353 min) .....	278
71.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Chopped pork (PMP: 0,205 mg/100 g, 1,350 min) .....	278
72.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Chopped beef (PMP: 0,193 mg/100 g, 1,353 min) .....	279
73.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Chopped pavo (PMP: 0,164 mg/100 g, 1,360 min) .....	279
74.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Chopped vitaminado (PMP: 0,194 mg/100 g, 1,363 min; PN: 0,651 mg/100 g, 3,744 min) .....	280
75.- Cromatograma de VITAMINA B <sub>6</sub> en Mortadela siciliana (PMP: 0,127 mg/100 g, 1,357 min) .....	280
76.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Patrón (75 µg; 3,433 min) .....	283
77.- Curva de calibración para ACIDO L-ASCORBICO .....	289

---

78.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Lunch (21,053 mg/100 g; 3,031 min) .....	291
79.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped pork (24,656 mg/100 g; 3,217 min) .....	291
80.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped beef (24,615 mg/100 g; 3,121 min) .....	292
81.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped pavo (23,136 mg/100 g; 3,204 min) .....	292
82.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped vitaminado (50,612 mg/100 g; 3,050 min) .....	293
83.- Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Mortadela siciliana (24,847 mg/100 g; 3,083 min) .....	293
84.- Cromatograma de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL en Patrón (14 µg; 2,320 min) .....	296
85.- Cromatograma de DL-α-TOCOFEROL en Patrón (200 µg; 5,473 min) .....	296
86.- Curva de calibración para ACETATO DE TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL....	303
87.- Curva de calibración para ACETATO DE DL-α-TOCOFEROL .....	307
88.- Cromatograma de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL en Chopped vitaminado (99,000 µg/100 g; 2,336 min) .....	309
89.- Cromatograma de DL-α-TOCOFEROL en Chopped vitaminado (2,146 mg/100 g; 5,503 min) .....	309
90.- Diagrama de anillo con el contenido medio de TIAMINA en productos cárnicos cocidos .....	332
91.- Diagrama de anillo con el contenido medio de RIBOFLAVINA en productos cárnicos cocidos .....	332
92.- Diagrama de anillo con el contenido medio de NIACINA en productos cárnicos cocidos .....	333
93.- Diagrama de anillo con el contenido medio de VITAMINA B <sub>6</sub> en productos cárnicos cocidos .....	333
94.- Diagrama de anillo con el contenido medio de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos cocidos .....	334

---

95.- Diagrama de barras con el contenido medio de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	334
96.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de tiamina en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	346
97.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de riboflavina en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	347
98.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de nicotinamida en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	348
99.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de ácido nicotínico en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	349
100.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de vitamina B <sub>6</sub> en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	350
101.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de ácido L-ascórbico en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	351
102.- Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de todo- <i>trans</i> -retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor .....	352

**INDICE DE TABLAS**

**INDICE DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
1-3.- Composición de alimentos españoles (Vivanco <i>et al.</i> , 1990) .....	66
4-5.- Composición de alimentos españoles (Carretero y Gómez, 1995) .....	69
6-7.- Nombres científicos de alimentos (CAE, 1996) .....	71
8.- Recomendaciones Nutricionales, Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense de Madrid, Revisadas 1994 .....	90
9.- Recommended Dietary Allowances, Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences-National Research Council, Revised 1989 .....	91
10-12.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B <sub>1</sub> .....	98
13-15.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B <sub>2</sub> .....	103
16-19.- Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINA B <sub>1</sub> (T) y VITAMINA B <sub>2</sub> (R) .....	106
20-22.- Condiciones de HPLC para la determinación de NIACINA .....	112
23-25.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B <sub>6</sub> .....	117
26-30.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C .....	123
31.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA A .....	131
32.- Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA E .....	134
33.- Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINAS A y E .....	135
34.- Composición de Lunch .....	140
35.- Composición de Chopped pork .....	141
36.- Composición de Chopped beef .....	142
37.- Composición de Chopped pavo .....	143
38.- Composición de Chopped vitaminado .....	144
39.- Composición de Mortadela siciliana .....	145
40.- Determinación cuantitativa de TIOCROMO por HPLC .....	214
41.- Efecto de diversos tratamientos enzimáticos en la determinación de TIAMINA .....	216
42.- Determinación de TIAMINA: Precisión .....	218
43.- Determinación de TIAMINA: Exactitud .....	220

---

44.- Datos de calibración para TIAMINA .....	221
45.- Regresión lineal TIAMINA = - 4,654 + 74,746 x .....	222
46.- Efecto de diversos tratamientos enzimáticos en la determinación de RIBOFLAVINA .....	231
47.- Efecto del proceso de oxidación en la determinación de RIBOFLAVINA .....	235
48.- Determinación de RIBOFLAVINA: Precisión .....	235
49.- Determinación de RIBOFLAVINA: Exactitud .....	236
50.- Datos de calibración para RIBOFLAVINA .....	237
51.- Regresión lineal RIBOFLAVINA = 0,656 + 1,754 x .....	238
52.- Extracción acuosa en la determinación de NIACINA .....	247
53.- Determinación de ACIDO NICOTINICO: Precisión .....	248
54.- Determinación de NICOTINAMIDA: Precisión .....	248
55.- Determinación de ACIDO NICOTINICO: Exactitud .....	249
56.- Determinación de NICOTINAMIDA: Exactitud .....	250
57.- Datos de calibración para ACIDO NICOTINICO .....	251
58.- Datos de calibración para NICOTINAMIDA .....	252
59.- Regresión lineal ACIDO NICOTINICO = - 0,955 + 0,535 x .....	253
60.- Regresión lineal NICOTINAMIDA = - 1,547 + 0,478 x .....	254
61.- Efecto del agente extractante en la determinación de VITAMINA B <sub>6</sub> ...	265
62.- Determinación de VITAMINA B <sub>6</sub> (PMP): Precisión .....	266
63.- Determinación de VITAMINA B <sub>6</sub> (PMP): Exactitud .....	267
64.- Datos de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAMINA (PMP) ....	268
65.- Datos de calibración para DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA (PM) .....	269
66.- Datos de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL (PL) ..	269
67.- Datos de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP) .....	270
68.- Datos de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL (PN) ..	270
69.- Regresión lineal (PMP) = 2,214 + 2,798 x .....	272
70.- Regresión lineal (PM) = - 0,134 + 2,330 x .....	273
71.- Regresión lineal (PL) = - 0,587 + 1,397 x .....	274
72.- Regresión lineal (PLP) = - 1,500 + 0,134 x .....	275
73.- Regresión lineal (PN) = - 0,211 + 1,802 x .....	276

74.- Efecto del agente extractante en la determinación de ACIDO L-ASCORBICO .....	285
75.- Determinación de ACIDO L-ASCORBICO: Precisión .....	286
76.- Determinación de ACIDO L-ASCORBICO: Exactitud .....	287
77.- Datos de calibración para ACIDO L-ASCORBICO .....	288
78.- Regresión lineal ACIDO L-ASCORBICO = - 2,343 + 1,472 x .....	289
79.- Efecto del proceso de saponificación en la determinación de TODO-TRANS-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	299
80.- Determinación de TODO-TRANS-RETINOL: Precisión .....	300
81.- Determinación de TODO-TRANS-RETINOL: Exactitud .....	301
82.- Datos de calibración para ACETATO DE TODO-TRANS-RETINOL ..	302
83.- Regresión lineal ACETATO DE TODO-TRANS-RETINOL = - 0,359 + 7,545 x .....	303
84.- Determinación de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL: Precisión .....	304
85.- Determinación de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL: Exactitud .....	305
86.- Datos de calibración para ACETATO DE DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	306
87.- Regresión lineal ACETATO DE DL- $\alpha$ -TOCOFEROL = - 2,432 + 0,817 x .....	307
88.- Valores de TIAMINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	314
89.- Valores de RIBOFLAVINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	315
90.- Valores de NICOTINAMIDA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	316
91.- Valores de ACIDO NICOTINICO en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	317
92.- Valores de NIACINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	318
93.- Valores de VITAMINA B <sub>6</sub> en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	319
94.- Valores de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	320

---

95.- Valores de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado) .....	321
96.- Valores de TIAMINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	324
97.- Valores de RIBOFLAVINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	325
98.- Valores de NICOTINAMIDA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	326
99.- Valores de ACIDO NICOTINICO en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	327
100.- Valores de NIACINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	328
101.- Valores de VITAMINA B <sub>6</sub> en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	329
102.- Valores de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	330
103.- Valores de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado) .....	331
104.- Porcentajes de vitaminas con respecto a las CDR aportadas por los productos cárnicos cocidos .....	335
105.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de TIAMINA .....	338
106.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de RIBOFLAVINA .....	339
107.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de NICOTINAMIDA .....	340
108.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de ACIDO NICOTINICO .....	341
109.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de NIACINA .....	342
110.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de VITAMINA B <sub>6</sub> .	343
111.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de ACIDO L-ASCORBICO .....	344
112.- Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL .....	345

**INDICE GENERAL**

**INDICE GENERAL**

	<b>Pág.</b>
	—
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	16
<b>INDICE GENERAL</b> .....	21
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	31
<b>2. OBJETO DEL TRABAJO</b> .....	35
<b>3. NATURALEZA QUIMICA Y BIOLOGICA DE LAS VITAMINAS ESTUDIADAS</b> .....	37
<b>3.A. HISTORIA</b> .....	38
Introducción .....	39
<b>3.A.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES</b> .....	40
3.A.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	40
3.A.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	41
3.A.1.3. Niacina .....	41
3.A.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	43
3.A.1.5. Vitamina C .....	43
<b>3.A.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES</b> .....	44
3.A.2.1. Vitamina A .....	44
3.A.2.2. Vitamina E .....	45
<b>3.B. ESTRUCTURA, NOMENCLATURA Y CARACTERISTICAS</b> .....	47

3.B.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	48
3.B.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	48
3.B.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	50
3.B.1.3. Niacina .....	51
3.B.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	53
3.B.1.5. Vitamina C .....	56
3.B.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	57
3.B.2.1. Vitamina A .....	57
3.B.2.2. Vitamina E .....	59
<b>3.C. FUENTES ALIMENTARIAS .....</b>	<b>62</b>
3.C.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	63
3.C.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	63
3.C.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	63
3.C.1.3. Niacina .....	63
3.C.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	64
3.C.1.5. Vitamina C .....	64
3.C.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	65
3.C.2.1. Vitamina A .....	65
3.C.2.2. Vitamina E .....	65
<b>3.D. ACTIVIDAD BIOLOGICA EN EL HOMBRE .....</b>	<b>73</b>
<b>3.D.1. METABOLISMO FUNCIONAL .....</b>	<b>74</b>
3.D.1.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	75
3.D.1.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	75
3.D.1.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	76
3.D.1.1.3. Niacina .....	76
3.D.1.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	76

---

3.D.1.1.5. Vitamina C .....	77
3.D.1.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	78
3.D.1.2.1. Vitamina A .....	78
3.D.1.2.2. Vitamina E .....	79
<b>3.D.2. CONSECUENCIAS DE LA CARENCIA VITAMINICA</b> .....	<b>81</b>
3.D.2.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	82
3.D.2.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	82
3.D.2.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	82
3.D.2.1.3. Niacina .....	83
3.D.2.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	84
3.D.2.1.5. Vitamina C .....	84
3.D.2.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	85
3.D.2.2.1. Vitamina A .....	85
3.D.2.2.2. Vitamina E .....	86
<b>3.E. RECOMENDACIONES NUTRICIONALES E INGESTA</b> .....	<b>88</b>
<b>4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE LOS METODOS ANALITICOS</b> .....	<b>94</b>
4.A. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	95
4.A.1. Vitamina B <sub>1</sub> .....	95
4.A.2. Vitamina B <sub>2</sub> .....	101
4.A.3. Niacina .....	110
4.A.4. Vitamina B <sub>6</sub> .....	115
4.A.5. Vitamina C .....	120
4.B. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	128
4.B.1. Vitamina A .....	128

4.B.2. Vitamina E .....	132
<b>5. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>137</b>
<b>5.A. MATERIA PRIMA .....</b>	<b>138</b>
5.A.1. PRODUCTOS CARNICOS TRATADOS POR EL CALOR .....	139
Lunch .....	140
Chopped pork .....	141
Chopped beef .....	142
Chopped de pavo .....	143
Chopped vitaminado .....	144
Mortadela siciliana .....	145
<b>5.B. METODOS .....</b>	<b>146</b>
<b>5.B.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) EN LA SEPARACION DE LAS VITAMINAS ESTUDIADAS .....</b>	<b>147</b>
5.B.1.1. Separaciones analíticas por cromatografía .....	148
5.B.1.2. Instrumentación para HPLC .....	149
5.B.1.2.1. Modelo .....	149
5.B.1.2.2. Descripción funcional del equipo .....	150
1. Sistema de suministro de disolventes .....	150
2. Compartimento de columna .....	151
3. Sistema de inyección de la muestra .....	152
4. Unidad de detección .....	153
A. Detector de matriz de fotodiodos (DAD) .....	154
B. Detector de fluorescencia .....	155

<b>5.B.2. DETERMINACIONES ANALITICAS DE LAS</b>	
<b>VITAMINAS ESTUDIADAS .....</b>	156
5.B.2.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES .....	157
5.B.2.1.1. VITAMINA B <sub>1</sub> .....	157
5.B.2.1.1.1. Reactivos .....	157
5.B.2.1.1.2. Aparatos .....	158
5.B.2.1.1.3. Preparación de patrones .....	160
5.B.2.1.1.4. Procedimiento analítico .....	162
5.B.2.1.1.5. Cálculos .....	165
5.B.2.1.2. VITAMINA B <sub>2</sub> .....	166
5.B.2.1.2.1. Reactivos .....	166
5.B.2.1.2.2. Aparatos .....	167
5.B.2.1.2.3. Preparación de patrones .....	168
5.B.2.1.2.4. Procedimiento analítico .....	170
5.B.2.1.2.5. Cálculos .....	172
5.B.2.1.3. NIACINA .....	173
5.B.2.1.3.1. Reactivos .....	173
5.B.2.1.3.2. Aparatos .....	174
5.B.2.1.3.3. Preparación de patrones .....	175
5.B.2.1.3.4. Procedimiento analítico .....	177
5.B.2.1.3.5. Cálculos .....	179
5.B.2.1.4. VITAMINA B <sub>6</sub> .....	180
5.B.2.1.4.1. Reactivos .....	180
5.B.2.1.4.2. Aparatos .....	181
5.B.2.1.4.3. Preparación de patrones .....	182
5.B.2.1.4.4. Procedimiento analítico .....	186
5.B.2.1.4.5. Cálculos .....	188



tiocromo por HPLC .....	213
6.A.1.1.3. Estudio para la optimización de la digestión enzimática en la extracción de tiamina a partir de productos cárnicos cocidos .....	214
6.A.1.1.4. Determinación de los parámetros analíticos ....	218
6.A.1.1.5. Sistema de calibración y ensayo .....	221
6.A.1.1.6. Cromatogramas de tiamina en productos cárnicos cocidos .....	223
 6.A.1.2. VITAMINA B <sub>2</sub> .....	 227
6.A.1.2.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de riboflavina .....	227
6.A.1.2.2. Estudio para la optimización de la digestión enzimática en la extracción de riboflavina a partir de productos cárnicos cocidos .....	230
6.A.1.2.3. Estudio sobre el efecto del proceso de oxidación en la extracción de riboflavina a partir de productos cárnicos cocidos .....	234
6.A.1.2.4. Determinación de los parámetros analíticos ....	235
6.A.1.2.5. Sistema de calibración y ensayo .....	237
6.A.1.2.6. Cromatogramas de riboflavina en productos cárnicos cocidos .....	239
 6.A.1.3. NIACINA .....	 243
6.A.1.3.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de ácido nicotínico y de nicotinamida .....	243
6.A.1.3.2. Estudio para la optimización de la extracción de niacina a partir de productos cárnicos cocidos .....	246
6.A.1.3.3. Determinación de los parámetros analíticos ....	247
6.A.1.3.4. Sistema de calibración y ensayo .....	251
6.A.1.3.5. Cromatogramas de niacina en productos	

cárnicos cocidos .....	255
6.A.1.4. VITAMINA B <sub>6</sub> .....	259
6.A.1.4.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de vitamina B <sub>6</sub> .....	259
6.A.1.4.2. Estudio para la optimización del agente de extracción para la vitamina B <sub>6</sub> a partir de productos cárnicos cocidos .....	264
6.A.1.4.3. Determinación de los parámetros analíticos .....	265
6.A.1.4.4. Sistema de calibración y ensayo.....	268
6.A.1.4.5. Cromatogramas de vitamina B <sub>6</sub> en productos cárnicos cocidos .....	277
6.A.1.5. VITAMINA C .....	281
6.A.1.5.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de ácido L-ascórbico .....	281
6.A.1.5.2. Estudio para la optimización del agente de extracción para el ácido L-ascórbico a partir de productos cárnicos cocidos .....	284
6.A.1.5.3. Determinación de los parámetros analíticos .....	285
6.A.1.5.4. Sistema de calibración y ensayo.....	288
6.A.1.5.5. Cromatogramas de ácido L-ascórbico en productos cárnicos cocidos .....	290
6.A.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES .....	294
6.A.2.1. VITAMINAS A y E .....	294
6.A.2.1.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de todo- <i>trans</i> -retinol y DL- $\alpha$ - tocoferol.....	294
6.A.2.1.2. Estudio para la optimización de la extracción de acetato de todo- <i>trans</i> -retinol y acetato de DL- $\alpha$ - tocoferol a partir de productos cárnicos cocidos	297



## **1. INTRODUCCION**

El desarrollo normal de todas las funciones fisiológicas en el organismo humano y animal necesita del aporte regular de una serie de elementos vitales “esenciales” de la alimentación; entre los que se hallan las sustancias nutritivas y de formación (proteínas, grasas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales minerales) así como las vitaminas y los oligoelementos.

La palabra *vitamina* la empleó por primera vez el químico polaco Casimir Funk en 1912. Las vitaminas son micro-nutrientes orgánicos presentes en pequeñas concentraciones en los alimentos siendo esenciales como agentes reguladores del crecimiento y salud normal del individuo. Desempeñan funciones específicas y vitales en las células y en los tejidos del organismo. No nos proporcionan energía, aunque son necesarias para obtenerla en muchas reacciones metabólicas. A diferencia de las sustancias nutritivas que sirven al organismo como materiales de construcción y sustancias de almacenamiento, las vitaminas desempeñan funciones catalíticas. Actúan como cocatalizadores (coenzimas) de apoenzimas, a las que se unen activándolas.

Las vitaminas se han clasificado en dos grupos basándose en su característica de solubilidad. Las vitaminas hidrosolubles (vitamina C y el llamado “complejo B”) fácilmente solubles en soluciones acuosas y las vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K) solubles en grasas y disolventes orgánicos no polares. Las primeras se eliminan fácilmente por la orina y deben tomarse diariamente, pues casi no se almacenan en el organismo, mientras que las segundas pueden permanecer durante meses y son de más difícil eliminación.

Se caracterizan porque nuestro organismo no las puede sintetizar, por lo tanto si éste no contiene las vitaminas en cantidad suficiente o carece de ellas, algunos procesos metabólicos se ven afectados generándose trastornos del rendimiento, inhibición del crecimiento así como enfermedades carenciales y dolencias más o menos importantes, cuyos síntomas varían según el tipo de avitaminosis y dependiendo de su amplitud. Pueden presentarse carencias de aporte, producidas como consecuencia de un régimen adelgazante, un régimen médico o por razones filosóficas. También se dan carencias de absorción, debidas a trastornos

metabólicos, durante el desarrollo de determinadas enfermedades, o después de utilizar ciertos fármacos y carencias por incremento de las necesidades en edades específicas de la vida: los recién nacidos, la mujer gestante y los ancianos son los más afectados.

En contraste con la hipovitaminosis, el uso excesivo de vitaminas provoca hipervitaminosis, con riesgos más o menos serios para las vitaminas liposolubles que permanecen fijadas en las grasas sin ser eliminadas por el organismo como en el caso de las vitaminas hidrosolubles. La capacidad de almacenamiento de las vitaminas está en relación directa con su toxicidad.

Una dieta lo bastante equilibrada y variada que incluya cereales, carne, productos lácteos, verduras y frutas, satisface las necesidades orgánicas de vitaminas y protege de sus efectos carenciales. Las necesidades vitamínicas varían dependiendo de una serie de factores: edad, sexo, actividad física, consumo de alcohol, embarazo, costumbres dietéticas. En casos de recuperación de gripes y resfriados, en que se produce una disminución de las defensas y donde la administración de antigripales y otros medicamentos ocasiona una destrucción de vitaminas. El estrés produce una situación de máxima exigencia orgánica. En personas mayores, por razones de sedentarismo, administración de medicamentos como antirreumáticos y antibióticos, también es posible que aparezca la necesidad de suplementos vitamínicos.

A pesar de la abundancia de bienes materiales que caracteriza a las sociedades desarrolladas, las enfermedades carenciales subsisten, en la mayoría de los casos como consecuencia de una nutrición desequilibrada motivada principalmente por los cambios de los hábitos de vida, la elaboración industrial de los alimentos, el aumento de la productividad en la producción animal, la publicidad televisiva, habiéndose creado unos hábitos alimentarios poco saludables. La sociedad de consumo día a día va observando que la calidad de vida no sigue la línea ascendente del consumo y que los alimentos no siempre satisfacen la función que la naturaleza les atribuye. Los temas nutricionales van despertando mayor interés, destacándose la valiosa contribución de las vitaminas al bienestar y protección

del individuo que vive rodeado de situaciones estresantes y ruidos ambientales en un medio sometido a una creciente contaminación.

Motivados por lo que significan las vitaminas en la alimentación humana se ha desarrollado este trabajo, investigando los métodos analíticos que permiten detectar y cuantificar estas moléculas en productos cárnicos, por considerarse a éstos, alimentos básicos dado el papel que representan en la dieta desde el punto de vista nutricional.

La carne es un alimento muy rico en vitaminas, especialmente del grupo B. Es una de las principales fuentes de vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, niacina, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub>. No es rica en vitaminas liposolubles, aunque se está estudiando el papel de la adición de la vitamina E como antioxidante, así como por su efecto en la prevención del cáncer.

Las vitaminas, en gran parte, son sustancias lábiles, susceptibles a la oxidación y ruptura cuando están en contacto con el calor, la luz, el oxígeno o las variaciones de pH. Por lo tanto debe tenerse gran cuidado en el manejo de las mismas para prevenir estas alteraciones durante el análisis de las muestras. La cuantificación de las vitaminas por HPLC tiene la ventaja de poder realizarse a temperatura ambiente evitando el contacto con la luz o el oxígeno durante la cromatografía. Además, en cromatografía líquida se pueden efectuar separaciones en tiempos más cortos que con otras técnicas separativas. Las significativas diferencias en la estructura química dan lugar a la existencia de diferentes métodos de extracción para cada tipo de vitamina y para cada matriz concreta.

## **2. OBJETO DEL TRABAJO**

El desarrollo de enfermedades infecciosas y carenciales en la sociedad actual, como consecuencia de una nutrición desequilibrada motivada por diversos hábitos de vida y por el procesado industrial de los alimentos, suscita el reconocimiento de la importante función que tienen las vitaminas en la salud física y mental de las personas y en consecuencia la importancia creciente del conocimiento de su contenido en alimentos procesados.

Por ello, el propósito de este estudio ha sido desarrollar métodos de extracción y de análisis mediante cromatografía líquida para la determinación del contenido de algunas vitaminas hidrosolubles (vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, niacina, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina C) y de otras liposolubles (vitamina A y vitamina E) en productos cárnicos cocidos enriquecidos (chopped vitaminado) y no enriquecidos (lunch, chopped pork, chopped beef, chopped de pavo y mortadela siciliana). Un objetivo adicional ha sido determinar las pérdidas vitamínicas en dichos productos como consecuencia del procesado industrial.

Cuanto mejor se controle y se conozca la calidad del producto alimenticio mejor podrá la sociedad de consumo decidir las variaciones, cantidades y frecuencias en la dieta para conseguir una adecuada nutrición.

### **3. NATURALEZA QUIMICA Y BIOLOGICA DE LAS VITAMINAS ESTUDIADAS**

### **3.A. HISTORIA**

### 3.A. HISTORIA (Leboulanger, 1981; García Almansa, 1983; Rojas Hidalgo, 1985; Lyon, 1987 & Combs, 1992).

#### Introducción

El interés por las vitaminas no sólo ha sido manifestado por científicos, sino también por otros muchos seres humanos que se dieron cuenta de su necesidad desde hace muchísimos años. Los marineros sabían que si permanecían durante largo tiempo sin comer alimentos frescos estaban propensos a padecer escorbuto, enfermedad conocida en todo el mundo. Las tripulaciones de Vasco de Gama y de Magallanes se vieron afectadas de esta “plaga de mar”. En 1720, Kramer, médico militar austríaco, recomendó el uso de frutos cítricos para combatir el escorbuto, pero el hervir el zumo de estos frutos para que se conservase mejor, les hacía perder sus propiedades, y el escorbuto seguía manifestándose.

En 1881, Lunin, suizo, demostró que los ratones no podían vivir con una alimentación constituida por proteínas, grasas, hidratos de carbono y sales en estado de pureza, y que si se añadía leche a la dieta los ratones se desarrollaban normalmente. Según Lunin, la leche debía contener alguna sustancia aún no identificada, esencial para la vida.

En 1912 un químico polaco Funk, trabajando en Londres, aisló de la cascarilla de arroz una sustancia cristalina, muy activa, la cual podía curar rápidamente, con una dosis de pocos centigramos, a los polluelos y palomos atacados de la parálisis del beriberi. Por suponer que se trataba de una amina, vital para el organismo, se denominó *vitamina*, creyendo que otras enfermedades como el escorbuto, el raquitismo y la pelagra tendrían un origen parecido y una curación análoga al beriberi.

A continuación se detalla la historia de cada una de las vitaminas estudiadas en este trabajo.

### 3.A.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES

#### 3.A.1.1. Vitamina B<sub>1</sub>

La descripción del beriberi por los chinos se remonta en torno al 2600 a.C. El descubrimiento de la vitamina B<sub>1</sub> como un factor alimentario indispensable para la prevención de esta enfermedad originó importantes adelantos en la investigación nutrológica, que durante la primera mitad del siglo XX condujo a la identificación de las vitaminas.

En Asia, entre 1870 y 1920, la construcción de numerosas fábricas para descortezar y blanquear el arroz ocasionó la “enfermedad de los comedores de arroz” ya que el arroz refinado había perdido sus vitaminas.

En 1885 el almirante japonés Tataki, presintiendo el origen nutricional de esta dolencia, sustituyó el arroz refinado de la dieta de los marinos de la flota japonesa por una alimentación variada.

En 1890 el médico holandés Eijkman, atendía en la penitenciaría de Java a los presos que padecían una enfermedad incurable y de causa desconocida, el beriberi. Los pacientes sufrían trastornos cardíacos y parálisis. Un día, Eijkman observó que las gallinas del corral del hospital también estaban paralizadas; por lo tanto estos trastornos de los animales y de los hombres debían de tener un origen común; ambos se alimentaban con arroz descortezado.

Reprodujo experimentalmente la enfermedad en el palomo y lo curó con la administración de una sustancia presente en la corteza del arroz. Suministró a las gallinas arroz integral y sus trastornos cesaron. El mismo régimen, prescrito a los enfermos, produjo idénticos resultados. Se había demostrado que una cierta carencia de un principio todavía desconocido era la responsable de la enfermedad.

En 1912 Funk, extrajo de la corteza del arroz una base orgánica capaz de prevenir y curar la polineuritis, base a la que asignó el término *vitamina*.

En 1926 fue aislada por Jansen y Donath, en Batavia, a partir de las cascarillas de arroz, denominándola aneurina. Su fórmula química fue conocida en 1931, y su síntesis realizada en 1936 por dos equipos, Andersad & Westphal y Williams & Todd.

### **3.A.1.2. Vitamina B<sub>2</sub>**

Después del descubrimiento de la vitamina B<sub>1</sub>, en 1920 Emmut, identificó un segundo factor que permitía utilizar proteínas y azúcares, y por lo tanto era un factor de crecimiento, idéntico a un pigmento amarillo aislado a partir del suero lácteo, la lactoflavina.

En 1933 fue aislada por Kuhn y Wagner-Jauregg, siendo sintetizada en 1934 por Kuhn y Karrer.

### **3.A.1.3. Niacina**

La pelagra fue detectada a mediados del siglo XVIII. La primera descripción fue realizada por Gaspar Casal en Oviedo, España, hacia 1730, en su *Historia natural y médica de la población de Asturias*, publicada en 1762.

Entre 1760 y 1800, en la región de Venecia y Lombardía, entre las familias rurales pobres alimentadas sólo de maíz aparecieron lesiones cutáneas y trastornos digestivos.

En Francia, a partir de 1818, J.Hameau observó en varios pueblos de las Landas una enfermedad llamada “enfermedad de la miseria” o “mal de La Teste” (nombre de un pueblo). Se identificó con la pelagra (piel seca y rugosa) observada en Italia.

En 1830 y 1837 se produjo una epidemia en el suroeste francés (más de tres mil casos censados en las Landas). En 1845, Théophile Roussel le dedicó su tesis doctoral. Los observadores manifestaron la influencia de la exposición al sol. Se dijo también que la pelagra se debía a la suciedad (ésta puede favorecerla, pero no

originarla); después, tras haber investigado diversos alimentos (agua insalubre, vino adulterado, carnes saladas), se observó que afectaba a los campesinos que consumían maíz, lo que hizo pensar que se debía a la alteración de este alimento, cuyo consumo era el único punto en común entre poblaciones muy distantes entre sí.

A finales del siglo XIX y comienzos del XX Portugal, Rumania, Yugoslavia, los Balcanes y Egipto se vieron afectados. Los casos disminuyeron en Italia y el suroeste de Francia al aumentar el nivel de vida y consumir menos maíz. En Estados Unidos, después de la guerra de Secesión, a partir de 1907, se produjeron más de 25.000 casos, con un 40% de mortalidad. Se pensó que la causa era una enfermedad infecciosa (observando los médicos que no afectaba a las clases sociales altas).

Fue Goldberger quien, en el siglo XX, y tras numerosas observaciones, pudo constatar que los negros, de régimen alimentario pobre, monótono, a base de maíz, padecían la enfermedad, mientras que los blancos que habitaban entre ellos, pero que consumían carne y leche además de maíz, no la padecían. Haciendo seguir a los enfermos la dieta de los blancos, la enfermedad desaparecía.

En 1914 Goldberger hizo modificar la alimentación en los asilos y orfanatos, donde había muchos casos; en 1915 ya no quedaba ninguno.

Más tarde se hicieron observaciones a gran escala sobre la alimentación en siete pueblos de Carolina del Sur. En 1917 fue probado el origen carencial de la pelagra, así como la seguridad de su prevención mediante la ingestión de determinados alimentos. Sin embargo durante este período, hacia 1920, aún se produjeron miles de muertes por esta causa en Estados Unidos.

Hacia 1925, Goldberger *et al.*, intrigados por la analogía entre “pelagra” y “black tongue” (lengua negra o estomatitis ulcerosa del perro), demostraron que una misma alimentación curaba ambas afecciones. Relacionando ésto con el reciente descubrimiento de las vitaminas A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, dicho equipo supuso la existencia de una vitamina antipelagrosa. Por la misma época, Funk, Weill y Mouriquand manifestaron

que los trastornos cutáneos subsiguientes a una alimentación a base de maíz se debían a la falta de esta vitamina, a la que llamaron vitamina PP.

En 1946 Krehl demostró que la rata podía sintetizar la vitamina PP a partir del triptófano. Después se demostró que en el hombre ocurría lo mismo. Las vitaminas B<sub>2</sub> y B<sub>6</sub> también participan en las reacciones que conducen del triptófano a la vitamina PP (lo que explica el papel que desempeñan la leche y los huevos, ricos en triptófano). En consecuencia, la pelagra es el resultado de una doble carencia: en vitamina PP y en un aminoácido, el triptófano. Pero la carencia de triptófano es el resultado, a su vez, de un débil aporte de proteínas, sobre todo de origen animal. Por lo tanto, la pelagra es una enfermedad de malnutrición general.

#### **3.A.1.4. Vitamina B<sub>6</sub>**

Descubierta en 1935 por Györgyi al detectar en la levadura un factor diferente de las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, que curaba la dermatitis de la rata.

Esta vitamina fue aislada, analizada y sintetizada en 1938-1939, englobando tres sustancias con acción vitamínica: la piridoxina (función alcohol), el piridoxal (función aldehído) y la piridoxamina (función amina).

#### **3.A.1.5. Vitamina C**

Se halla ligada al escorbuto. Durante siglos todas las expediciones marítimas que partían en busca de tierras desconocidas vieron diezmar sus tripulaciones a causa de esta enfermedad.

El escorbuto afectaba no sólo a los marinos sino también a los ejércitos en campaña y a los habitantes de las ciudades asediadas. Cuando Vasco de Gama buscaba en 1498 la ruta de las Indias por el cabo de Buena Esperanza, casi un centenar de sus marineros murieron a causa del escorbuto.

No obstante, se sospechaba que el origen de la enfermedad estaba en la forma de alimentarse.

En 1787 un anglosajón Lind, fue el primero en preconizar, la prevención del escorbuto por medio del zumo de naranja o de limón, y así Cook pudo realizar la vuelta al mundo y descubrir Australia sin que sus hombres sufrieran esta enfermedad.

La experimentación científica comenzó en el siglo XIX con Holst y Fröhlich, quienes trataron de provocar el escorbuto en diferentes animales, alimentándolos sin vegetales frescos. No lo consiguieron en las ratas ni en los palomos (hoy se sabe que su organismo sintetiza esta vitamina), pero sí en el cobaya, el único, junto con el mono y el hombre, que no puede sintetizarla. Concluyeron que en las frutas y verduras existía un “principio antiescorbútico”, soluble en agua, que Funk clasificó en el grupo de las vitaminas, y que Drummond, en 1907, denominó vitamina C.

En 1928 Szent-Györgyi aisló, a partir del zumo de limón y de las glándulas suprarrenales de animales, un compuesto puro, polvo blanco cristalizado, de composición química próxima a la de la glucosa. Puesto que la ingestión de éste prevenía o curaba el escorbuto, se le puso el nombre de ácido ascórbico en 1932.

Su síntesis, fue realizada al mismo tiempo por Reichstein y Haworth en 1933. Actualmente, su fabricación a nivel industrial permite su uso en terapéutica y en la industria alimentaria.

### **3.A.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES**

#### **3.A.2.1. Vitamina A**

En la antigüedad, ya se conocía la influencia de los alimentos ricos en vitamina A sobre la visión y la piel. En el antiguo Egipto, el papiro de Eber, uno de los más antiguos tratados de medicina descubiertos (más de mil quinientos años antes del nacimiento de Cristo), recomendaba el hígado de buey y el hígado de gallo negro

contra la ceguera crepuscular y las lesiones que entrañaban una opacidad de la córnea.

Los médicos chinos conocían también desde época muy remota el efecto terapéutico del hígado, del que se descubrió en seguida su riqueza en vitamina A. En la Biblia (Tobías 11, 8), el arcángel Rafael sugiere a Tobías el uso de hiel de pescado para hacer desaparecer las manchas blancas de los ojos de su padre. Hipócrates recomendaba el hígado contra los trastornos visuales. Celso, médico romano (25 a.C. - 40 d.C.), fue sin duda el primero en hablar de xeroftalmia. Hacia 1750, en Alemania, se trataba la ceguera con ayuda del aceite de hígado de bacalao.

En 1881, antes de que se descubrieran las vitaminas, se había detectado en la leche una sustancia desconocida indispensable para la vida. En 1909 Hopkins y Stepp encontraron en la leche un factor de crecimiento al que denominaron vitamina A. En 1913 Mac Collum y Davis la obtuvieron a partir de la mantequilla y de la yema de huevo. Sin embargo, no fue aislada, y su sustancia química definida, hasta 1931, por Karrer. Su síntesis data de 1946-1947, y fue llevada a cabo por Isler.

### **3.A.2.2. Vitamina E**

En 1920 comenzó a sospecharse la avitaminosis E, al observarse el cese de la reproducción en la rata blanca, habitualmente muy prolífica, sometida a un régimen exclusivamente compuesto de leche desnatada. En el macho se interrumpe la formación de las células reproductoras y los testículos degeneran progresivamente. En la hembra, la ovulación y la fecundación se desarrollan normalmente, la gestación se inicia pero, muy pronto, el animal aborta o el embrión deja de desarrollarse y muere. Esta evolución puede hacerse regresiva al principio, mediante la adición a la dieta de germen de trigo. Se concluyó que existía, en ciertos alimentos, una vitamina liposoluble antiesterilidad.

De 1922 a 1925 Evans, Bishop y Sure manifestaron que dicho factor, que favorece la función de la reproducción, está presente en las hojas verdes de los vegetales y en el germen de los cereales. En 1936 Evans y Emerson extrajeron

del aceite de germen de trigo la sustancia dotada de esas propiedades, a la que denominaron vitamina E o Tocoferol (a partir de un término griego que significa “poner hijos en el mundo”). La síntesis fue realizada en 1938 por Karrer.

### **3.B. ESTRUCTURA, NOMENCLATURA Y CARACTERISTICAS**

### 3.B.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES (Merck Index, 1989 & Combs, 1992)

#### 3.B.1.1. Vitamina B<sub>1</sub>

Tiamina es la designación habitual para la vitamina conocida formalmente como vitamina B<sub>1</sub>, por su estructura básica; aneurina por sus características antineuríticas. Otros términos como polineuramina, vitamina antiberiberi, vitamina antineúrica han quedado obsoletos.

La tiamina se emplea principalmente en forma de hidrocloreuro; también tiene importancia otra de sus sales, el monohidrato; ambas son más estables que la tiamina en forma libre.

La fórmula empírica del hidrocloreuro de tiamina es C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS y su peso molecular es 337,28. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 1.

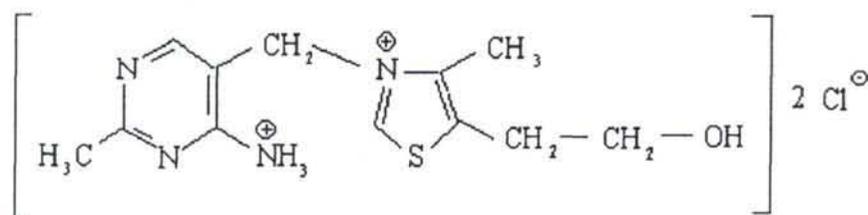


Fig. 1. Fórmula estructural de HIDROCLORURO de TIAMINA

Se compone de un anillo de pirimidina (2-metil-4-amino-5-metilpirimidina) y un anillo tiazol (4-metil-5-hidroxietiltiazol) conectados entre sí por un grupo metileno.

En estado de pureza, es un polvo cristalino blanco con olor a levadura, sabor amargo, y el pH al 1% de solución en agua es 3,13. Cristaliza a partir de soluciones alcohólico-acuosas en forma de agujas monoclinicas incoloras de hemihidrato (Gubler, 1991). Los cristales son higroscópicos y absorben un máximo de 1 mol de

agua. El punto de fusión del hidrocloreto de tiamina es 246-250 °C (Merck Index, 1989; Ellefson, 1984). La tiamina es muy soluble en agua, 1 g de tiamina se disuelve en 1 ml de agua, sin embargo en etanol 1 g de tiamina se disuelve en 100 ml de etanol del 95%. La tiamina es insoluble en éter dietílico, acetona, benceno, hexano y cloroformo.

La tiamina se destruye rápidamente en soluciones neutras o alcalinas, probablemente debido a la descomposición de la porción tiazólica. En solución ácida (a pH 2,0-4,0) resiste la esterilización durante 90 min a 120 °C sin ser destruída (Ellefson, 1984). La descomposición al calor depende del pH y del tiempo de exposición al mismo (Jansen, 1972). Seca es muy estable y no es sensible a la oxidación atmosférica. Al reducirse ligeramente, se forma un compuesto desprovisto de actividad vitamínica. La oxidación leve produce un disulfuro de actividad biológica igual a la de la vitamina. La oxidación in vitro, produce tiocromo, que es inactivo biológicamente.

La molécula de tiamina tiene un espectro de absorción característico en la zona de 200-300 nm, dependiendo los máximos del pH de la solución. Disuelta en 0,1 N de ácido clorhídrico muestra un máximo de absorción aproximadamente a 245 nm.

En la determinación química de la tiamina, el más importante compuesto es el tiocromo, mostrado en la figura 2.

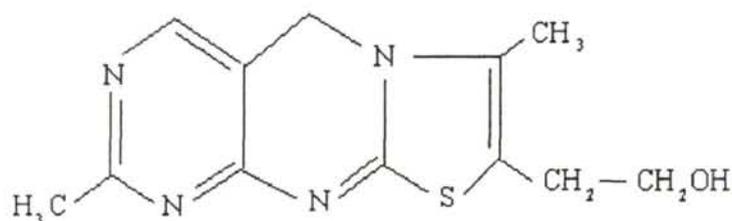


Fig. 2. Fórmula estructural de TIOCROMO

El tiocromo es cuantitativamente derivado de la tiamina por oxidación alcalina con bromuro de cianógeno o ferricianuro potásico. Este compuesto y sus fosfatos son

fluorescentes a pH más altos de 8,0 teniendo todos idéntica longitud de onda de excitación máxima a 375 nm y longitud de onda de emisión en el intervalo 432-435 nm. Las soluciones alcalinas de tiocromo y de sus fosfatos por encima de pH 9,0 son estables al menos tres días a temperatura ambiente.

### 3.B.1.2. Vitamina B<sub>2</sub>

Riboflavina, es la designación común para la vitamina conocida formalmente como vitamina B<sub>2</sub>, vitamina G, lactoflavina, ovoflavina, uroflavina, lisocromo, hepatoflavina (Cooperman & Lopez, 1991; Matts, 1980).

La fórmula empírica de la riboflavina es C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> y su peso molecular es 376,37. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 3.

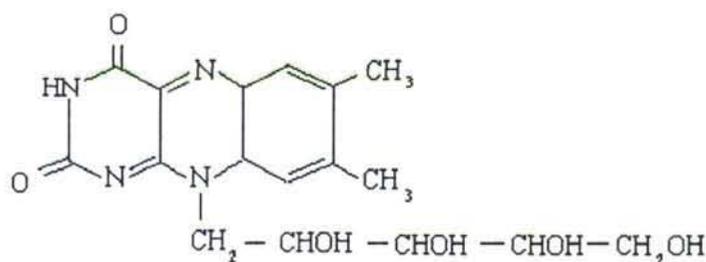


Fig. 3. Fórmula estructural de RIBOFLAVINA

Se compone del colorante flavínico lumicromo y del azúcar ribosa, por lo que se llama riboflavina.

Es un pigmento amarillo verdoso, que presenta en solución acuosa saturada un pH próximo a 6,0. Cristaliza en agujas amarillo-anaranjado. El punto de fusión de la riboflavina es 271-293 °C. La solubilidad de la riboflavina en agua es 0,012 g/100 ml, menos soluble en alcohol que en agua (0,0045 g/100 ml de etanol absoluto a 27,5 °C); ligeramente soluble en ciclohexanol, amil acetato, alcohol bencílico, fenol; insoluble en éter dietílico, acetona, benceno y cloroformo (Shah, 1984).

La riboflavina es relativamente estable en forma seca bajo luz normal. Es estable en soluciones fuertemente ácidas y frente a la mayoría de los agentes oxidantes ( $H_2O_2$ ,  $H_2Br_2O$ ,  $HNO_3$  concentrado), pero se oxida por ácido crómico. Se destruye en 10 min a temperatura ambiente, por la acción de  $KMnO_4$  en ácido acético 0,1 N, siendo la destrucción inferior al 10% a pH 4,5. Aunque es estable en presencia de  $H_2O_2$  se descompone por ésta en presencia del ión ferroso. En solución alcalina se produce disgregación relativamente rápida, especialmente bajo el influjo de la luz. Es muy sensible a la luz visible y a la ultravioleta. Todas las manipulaciones deben hacerse con luz atenuada o usando material de vidrio de color topacio. La irradiación visible o ultravioleta de soluciones alcalinas produce la formación de lumiflavina (6,7,9-trimetilisoaloxacina) y en soluciones ácidas o neutras, lumicromo (6,7-dimetilaloxacina) y parte de lumiflavina (Merck Index, 1989).

La riboflavina existe en forma libre, como flavinmononucleótido (FMN), como flavinadeninucleótido (FAD) y unida a proteínas (Cooperman & Lopez, 1991).

Las soluciones acuosas neutras son amarillas verdosas con absorción máxima a 223, 268, 359-375, 446 y 475 nm. El compuesto se caracteriza por tener fluorescencia con longitud de onda de excitación en el intervalo 440-500 nm y longitud de onda de emisión a 525 nm. Los espectros de absorción y fluorescencia son dependientes del pH.

### **3.B.1.3. Niacina**

Niacina es el descriptor genérico para el ácido 3-piridincarboxílico o ácido nicotínico y para los derivados que exhiben la actividad biológica de la nicotinamida. Se llama también factor PP y vitamina antipelagra.

La fórmula empírica del ácido nicotínico es  $C_6H_5O_2N$  y su peso molecular es 123,11. Su estructura según Merck Index (1989) se muestra en la figura 4.

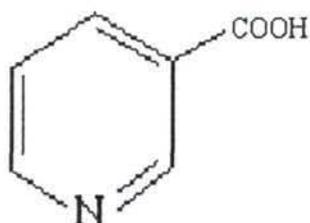


Fig. 4. Fórmula estructural de ACIDO NICOTINICO

Es un polvo blanco, cristalino con sabor ácido, y el pH al 1% de solución acuosa es 3,0. Cristaliza a partir de soluciones alcohólico-acuosas en forma de agujas incoloras. Los cristales no son higroscópicos. El punto de fusión del ácido nicotínico es 236,6 °C (Merck Index, 1989). Sublima sin descomposición. Es poco soluble en agua (aproximadamente 1 g/60 ml) y en alcohol (aproximadamente 1 g/100 ml), fácilmente soluble en álcalis y en propilenglicol. Insoluble en acetona y éter dietílico.

La amida de la niacina es biológicamente activa siendo la forma predominante en los tejidos animales. La fórmula empírica de la nicotinamida es  $C_6H_6ON_2$  y su peso molecular es 122,12. Su estructura según Merck Index (1989) se muestra en la figura 5.

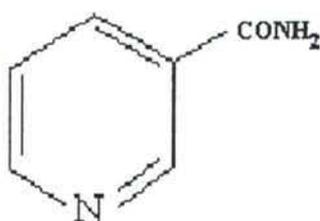


Fig. 5. Fórmula estructural de NICOTINAMIDA

La nicotinamida es un polvo blanco cristalino con sabor amargo, y el pH al 1% de solución acuosa es 6,0. Cristaliza a partir de soluciones de benceno en forma de

agujas. Los cristales son ligeramente higroscópicos. El punto de fusión es 128-131 °C (Merck Index, 1989). Destila a 150-160 °C a una presión de  $5 \times 10^{-4}$  mm Hg. Es muy soluble en agua (aproximadamente 1 g/ml), fácilmente soluble en alcohol, soluble en glicerina, ligeramente soluble en éter dietílico.

Ambas formas, el ácido y la amida, son estables en forma seca y en soluciones acuosas al oxígeno del aire, la luz y el calor. En soluciones muy ácidas o muy básicas la nicotinamida puede ser hidrolizada a ácido nicotínico.

Ambos poseen una fuerte absorción en la zona del ultravioleta con un máximo a 261 nm cuya intensidad es dependiente del pH.

#### **3.B.1.4. Vitamina B<sub>6</sub>**

El nombre de vitamina B<sub>6</sub> es el término genérico para seis compuestos que exhiben la misma actividad biológica: piridoxina (PN), fosfato de piridoxina (PNP), piridoxal (PL), fosfato de piridoxal (PLP), piridoxamina (PM) y fosfato de piridoxamina (PMP). Las abreviaturas han sido recomendadas por (IUPAC, Commission on Biochemical Nomenclature, 1970).

Se detallan las formas libres:

##### **- Hidrocloruro de piridoxina (PN)**

La fórmula empírica del hidrocloruro de piridoxina es  $C_8H_{12}ClNO_3$  y su peso molecular es 205,64. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 6.

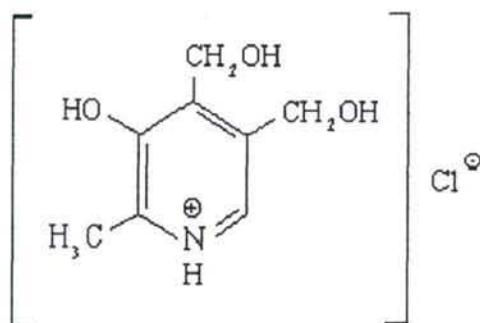


Fig. 6. Fórmula estructural de HIDROCLORURO de PIRIDOXINA

El pH al 10% de solución en agua es 3,2. El punto de fusión del hidrocloreuro de piridoxina es 160 °C (Merck Index, 1989), se descompone a 205-212 °C. Es muy soluble en agua (aproximadamente 1 g/4,5 ml), poco soluble en alcohol (aproximadamente 1 g/90 ml). Soluble en propilenglicol. Escasamente soluble en acetona, insoluble en éter dietílico y cloroformo.

Es bastante estable a la luz y el aire. Las soluciones acuosas ácidas son estables y pueden ser calentadas durante 30 min a 120 °C sin descomposición (Merck Index, 1989).

El máximo de absorción en la zona del ultravioleta para una solución preparada en ácido clorhídrico 0,1 N es 291 nm. Los vitámeros B<sub>6</sub> tienen todas ellas características fluorescentes con una longitud de onda de excitación máxima en el intervalo 295-305 nm y una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo 370-380 nm.

#### - Hidrocloreuro de piridoxal (PL)

La fórmula empírica del hidrocloreuro de piridoxal es C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>3</sub> y su peso molecular es 167,16. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 7.

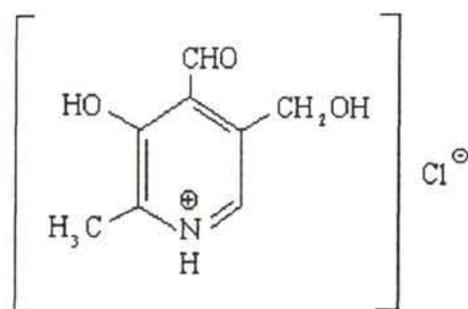


Fig. 7. Fórmula estructural de HIDROCLORURO de PIRIDOXAL

Cristaliza en el sistema rómbico. El pH al 1% de solución en agua es 2,65. El punto de fusión es aproximadamente 165 °C con descomposición (Merck Index, 1989). Es muy soluble en agua (1 g/2 ml), soluble en etanol al 95% de riqueza (1 g/59 ml).

Las soluciones acuosas son sensibles al calor.

El máximo de absorción en la zona del ultravioleta para una solución preparada en ácido clorhídrico 0,1 N es 292,5 nm.

#### - Dihidrocloruro de piridoxamina (PM)

La fórmula empírica del dihidrocloruro de piridoxamina es  $C_8H_{14}Cl_2N_2O_2$  y su peso molecular es 241,12. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 8.

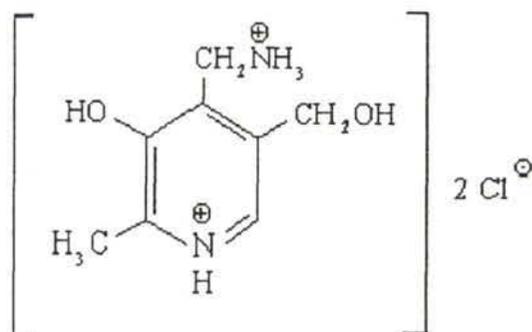


Fig. 8. Fórmula estructural de DIHIDROCLORURO de PIRIDOXAMINA

El pH al 1% de solución en agua es 2,4. El punto de fusión está en el intervalo 226-227 °C con descomposición. Es muy soluble en agua (1 g/2 ml), soluble en alcohol al 95% de riqueza (1 g/154 ml).

Es razonadamente estable a temperatura ambiente, no mostrando descomposición en tres días a 60 °C.

El máximo de absorción en la zona del ultravioleta para una solución a pH 1,94 es 287,5 nm.

### 3.B.1.5. Vitamina C

Vitamina C es el nombre genérico para todos los compuestos que exhiben la actividad biológica del ácido ascórbico. Los términos “ácido L-ascórbico” y “ácido ascórbico” son ambas designaciones habituales. La forma oxidada de este compuesto se denomina “ácido L-dehidroascórbico” o “ácido dehidroascórbico”.

La fórmula empírica del ácido L-ascórbico es  $C_6H_8O_6$  y su peso molecular es 176,12. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 9.

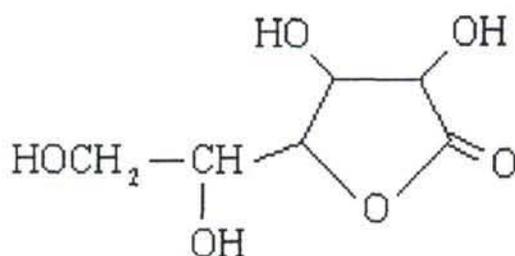


Fig. 9. Fórmula estructural de ACIDO L-ASCORBICO

Por su fórmula estructural contiene dos grupos enólicos. Es un polvo cristalino blanco con matiz amarillento, olor agradable y sabor ácido. Cristaliza en forma de agujas monoclinicas. El punto de fusión es 190-192 °C (Merck Index, 1989). Es

soluble en agua, 80% a 100 °C, 40% a 45 °C; es insoluble en éter dietílico, cloroformo, benceno, éter de petróleo, aceites, grasas y disolventes orgánicos.

El sistema redox AA-DHAA es la primera propiedad química importante de la vitamina C y forma la base para el análisis con detección electroquímica y para sus propiedades fisiológicas y estabilidad. Los cristales secos de ácido L-ascórbico no se alteran por la acción del aire y de la luz solar a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo. En soluciones acuosas a pH inferior a 7,6 el ácido L-ascórbico no se oxida al ser expuesto al aire, a menos que existan trazas de cobre, hierro u otros materiales que catalicen la reacción. En presencia de aire y de un catalizador adecuado, el ácido L-ascórbico se oxida muy fácilmente a ácido L-dehidroascórbico. Ambos compuestos tienen la misma actividad biológica con respecto a la prevención del escorbuto. La oxidación de ácido L-ascórbico se inhibe con agentes reductores tales como el sulfuro de hidrógeno, la homocisteína, el metabisulfito sódico, entre otros. Por debajo de pH 4,0 el ácido L-dehidroascórbico es bastante estable, pero a pH superior a 4,0 sufre una conversión irreversible a material biológicamente inactivo.

El compuesto no tiene propiedades fluorescentes. A la luz ultravioleta el ácido L-ascórbico, en solución muy ácida, tiene un máximo de absorción aproximadamente a 245 nm, pasando con reacción neutra a 265 nm.

### 3.B.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES

#### 3.B.2.1. Vitamina A

Vitamina A es el descriptor genérico para los compuestos con la actividad biológica del todo-*trans*-retinol. Estos compuestos derivan de un compuesto mono-cíclico que contiene cinco dobles enlaces y un grupo funcional en el extremo de la cadena.

La fórmula empírica del todo-*trans*-retinol es  $C_{20}H_{30}O$  y su peso molecular es 286,44. Su estructura química según Merck Index (1989) se presenta en la figura 10.

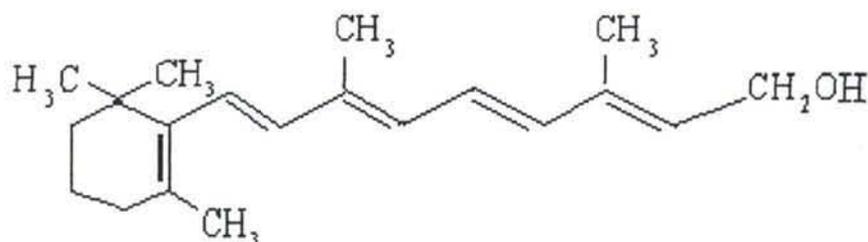


Fig. 10. Fórmula estructural de TODO-*TRANS*-RETINOL

Cristaliza en forma de prismas amarillos. El punto de fusión está en el intervalo 62-64 °C. Destila a 120-125 °C a una presión de  $5 \times 10^{-3}$  mm Hg.

La vitamina A es insoluble en agua, soluble en alcohol, y fácilmente soluble en éter dietílico, éter de petróleo, cloroformo, acetona, grasas y aceites.

Se oxida en la presencia del oxígeno del aire, la luz y el calor. Es extremadamente sensible a los ácidos, los cuáles pueden causar reagrupamientos de los dobles enlaces y deshidratación, seguida de procesos de isomerización *cis-trans* (Schwieter & Isler, 1967); es relativamente estable en la presencia de álcalis, no afectándose su estereoquímica por agentes reductores.

La luz de longitud de onda inferior a 500 nm produce la isomerización *cis-trans* de la vitamina, dependiendo la cantidad de los diferentes isómeros formados de la longitud de onda y del disolvente usado.

Las sales de la vitamina A, acetato y palmitato, son más estables a la oxidación, siendo sus características físico-químicas las siguientes:

#### - Acetato de todo-*trans*-retinol

La fórmula empírica es  $C_{22}H_{32}O_2$  y su peso molecular es 328,49. Cristaliza en forma de prismas amarillos pálidos. El punto de fusión es 57-58 °C. El máximo de absorción en etanol es 326 nm.

#### - Palmitato de todo-*trans*-retinol

La fórmula empírica es  $C_{36}H_{60}O_2$  y su peso molecular es 524,87. Amorfo o cristalino. El punto de fusión es 28-29 °C. El máximo de absorción en etanol está en el intervalo 325-328 nm.

El todo-*trans*-retinol presenta absorción ultravioleta con un máximo a 325 nm en etanol (Indyk, 1983) o isopropanol (Strohecker & Henning, 1966). Ambos, el retinol y los ésteres exhiben fuerte fluorescencia con longitud de onda de excitación máxima en el intervalo 325-330 nm y longitud de onda de emisión máxima en el intervalo 470-490 nm (Hubbard *et al.*, 1971).

### 3.B.2.2. Vitamina E

Ocho vitámeros de vitamina E se encuentran en la naturaleza: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles (Schudel *et al.*, 1972; Kasperek, 1980). Sus estructuras difieren en la cadena lateral, que en los tocoferoles presenta enlaces sencillos, mientras que en los tocotrienoles presenta tres dobles enlaces.

El estudio se ha centrado en uno de los vitámeros, el DL- $\alpha$ -tocoferol o DL- $\alpha$ -5,7,8-trimetiltocoferol y su sal correspondiente, el acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol; cuyas propiedades físico-químicas se detallan a continuación.

#### - DL- $\alpha$ -tocoferol

La fórmula empírica del DL- $\alpha$ -tocoferol es  $C_{29}H_{50}O_2$  y su peso molecular es 430,69. Su estructura según Merck Index (1989) se presenta en la figura 11.

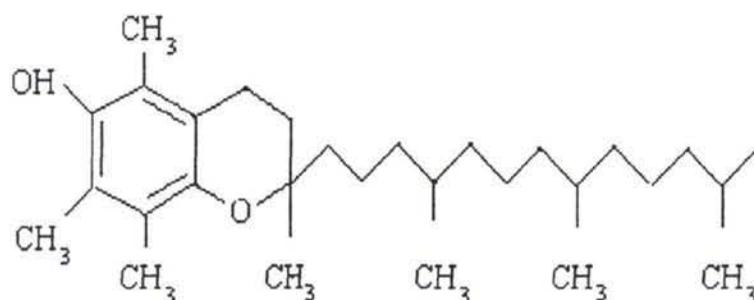


Fig. 11. Fórmula estructural de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

El DL- $\alpha$ -tocoferol es un aceite amarillo pálido, ligeramente viscoso. El punto de fusión está en el intervalo 2,5-3,5 °C. Es insoluble en agua, fácilmente soluble en aceites, grasas, acetona, alcohol, cloroformo, éter dietílico y otros disolventes orgánicos.

Se oxida lentamente en una atmósfera de oxígeno formando fundamentalmente quinonas inactivas biológicamente. Esta oxidación se acelera por exposición a la luz, el calor, las condiciones alcalinas y la presencia de trazas de minerales, tales como el hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Es estable al calor y los álcalis en la ausencia de oxígeno y no es afectado por ácidos hasta 100 °C. No se altera a la luz visible, pero es destrozado por la luz ultravioleta, especialmente en la presencia de oxígeno (Association of Vitamin Chemists, Inc., 1966; Scott, 1978).

La vitamina E exhibe una intensidad de absorción ultravioleta relativamente baja, con un máximo de absorción a 294 nm en etanol. El DL- $\alpha$ -tocoferol presenta una fuerte fluorescencia nativa con longitud de onda de excitación máxima a 295 nm y longitud de onda de emisión máxima a 330 nm (Duggan *et al.*, 1957).

#### - Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol

La fórmula empírica del acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol es  $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$  y su peso molecular es 472,73. Su estructura química según Merck Index (1989) se presenta en la figura 12.

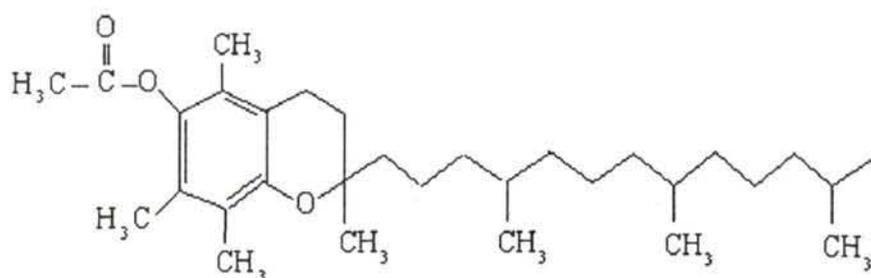


Fig. 12. Fórmula estructural de ACETATO de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

El acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol es un líquido viscoso amarillo pálido. Solidifica a  $-27,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es insoluble en agua, soluble en acetona, cloroformo, éter dietílico, y poco soluble en alcohol.

El acetato no es prácticamente afectado por la oxidación influenciada por el aire, la luz visible y la luz ultravioleta.

El acetato presenta un máximo de absorción a  $285,5\text{ nm}$  en etanol y se ha caracterizado por no ser fluorescente, pero con la ayuda de la técnica HPLC acoplada a un detector de fluorescencia, se ha mostrado que exhibe un 9% de la fluorescencia del DL- $\alpha$ -tocoferol (Barnes & Taylor, 1980). La longitud de onda de excitación máxima es  $285\text{ nm}$  y la longitud de onda de emisión máxima es  $310\text{ nm}$ .

### **3.C. FUENTES ALIMENTARIAS**

### **3.C. FUENTES ALIMENTARIAS (Vivanco *et al.*, 1990 & Carretero Baeza y Gómez Vázquez, 1995).**

#### **3.C.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES**

##### **3.C.1.1. Vitamina B<sub>1</sub>**

Está presente en casi todos los tejidos animales y vegetales, sin embargo las fuentes alimentarias más importantes son las carnes sobre todo de cerdo, los despojos (riñones), el hígado de vaca, las legumbres secas (guisante, haba, garbanzo, lenteja, entre otros), el germen de cereales (centeno, maíz) en la parte periférica del grano; siendo eliminada durante la molienda y el cernido de las harinas, permaneciendo en los productos integrales. Se halla en algunos frutos secos (almendra, avellana, nuez), en la yema de huevo, en la patata, en menor proporción en los pescados (anchoa, almeja, sardina).

##### **3.C.1.2. Vitamina B<sub>2</sub>**

Abunda en la naturaleza, siendo sus principales fuentes alimentarias el hígado y los riñones, los frutos secos (almendra, avellana, nuez), la leche y derivados, la yema de huevo, las carnes (cordero, ternera, cerdo), las legumbres secas (haba, lenteja, garbanzo), las verduras y las hortalizas (perejil, espinaca, guisante verde), la envoltura de los cereales (centeno, maíz, trigo) y los pescados (langosta, anchoa, sardina, entre otros). En menor proporción están las frutas (naranja, fresa, melocotón).

##### **3.C.1.3. Niacina**

Se encuentra en forma de nicotinamida en las carnes y los pescados (mejores fuentes de niacina que los productos vegetales) y en forma de ácido nicotínico en las frutas y las verduras (proporcionan poca cantidad de niacina). Las carnes (pollo, ternera, vaca, cerdo) contienen altos niveles de niacina y de triptófano (aminoácido que puede ser transformado por el organismo en niacina).

Destaca el contenido de niacina en el hígado; en menor proporción se halla en las legumbres y en la envoltura de los cereales. Algunos alimentos tales como la leche y los huevos son fuentes pobres de niacina preformada, pero contienen en abundancia a su precursor: el triptófano. Las investigaciones han indicado que las proteínas contienen al menos un 1% de triptófano, esto es, 60 g de proteínas aportan 600 mg de triptófano o 10 NEs (Horwitt *et al.*, 1981).

#### **3.C.1.4. Vitamina B<sub>6</sub>**

De las fuentes animales, las carnes (ternera, cerdo) y las vísceras (hígado) tienen más vitamina que los pescados. De las plantas, las leguminosas, el plátano, la patata están entre las más ricas. Los huevos y la leche son fuentes con menor contenido en vitamina B<sub>6</sub>.

#### **3.C.1.5. Vitamina C**

Está muy extendida en la naturaleza. Todos los vegetales la contienen, sobre todo los tejidos muy coloreados (verdes, rojos) de las frutas y las verduras, a un nivel máximo cuando están crudas, pero igualmente, si bien en menor grado, cuando están cocidas, en conserva o ultracongeladas.

De las verduras y las hortalizas son ricas en vitamina C el perejil, el pimiento, la col de Bruselas, la acelga, el tomate según la especie y la estación. No todos los vegetales contienen mucha vitamina C (berenjena, alcachofa, zanahoria).

Destacan en contenido de vitamina C las frutas de reacción ácida, pues la presencia de ácido constituye un factor de estabilidad para la vitamina (acerola, fresón, fresa, agrios).

Las carnes, el hígado y la leche tienen poca vitamina C.

Los cereales, la harina y los productos a base de éstas, el almidón, el azúcar, el huevo, las grasas y aceites animales y vegetales, no tienen vitamina C.

### 3.C.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES

#### 3.C.2.1. Vitamina A

La vitamina A se encuentra principalmente en la materia grasa, visible o invisible, de algunos alimentos de origen animal. El aceite de hígado de bacalao o de rodaballo, es la fuente principal, el hígado de pescado, el hígado de vaca, la materia grasa de los productos lácteos (mantequilla, leche entera, queso), la yema de huevo.

En general la carne contiene poca vitamina A, en la de vaca se encuentran proporciones superiores de esta vitamina.

Los vegetales no contienen vitamina A libre, pero sí sus provitaminas (caroteno, xantofila). El enzima *carotinasasa* desdobla en el hígado el caroteno en vitamina A. Las provitaminas se hallan en los vegetales fuertemente coloreados en rojo, amarillo o verde (zanahoria, espinaca, escarola, perejil, entre otros) y también en algunas frutas como melón, melocotón, cereza, naranja, y otras.

#### 3.C.2.2. Vitamina E

Las fuentes más importantes son de origen vegetal (germen de trigo, aceites extraídos de semillas o de frutos, sobre todo los aceites de primer prensado en frío y no refinados (maíz, algodón, soja, oliva), los frutos oleaginosos y, en menor grado, las legumbres secas (garbanzo, alubia, lenteja), las verduras y las hortalizas (espárrago, endivia).

La concentración es menos importante en los productos de origen animal: el hígado de buey, la yema de huevo, los pescados grasos (sardina), las carnes, la leche y el queso.

En las tablas (1-5) se detallan datos sobre la composición en estas vitaminas de algunos de los alimentos anteriormente mencionados. Los nombres científicos de éstos se encuentran en las tablas (6-7).

TABLA 1. Composición de alimentos españoles (Vivanco *et al.*, 1990)

ALIMENTOS	Vitamina B <sub>1</sub> (mg)	Vitamina B <sub>2</sub> (mg)	Niacina (mg)	Vitamina C (mg)	Vitamina A (UI)
<b>LECHE</b>					
1. Leche de vaca fresca	0,04	0,20	0,10	2	120
2. Leche en polvo entera	0,30	1,40	0,80	4	1000
3. Leche en polvo descremada	0,35	1,90	1,00	6	40
<b>CARNES</b>					
4. Carne de cordero	0,20	0,25	4,00	-	-
5. Carne de cerdo poco grasa	0,60	0,20	3,00	-	-
6. Carne de cerdo muy grasa	0,30	0,15	2,50	-	-
7. Carne de ternera magra	0,14	0,25	6,30	-	20
8. Carne de ternera semigrasa	0,06	0,16	3,60	-	40
9. Carne de vaca magra	0,07	0,17	4,00	-	30
10. Carne de vaca grasa	0,06	0,15	3,30	-	50
11. Hígado de vaca	0,40	4,50	15,00	10	7000
12. Carne de pavo	0,09	0,15	8,00	-	-
<b>HUEVOS</b>					
13. Huevo de gallina (2 piezas)	0,15	0,30	0,10	-	1000
<b>PESCADOS</b>					
14. Almeja	0,10	0,16	1,40	-	250
15. Anchoa	0,20	0,50	2,00	-	50

Datos obtenidos por análisis realizados en el Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas, Sección de Nutrición, (1990).  
Cantidades aportadas por 100 gramos de alimentos crudos.

TABLA 2. Composición de alimentos españoles (Vivanco *et al.*, 1990)

ALIMENTOS	Vitamina B <sub>1</sub> (mg)	Vitamina B <sub>2</sub> (mg)	Niacina (mg)	Vitamina C (mg)	Vitamina A (UI)
16. Boquerón	0,08	0,20	2,70	-	100
17. Langosta	0,13	0,60	1,90	-	-
18. Sardina	0,08	0,21	3,00	-	100
19. Merluza	0,05	0,10	3,00	-	-
<b>VERDURAS y HORTALIZAS</b>					
20. Achicoria	0,07	0,18	0,51	12	7000
21. Acelga	0,05	0,06	0,40	35	2800
22. Berenjena	0,04	0,04	0,80	5	30
23. Col de Bruselas	0,16	0,16	0,90	90	200
24. Guisante verde	0,35	0,20	2,00	25	600
25. Perejil	0,12	0,24	1,00	140	6000
26. Tomate	0,07	0,04	0,50	20	1000
27. Zanahoria	0,06	0,04	0,70	5	10000
<b>FRUTAS</b>					
28. Cereza	0,05	0,06	0,40	10	650
29. Fresa	0,03	0,07	0,30	60	60
30. Limón	0,04	0,02	0,10	40	20
31. Manzana	0,04	0,03	0,20	4	100
32. Naranja	0,08	0,20	0,20	55	200
33. Plátano	0,05	0,04	0,60	8	100

Datos obtenidos por análisis realizados en el Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas, Sección de Nutrición, (1990).  
 Cantidades aportadas por 100 gramos de alimentos crudos.

TABLA 3. Composición de alimentos españoles (Vivanco *et al.*, 1990)

ALIMENTOS	Vitamina B <sub>1</sub> (mg)	Vitamina B <sub>2</sub> (mg)	Niacina (mg)	Vitamina C (mg)	Vitamina A (UI)
<b>LEGUMBRES</b>					
34. Garbanzo	0,45	0,18	1,60	-	150
35. Guisante seco	0,55	0,15	2,50	-	100
36. Haba seca	0,50	0,30	2,30	-	100
37. Lenteja	0,40	0,20	2,00	-	100
<b>FRUTOS SECOS</b>					
38. Almendra	0,30	0,60	4,50	-	-
39. Nuez	0,30	0,50	3,00	-	-
<b>CEREALES</b>					
40. Centeno (harina integral)	0,50	0,20	2,00	-	-
41. Maíz (grano)	0,43	0,10	1,90	-	450
42. Pan trigo (blanco)	0,11	0,06	1,10	-	-
43. Pan trigo (integral)	0,19	0,13	2,20	-	-
<b>GRASAS</b>					
44. Mantequilla	-	-	-	-	3200

Datos obtenidos por análisis realizados en el Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas, Sección de Nutrición, (1990).  
Cantidades aportadas por 100 gramos de alimentos crudos.

TABLA 4. Composición de alimentos españoles (Carretero y Gómez, 1995)

ALIMENTOS	Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	Vitamina E (mg)
<b>LECHE</b>		
1. Leche entera	0,04	0,10
2. Leche descremada	0,04	Tr
<b>CARNES</b>		
3. Carne de cerdo magra	0,47	0
4. Carne de ternera (lomo)	0,61	0,19
<b>HUEVOS</b>		
5. Huevo de gallina (2 piezas)	0,12	2,00
<b>PESCADOS</b>		
6. Boquerón	1,10	0,02
7. Sardina	0,96	1,60
8. Merluza	0,16	0,35
<b>VERDURAS y HORTALIZAS</b>		
9. Ajo	0,32	0,10
10. Endivia	0,05	1,00
11. Tomate	0,13	0,89

Datos obtenidos por análisis realizados en el Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense, (1995). Cantidades aportadas por 100 gramos de parte comestible.

TABLA 5. Composición de alimentos españoles (Carretero y Gómez, 1995)

ALIMENTOS	Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	Vitamina E (mg)
<b>FRUTAS</b>		
12. Manzana	0,04	0,36
13. Naranja	0,06	0,21
14. Plátano	0,37	0,23
<b>LEGUMBRES</b>		
15. Garbanzo	0,15	3,10
16. Lenteja	0,70	1,80

Datos obtenidos por análisis realizados en el Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense, (1995). Cantidades aportadas por 100 gramos de parte comestible.

TABLA 6. Nombres científicos de alimentos (CAE, 1996)

NOMBRE GENERALIZADO	NOMBRE CIENTIFICO
<b>ACEITES</b>	
Algodón	<i>Gossypium</i> sp.
Oliva	<i>Olea europaea</i>
Soja	<i>Glycine soja</i>
<b>CEREALES</b>	
Centeno	<i>Secale cereale</i>
Maíz	<i>Zea mays</i>
Trigo	<i>Triticum</i> sp.
<b>FRUTAS</b>	
Agrios	<i>Citrus</i> sp.
Almendra	<i>Prunus amygdalus</i>
Avellana	<i>Corylus avellana</i>
Cereza	<i>Prunus avium</i>
Fresa	<i>Fragaria vesca</i>
Fresón	<i>Fragaria elatior</i>
Limón	<i>Citrus limonis</i>
Manzana	<i>Pyrus malus</i>
Melocotón	<i>Prunus persica</i>
Melón	<i>Cucumis melo</i>
Naranja	<i>Citrus aurantium</i>
Nuez	<i>Juglans regia</i>
Plátano	<i>Musa paradisiaca</i>
<b>HORTALIZAS, VERDURAS y LEGUMBRES</b>	
Acelga	<i>Beta vulgaris</i>
Acerola	<i>Crataegus azarolus</i>
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>
Ajo	<i>Allium sativum</i>

TABLA 7. Nombres científicos de alimentos (CAE, 1996)

<b>NOMBRE GENERALIZADO</b>	<b>NOMBRE CIENTIFICO</b>
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i>
Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>
Col de Bruselas	<i>Brassica oleracea</i>
Endivia	<i>Cichorium endivia</i>
Escarola	<i>Cichorium intybus</i>
Espárrago	<i>Asparragus officinalis</i>
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>
Guisante	<i>Pisum sativum</i>
Haba	<i>Vicia faba</i>
Lenteja	<i>Lens sculenta</i>
Perejil	<i>Petroselinum sativum</i>
Pimiento	<i>Capsicum annum</i>
Tomate	<i>Solanum lycopersicon</i>
Zanahoria	<i>Dacus carota</i>
<b>MARISCOS</b>	
Almeja fina	<i>Tapes decussatus</i>
Langosta	<i>Palimurus vulgaris</i>
<b>PESCADOS</b>	
Anchoa o Boquerón	<i>Engraulis encrasicolus</i>
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>
Merluza	<i>Merlucius merlucius</i>
<b>TUBERCULOS</b>	
Patata	<i>Solanum tuberosum</i>

### **3.D. ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN EL HOMBRE**

### **3.D.1. METABOLISMO FUNCIONAL**

### **3.D.1. METABOLISMO FUNCIONAL (Leboulanger, 1981; Lehninger, 1983; Lyon, 1987; Ball, 1988; National Research Council, 1989 & Combs, 1992).**

#### **3.D.1.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES**

##### **3.D.1.1.1. Vitamina B<sub>1</sub>**

Las funciones bioquímicas de la vitamina B<sub>1</sub> exigen su conversión en pirofosfato de tiamina (TPP), que sirve de coenzima en varias reacciones del metabolismo de los glúcidos catalizadas enzimáticamente.

Una de las funciones principales del pirofosfato de tiamina es la descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos, entre los que destacan el piruvato y el  $\alpha$ -cetoglutarato. La descarboxilación oxidativa del piruvato en acetilcoenzima A (CoA) es una reacción fundamental en la oxidación de los carbohidratos y de algunos substratos de aminoácidos en el ciclo del ácido cítrico (CAC) y en el almacenamiento de los sobrantes de carbohidratos en forma de grasa (Krampitz, 1968). La descarboxilación oxidativa es una reacción compleja con muchas etapas, que requieren pirofosfato de tiamina y las coenzimas de otras tres vitaminas B: ácido pantoténico (CoA), riboflavina (FAD) y niacina (NAD). Esto demuestra las funciones interdependientes de varias de las vitaminas B en el metabolismo de la energía.

El pirofosfato de tiamina participa además como coenzima de la transcetolasa en el ciclo del fosfato de pentosa, que hace posible a la célula transformar fosfato de pentosa en fosfato de hexosa. La importancia de este ciclo radica en la elaboración de pentosas para la composición de los nucleótidos y ácidos nucleicos y en la formación de trifosfopiridinnucleótido (TPNH<sub>2</sub>) reducido, que se precisa para la síntesis de ácidos grasos en la célula.

Como consecuencia de la estrecha vinculación de la vitamina B<sub>1</sub> con el metabolismo de los hidratos de carbono, la administración de una alimentación rica en éstos aumenta las necesidades normales de vitamina B<sub>1</sub>.

### **3.D.1.1.2. Vitamina B<sub>2</sub>**

Actúa como parte de un grupo de enzimas llamadas flavoproteínas o flavoenzimas, que intervienen en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Las formas con actividad metabólica son FMN y FAD, que participan en la degradación oxidativa del piruvato, de los ácidos grasos y de los aminoácidos, así como en el proceso de transporte electrónico en las reacciones de oxidación-reducción.

### **3.D.1.1.3. Niacina**

En su forma amida constituye dos coenzimas, el dinucleótido de nicotinamida y de adenina (NAD), llamado también difosfopiridinnucleótido (DPN) y el fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina (NADP), llamado también trifosfopiridinnucleótido (TPN). Ambos sirven de portadores de hidrógeno en múltiples reacciones catalizadas por deshidrogenasas específicas del substrato. El NAD oxidado se requiere en las principales vías metabólicas que culminan en la descomposición oxidativa de hexosas, aminoácidos y ácidos grasos: glucólisis, descarboxilación oxidativa del piruvato, ciclo del ácido cítrico, desaminación de aminoácidos y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El NADP reducido se necesita en la síntesis de ácidos grasos, colesterol y de las hormonas esteroideas. De ahí que sea necesario en todas las células y tejidos.

El organismo puede suministrar parte de las necesidades requeridas a partir del aminoácido triptófano.

### **3.D.1.1.4. Vitamina B<sub>6</sub>**

La vitamina B<sub>6</sub> desempeña una importante actividad en el metabolismo celular; siendo la forma metabólicamente activa el fosfato de piridoxal, implicado coenzimáticamente en el metabolismo de los aminoácidos.

Interviene en la síntesis de la adrenalina y la noradrenalina. Por consiguiente, es esencial para el buen funcionamiento del cerebro y regulariza el sistema nervioso vegetativo.

Además, participa en otras funciones, entre ellas se destaca la conversión del triptófano en vitamina PP; en el metabolismo de los lípidos favoreciendo el ahorro y la transformación de los ácidos grasos insaturados que los constituyen, como el ácido linoleico. Interviene en el mantenimiento de un nivel normal de colesterol en sangre, y es necesaria para la síntesis de los ácidos biliares. En el metabolismo de los glúcidos facilita y acelera la formación de glucógeno en los músculos, disminuyendo la fatigabilidad de los mismos. Permite el mantenimiento de un porcentaje normal de magnesio en la sangre y los tejidos. Estimula la síntesis de la hemoglobina. Desempeña un papel en el metabolismo del ácido oxálico, permitiendo reducir su nivel en la orina, disminuyendo el riesgo de litiasis renal. Es necesaria para el buen desarrollo del feto. También se ha atribuido a la vitamina B<sub>6</sub> un papel terapéutico en la enfermedad de Parkinson.

### **3.D.1.1.5. Vitamina C**

Entre sus funciones se destacan las hidroxilaciones para sintetizar colágeno (proteína fibrosa formada por tres cadenas polipeptídicas que se unen para formar una hélice). Esos péptidos tienen una composición especial de aminoácidos; están compuestos sobre todo por glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina. Las fibras de colágeno comunican rigidez a la sustancia amorfa del tejido conectivo, son además un componente esencial de la matriz orgánica de los huesos y de los dientes en el tejido cicatrizal formado durante la cicatrización y las fracturas óseas.

Participa en otras hidroxilaciones que incluyen la conversión de timina en hidroximetiluracilo, así como dos etapas de la biosíntesis de carnitina (Hulse *et al.*, 1978) que interviene en el metabolismo de los ácidos grasos.

Las hidroxilaciones dependientes de esta vitamina también se presentan en la síntesis de dos neurotransmisores: serotonina y noradrenalina.

La absorción intestinal de hierro (Prasad, 1975) se favorece con la presencia de vitamina C.

Participa en la regulación del potencial de oxidación-reducción y en la transferencia de hidrógeno en varios sistemas de transporte de electrones.

La forma reducida cumple una función como antioxidante celular pues protege otras sustancias fácilmente oxidables, vitaminas A y E. La forma oxidada, ácido dehidroascórbico, desempeña un papel importante en la oxidación de la fenilalanina y tirosina, pero puesto que sólo una pequeña proporción de la vitamina está presente como ácido dehidroascórbico en el organismo, ésta no es la actividad principal.

Participa en la transferencia de colesterol hacia el hígado a partir de los tejidos y en la conversión de colesterol en ácidos biliares (Ginter, 1979; Hanck & Weiser, 1979).

Cameron *et al.*, (1979) han demostrado el papel fundamental de esta vitamina en la optimización de la salud y en la resistencia a enfermedades infecciosas siendo imprescindible para el normal funcionamiento de las células.

### **3.D.1.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES**

#### **3.D.1.2.1. Vitamina A**

Una adecuada ingesta de vitamina A es esencial en la química de la visión, y para el normal desarrollo del tejido epitelial y las estructuras óseas. En el proceso de la visión, participa en la formación de la rodopsina, proteína localizada en los bastones, que son los receptores responsables de la visión nocturna.

Interviene además en la formación y función de las células epiteliales de la piel. Activa la regeneración de los tejidos y favorece la cicatrización, estimulando la proliferación del tejido conjuntivo. Devuelve a las pieles secas flexibilidad y

elasticidad. En unión de la vitamina C, favorece la formación de las fibras colágenas, y por consiguiente el buen estado de la piel.

Los huesos necesitan vitamina A para crecer y desarrollarse normalmente; según algunos investigadores esta función está relacionada con los cambios celulares que acontecen durante la diferenciación. Es también necesaria para el crecimiento y la reproducción en ratas, cerdos y otros animales.

Es indispensable para mantener la estructura y la función normal de la membrana celular.

La vitamina A desempeña un importante papel protector, reduciendo el riesgo de desarrollo del cáncer. Es preventiva e incluso curativa de algunos cánceres (piel, tubo digestivo, vejiga, pulmón). Puede hacer retroceder las alteraciones precancerosas del cuello del útero y contrarrestar el efecto maligno inducido por virus, productos químicos o radiaciones.

También hay evidencias de que está implicada en la producción de anticuerpos.

#### **3.D.1.2.2. Vitamina E**

La vitamina E como antioxidante natural, intracelular, interviene, en la estabilización de los ácidos grasos insaturados, evitando la formación de lipoperóxidos tóxicos. En la carne, la vitamina E estabiliza el color rojo e impide el desarrollo de pigmentos parduzcos. Inhibe las nitrosaminas formadas a partir de los nitritos. En el organismo protege a la vitamina A, sensible al oxígeno, de la desintegración oxidativa y mejora así la asimilación de esta vitamina. Con estas propiedades antioxidantes se relacionan las lesiones de los vasos sanguíneos y los cambios en la permeabilidad capilar que tienen lugar si hay carencia de vitamina E.

Es un importante factor protector de la membrana de los eritrocitos, aumentando su resistencia frente a agentes hemolíticos.

Destacan otras funciones específicas como el efecto de la vitamina para el mantenimiento de la función testicular. En las hembras, la carencia origina una reabsorción del feto. Evita además la degeneración muscular y la necrosis hepática.

Influye en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en la síntesis de ácidos grasos poliénicos. Estimula la producción de hormonas de la hipófisis y posee una función catalítica específica en el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria de las mitocondrias.

### **3.D.2. CONSECUENCIAS DE LA CARENCIA VITAMINICA**

### **3.D.2. CONSECUENCIAS DE LA CARENCIA VITAMÍNICA (Lyon, 1987; Ball, 1988; National Research Council, 1989 & Combs, 1992).**

#### **3.D.2.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES**

##### **3.D.2.1.1. Vitamina B<sub>1</sub>**

La carencia de esta vitamina está asociada con alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono referidas a un decrecimiento en la descarboxilación oxidativa. Durante deficiencias severas, los niveles de piruvato en el plasma y en los tejidos se incrementan.

Los signos clínicos de insuficiencia se han notado cuando se excretan en la orina menos de 70 µg de vitamina B<sub>1</sub> (Horwitt *et al.*, 1948).

El síntoma clínico asociado con una prolongada ingesta de una dieta baja en tiamina se llama beriberi en el hombre y polineuritis en las aves. Afecta a los sistemas cardiovascular y nervioso. Los signos iniciales son anorexia, náuseas, vómitos, inapetencia, diarreas e insomnio, entre otros; luego sobrevienen otros síntomas como confusión mental, debilidad muscular, fatigabilidad, polineuritis, parálisis, edemas en el beriberi húmedo, taquicardias, oftalmoplejía (parálisis de los músculos oculares), ataxia (incoordinación muscular) y desgaste muscular en el beriberi seco (Horwitt *et al.*, 1948; Williams *et al.*, 1942).

En niños los síntomas aparecen más rápidamente que en los adultos siendo más severos, y a veces fatales (McCormick, 1988).

##### **3.D.2.1.2. Vitamina B<sub>2</sub>**

La carencia grave de esta vitamina no suele caracterizarse por un cuadro clínico peculiar sino que se manifiesta en un gran número de síntomas no específicos como alteraciones a nivel de los ojos [hipersensibilidad a la luz, opacidad, queratitis (congestión de la córnea), disminución de la agudeza visual]; a nivel de

las mucosas [queilitis (inflamación de los labios, que se vuelven lisos, secos, brillantes, y de sus comisuras, que supuran, se agrietan y se arrugan), glositis (inflamación de la lengua)]; a nivel de la piel [dermatitis seborreica (exceso de secreciones grasas)].

Puesto que la riboflavina es esencial para el funcionamiento de las vitaminas B<sub>6</sub> y niacina, algunos síntomas atribuidos a su deficiencia son debidos a un fallo de los sistemas que requieren estos otros nutrientes para operar adecuadamente (McCormick, 1988).

### **3.D.2.1.3. Niacina**

Las personas que reciben una dieta insuficiente en triptófano y deficiente en niacina, presentan una enfermedad carencial conocida como pelagra, caracterizada por dermatitis, diarrea y en casos severos, demencia.

Las alteraciones cutáneas figuran entre los síntomas característicos en el hombre, y las zonas más afectadas son las expuestas al sol: eritema (manchas rojas), prurito (comezón), después aparición de vesículas y descamación, signos más o menos comparables a los de una insolación. Se detecta también acrocianosis (coloración azul violácea de las extremidades, las manos, los pies, las orejas), así como sabañones.

Los trastornos en el tracto digestivo se observan tanto en el hombre como en el animal siendo los síntomas: glositis (inflamación de la lengua), estomatitis, esofagitis, gastritis, enteritis, diarrea, a menudo náuseas o vómitos, anorexia.

Los síntomas nerviosos se manifiestan en insomnio, dolor de cabeza, signos de confusión y depresivos, alteraciones de la memoria, irritabilidad, pudiendo evolucionar hasta la demencia, con alucinaciones y delirio. Con frecuencia, se presenta polineuritis de los miembros inferiores.

#### **3.D.2.1.4. Vitamina B<sub>6</sub>**

La deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> raramente se presenta sola y se manifiesta en el hombre con carencias de otros representantes del complejo vitamínico B.

La ingestión insuficiente de vitamina B<sub>6</sub> repercute en el hombre y en las diversas especies animales según la edad; en los niños puede ocasionar retraso del crecimiento o pérdida de peso, vómitos y dolor abdominal, convulsiones y anemia (Bessey *et al.*, 1957; Coursin, 1954). En los adultos se advierten alteraciones de personalidad (depresión y confusión), fatiga, vértigos, migrañas, convulsiones, dermatitis seborreica y lesiones bucales parecidas a las causadas por carencia de riboflavina y niacina.

#### **3.D.2.1.5. Vitamina C**

La deficiencia en la dieta de vitamina C conduce al escorbuto, una enfermedad caracterizada por la debilidad de las estructuras de colágeno que resultan en serias hemorragias capilares (Hornig, 1975; Woodruff, 1975).

Los síntomas principales del escorbuto son debilidad, fatiga física, apatía, conducta neurótica, pérdida de apetito; dolor de huesos, articulaciones y músculos, fuga ósea del calcio y del fósforo; sequedad y endurecimiento de la piel; petequias (pequeños puntos rojos) en brazos, piernas y conjuntivas; hemorragias musculares; tumefacción, friabilidad y color rojizo de las encías, que sangran con facilidad; aflojamiento de los dientes; neuritis por hemorragias de nervios; imposibilidad de cicatrización de las heridas; convulsiones, choque y muerte. A todo esto hay que añadir alteraciones del metabolismo de los glúcidos (hiperglucemia), disminución de la síntesis del tejido conjuntivo, anemia por carencia de hierro, disminución de la formación de tirosina, y degeneración y atrofia del cuerpo amarillo del ovario.

### **3.D.2.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES**

#### **3.D.2.2.1. Vitamina A**

La xerofthalmia por carencia de vitamina A es la causa más importante de ceguera en muchos países atrasados del mundo, afectando principalmente a la gente joven (Passmore & Eastwood, 1986).

Los trastornos más precoces y los más graves que produce la avitaminosis A se refieren a la vista. El primer signo es una disminución de la visión crepuscular (hemeralopía). Si la carencia se prolonga, se manifiestan signos más graves: la córnea se ulcera, después se ablanda y se deforma, el iris y el cristalino se reblandecen, y se evoluciona hacia la ceguera total. Los trastornos oculares, tratados desde su inicio, son reversibles, pero si la carencia se prolonga, el aporte de vitamina no siempre asegura la interrupción del trastorno hacia la ceguera. De ahí la importancia de una detección precoz. La disminución de la visión crepuscular es el signo más seguro de carencia de vitamina A.

Junto a los signos oculares, pueden producirse retrasos destacables en el crecimiento del niño.

La piel también experimenta alteraciones por avitaminosis A: se vuelve compacta y se reseca, enrojece, pica, se pela anormalmente, manifestándose en la parte posterior del cuello, espalda, brazos y antebrazos, nalgas y cara interna de los muslos y de las piernas. El cuero cabelludo sufre la deficiencia en forma de una pérdida de brillantez del cabello. Otro síntoma determinante es la alteración del estado general: pérdida de apetito o anorexia, mayor predisposición a las infecciones así como menor resistencia a todo tipo de estrés.

Se ha detectado una relación entre cánceres de estómago, de colon, de recto, de próstata y un débil consumo de vitamina A.

La vitamina A, puede acarrear fenómenos de sobredosis; pudiendo ser puesta en reserva en cantidad importante por el organismo, en especial por el hígado, cuando se absorbe en grandes cantidades de forma continua y prolongada. Los síntomas de hipervitaminosis A son anorexia, trastornos en la pigmentación cutánea, caída del cabello, trastornos de calcificación, trastornos nerviosos, dolores de cabeza, irritabilidad, y descamación de la piel, entre otros.

#### **3.D.2.2.2. Vitamina E**

La carencia en vitamina E es difícil de establecer, ya que su abundancia en los alimentos hace improbable cualquier déficit de aportación. Como se asimila fácilmente, apenas hay carencias de utilización, salvo en pacientes con mala digestión o mala absorción intestinal de la grasa.

Estudios experimentales demuestran que en los casos de deficiencia los signos son diversos y varían según las especies animales y la composición del régimen alimentario. Las carencias son más estrictas cuando hay insuficiencia de aporte de selenio y exceso en la dieta de ácidos grasos insaturados.

Los casos más evidentes en que pueden sobrevenir deficiencias de vitamina E corresponden a los recién nacidos y, sobre todo, a los prematuros con bajas reservas. El síndrome del déficit vitamínico en estos casos se caracteriza por anemia hemolítica (destrucción de los glóbulos rojos) o anemia hipocroma (por falta de hierro), la cuál es debida a un deficiente transporte de vitamina E a través de la placenta (Johnson, 1979).

Esta carencia dificulta la absorción de las grasas y produce diarrea grasa, retrasa el desarrollo muscular y, en algunos casos, produce ceguera por retinopatía progresiva (degeneración del cristalino).

El déficit de vitamina E afecta a las funciones reproductivas en varones y mujeres, aconsejándose en los casos de peligro de aborto espontáneo. Ensayos

experimentales en ratas, han hallado trastornos de la nidación y aborto en la hembra; en el macho, esterilidad definitiva.

### **3.E. RECOMENDACIONES NUTRICIONALES E INGESTA**

### 3.E. RECOMENDACIONES NUTRICIONALES E INGESTA (National Research Council, 1989 & Moreiras *et al.*, 1994)

La industrialización creciente de todos los sectores de la vida y el desarrollo de la investigación científica sobre los alimentos durante este siglo, han conducido a un cambio en los hábitos de la alimentación humana. Para una correcta nutrición no es necesario consumir determinados alimentos, sino las cantidades adecuadas de energía y nutrientes (proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas) que están almacenadas en ellos. Las necesidades nutricionales difieren según la edad, el sexo, el tamaño corporal, el estado fisiológico y la estructura genética.

Se dispone de tablas sobre alimentación con las cantidades diarias recomendadas (CDR) para la población, preparadas por organismos internacionales y basadas en datos científicos. A este respecto se señala la tabla 8 donde aparecen las recomendaciones hechas para la población española en el Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense de Madrid y la tabla 9 presentada por el "National Research Council" (USA), con las recomendaciones para la población de Estados Unidos.

Las cifras incluidas en estas tablas son suministradas por una cantidad determinada de alimento, correspondiente a 100 gramos.

(1) Las cantidades de vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub> y niacina se han calculado en función de la ingesta energética recomendada para los individuos según los siguientes coeficientes: vitamina B<sub>1</sub> 0,4 mg, vitamina B<sub>2</sub> 0,6 mg y equivalentes de niacina 6,6 mg por 1000 Kcal.

(2) 1 equivalente de niacina = 1 mg de niacina o 60 mg de triptófano.

(3) 1 equivalente de retinol = 1 µg de retinol o 6 µg de β-caroteno.

(4) 1 equivalente de α-tocoferol = 1 mg de α-tocoferol

Los valores de otras vitaminas se expresan en miligramos (10<sup>-3</sup> g) o microgramos (10<sup>-6</sup> g).

TABLA 8. Recomendaciones Nutricionales, Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense de Madrid, Revisadas 1994

Categoría Edad (años)	Vitamina B <sub>1</sub> (1) mg	Vitamina B <sub>2</sub> (1) mg	Equivalentes de niacina (1) y (2) mg	Vitamina B <sub>6</sub> mg	Vitamina C mg	Vitamina A: Eq. retinol (3) µg	Vitamina E (4) mg
<b>Niños y Niñas</b>							
0,0-0,5	0,3	0,4	4	0,3	50	450	6
0,5-1,0	0,4	0,6	6	0,5	50	450	6
1-3	0,5	0,8	8	0,7	55	300	6
4-5	0,7	1	11	1,1	55	300	7
6-9	0,8	1,2	13	1,4	55	400	8
<b>Hombres</b>							
10-12	1	1,5	16	1,6	60	1.000	10
13-15	1,1	1,7	18	2,1	60	1.000	11
16-19	1,2	1,8	20	2,1	60	1.000	12
20-39	1,2	1,8	20	1,8	60	1.000	12
40-49	1,1	1,7	19	1,8	60	1.000	12
50-59	1,1	1,6	18	1,8	60	1.000	12
60-69	1	1,4	16	1,8	60	1.000	12
+70	0,8	1,3	14	1,8	60	1.000	12
<b>Mujeres</b>							
10-12	0,9	1,4	15	1,6	60	800	10
13-15	1	1,5	17	2,1	60	800	11
16-19	0,9	1,4	15	1,7	60	800	12
20-39	0,9	1,4	15	1,6	60	800	12
40-49	0,9	1,3	14	1,6	60	800	12
50-59	0,8	1,2	14	1,6	60	800	12
60-69	0,8	1,1	12	1,6	60	800	12
+70	0,7	1	11	1,6	60	800	12
<b>Gestación (2ª mitad)</b>							
	+0,1	+0,2	+2	+2	80	800	+3
<b>Lactancia</b>							
	+0,2	+0,3	+3	+1,5	85	1.300	+5

TABLA 9. Recommended Dietary Allowances, Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences-National Research Council, Revised 1989

Categoría Edad (años)	Vitamina B <sub>1</sub> (1) mg	Vitamina B <sub>2</sub> (1) mg	Equivalentes de niacina (1) y (2) mg	Vitamina B <sub>6</sub> mg	Vitamina C mg	Vitamina A: Eq. retinol (3) µg	Vitamina E (4) mg
<b>Niños y Niñas</b>							
0,0-0,5	0,3	0,4	5	0,3	30	375	3
0,5-1,0	0,4	0,5	6	0,6	35	375	4
1-3	0,7	0,8	9	1	40	400	6
4-6	0,9	1,1	12	1,1	45	500	7
7-10	1	1,2	13	1,4	45	700	7
<b>Hombres</b>							
11-14	1,3	1,5	17	1,7	50	1.000	10
15-18	1,5	1,8	20	2	60	1.000	10
19-24	1,5	1,7	19	2	60	1.000	10
25-50	1,5	1,7	19	2	60	1.000	10
+51	1,2	1,4	15	2	60	1.000	10
<b>Mujeres</b>							
11-14	1,1	1,3	15	1,4	50	800	8
15-18	1,1	1,3	15	1,5	60	800	8
19-24	1,1	1,3	15	1,6	60	800	8
25-50	1,1	1,3	15	1,6	60	800	8
+51	1	1,2	13	1,6	60	800	8
<b>Embarazadas</b>							
	1,5	1,6	17	2,2	70	800	10
<b>Lactancia</b>							
1° 6 meses	1,6	1,8	20	2,1	95	1.300	12
2° 6 meses	1,6	1,7	20	2,1	90	1.200	11

La ingesta recomendada para la **vitamina B<sub>1</sub>** (tabla 8) se basa en requerimientos de 0,4 mg/1000 Kcal y 0,5 mg/1000 Kcal (tabla 9). Se han estimado estas cantidades para ofrecer una adecuada protección a todos los adultos. Se recomienda un mínimo de 1 mg/día, incluso para aquellos que consumen menos de 2000 Kcal/día. Durante el embarazo y la lactancia las necesidades de tiamina aumentan puesto que la ingesta de energía se incrementa en 300 Kcal/día y hay una secreción de 0,2 mg de tiamina/día en la leche (Nail *et al.*, 1980). Para la población infantil se aconseja una dosis de tiamina de 0,4 mg/1000 Kcal lo que aporta un margen de seguridad en la ausencia de deficiencias clínicas y bioquímicas.

La cantidad de **vitamina B<sub>2</sub>** se basa en requerimientos de 0,6 mg/1000 Kcal, sugiriéndose dosis mínimas de 1,2 mg/día para adultos sanos. Sin embargo, puesto que la ingesta depende del aporte energético las recomendaciones varían entre los adultos. Durante el embarazo y la lactancia, en vistas de un incremento en la síntesis de tejido para el desarrollo fetal y maternal, se recomienda un suplemento adicional de 0,3 mg/día. Este nivel de 0,6 mg/1000 Kcal es válido también para niños de todas las edades cubriendo así los márgenes de seguridad.

Las recomendaciones de **niacina** durante los últimos 20 años han sido de 6,6 NEs/1000 Kcal. Durante el embarazo y la lactancia, a pesar de la existencia de un mecanismo biológico que aumenta la capacidad de las mujeres de convertir triptófano en derivados de niacina, se sugiere elevar la ingesta de vitamina en 2 NEs diarios, debido a un mayor aporte energético. Para niños menores de 6 meses de edad se deben suministrar 8 NEs/1000 Kcal y para mayores de 6 meses las recomendaciones se basan en los mismos estándar que los adultos, 6,6 NEs/1000 Kcal, siendo las dosis incrementadas en proporción a la ingesta de energía.

Respecto a la **vitamina B<sub>6</sub>** una relación de 0,016 mg/g proteína parece asegurar un nivel aceptable de vitamina en todos los adultos. Las CDR se establecen considerando el límite superior de ingesta proteica aceptado, que es 126 g/día para hombres y 100 g/día para mujeres. El aporte vitamínico diario se establece así en 2 mg/día para hombres y 1,6 mg/día para mujeres. Puesto que la vitamina B<sub>6</sub> y las proteínas tienden a aparecer unidas de forma natural en los alimentos, un alto

consumo proteico es adecuado para cubrir los niveles vitamínicos. Durante el embarazo y la lactancia el aporte extra de proteínas está acompañado de un incremento de vitamina. Para niños menores de 6 meses de edad se deben suministrar 0,3 mg/día y 0,6 mg/día hasta 1 año. Para niños mayores se mantienen las recomendaciones de 0,02 mg/g proteína.

La **vitamina C** es poco retenida en el organismo en ausencia de una ingesta continua. Las recomendaciones diarias se han establecido a un nivel que previene los síntomas del escorbuto durante varias semanas cuando la dieta de vitamina C es escasa. En el adulto la dosis es de 60 mg/día, siendo fácilmente suministrada por una alimentación ordinaria. Los fumadores presentan concentraciones menores de ácido ascórbico en el suero (Johnson *et al.*, 1984; Smith & Hodges, 1987), por lo que se les sugiere ingestas mínimas de 100 mg/día. Durante el embarazo la concentración de vitamina C en el plasma sanguíneo disminuye como resultado de la hemodilución que acompaña a éste (Hytten, 1980), por lo tanto para compensar esta pérdida se recomienda elevar el aporte en 10 o 20 mg/día. Para niños menores de 6 meses hay diferencias entre las dosis propuestas variando entre 30 y 50 mg/día, cantidades que se van elevando gradualmente hasta alcanzar los niveles de los adultos.

Respecto a la **vitamina A** la ingesta recomendada para adultos es de 1000 RE en hombres y 800 RE en mujeres sobre la base de su menor peso corporal. Los ancianos ingieren las mismas cantidades de vitamina A que los adultos. Durante el embarazo no es necesario ningún incremento adicional de vitamina. En ausencia de datos específicos sobre las necesidades de los niños las recomendaciones para éstos como se aprecia en las tablas (8-9) varían considerablemente.

Las CDR para la **vitamina E** varían de la población española a la americana. En España para todos los adultos se proponen dosis mayores que para la población americana. En ambos casos se asume que las mujeres embarazadas necesitan consumir cantidades mayores. Los aportes aconsejados para niños derivan de la información acerca de la concentración de tocoferol en la leche humana (Jansson *et al.*, 1981). Los requerimientos de vitamina E se incrementan con el aumento de peso corporal.

#### **4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE LOS METODOS ANALITICOS**

## 4.A. VITAMINAS HIDROSOLUBLES

### 4.A.1. Vitamina B<sub>1</sub>

A lo largo de los años se han propuesto muchos métodos para analizar la vitamina B<sub>1</sub>. Cada uno de ellos con ventajas e inconvenientes que limitan su utilidad.

Primeramente se desarrollaron los **métodos con animales** (Ellefson, 1984), puesto que la naturaleza vitamínica de la B<sub>1</sub> se detectó, en un principio, por observaciones de la falta de desarrollo en el hombre y en los animales alimentados con dietas deficientes en esta vitamina. La medida del crecimiento y los experimentos curativos tuvieron una aplicación muy generalizada en ratas, palomas y pollos. El experimento de crecimiento requiere de 6 a 8 semanas para completar un análisis, el procedimiento curativo es ligeramente más corto. Esta característica del tiempo es uno de los inconvenientes principales de los métodos biológicos. Esto, unido a la necesidad de tener grandes grupos de animales y dietas cuidadosamente preparadas, los hace también muy caros (Gubler, 1991). Como ocurre con todos los datos biológicos, los resultados varían considerablemente, dependiendo del grupo particular de animales o de las técnicas usadas. Se ha demostrado que las bacterias del aparato intestinal pueden sintetizar tiamina y ponerla a disposición del animal. Esto introduce otra complicación en la evaluación de los datos obtenidos por métodos biológicos (Gubler, 1991).

Los **métodos microbiológicos** incluyen procedimientos de fermentación y técnicas que comprenden el crecimiento o la formación de ácido por bacterias, levaduras, mohos u hongos (Ellefson, 1984). Estos métodos consumen mucho menos tiempo (de 4 horas a 3 días), son más económicos, dan resultados más reproducibles que los métodos con animales y son más sensibles llegando a la detección de 5-50 ng de vitamina B<sub>1</sub> (Ellefson, 1984; Gubler, 1991). Se han usado en la detección de tiamina *Phycomyces blakeslecanus*, *Kloeckera brevis*, *Ochromonas danica*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus fermenti* y *Neurospora crassa* (Friedrich, 1987; Gubler, 1991). Los métodos microbiológicos difieren mucho en su especificidad. Los ensayos que emplean

*Ochromonas danica* y *Kloeckera brevis* son los más específicos, porque estos microorganismos responden solamente a la molécula de tiamina y a los ésteres fosfóricos de ésta. *Lactobacillus fermenti* responde a los productos de descomposición de tiamina. *Lactobacillus viridescens* es muy usado, mientras que *Neurospora crassa* y *Phytomyces blakeslecanus* son poco utilizados (Strohecker & Henning, 1966; Friedrich, 1987).

Los **métodos químicos** son más comúnmente empleados, son rápidos y económicos, y más aplicables para determinaciones rutinarias que la mayoría de los otros métodos. El más utilizado es el método del tiocromo que implica la oxidación de la tiamina a tiocromo, que tiene fluorescencia azul con la luz ultravioleta. Se han usado muchos agentes oxidantes para oxidar la tiamina tales como el ferricianuro de potasio [ $K_3Fe(CN)_6$ ], el permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ), el óxido de manganeso ( $MnO_2$ ) (Dyke, 1965), el bromuro de cianógeno (CNBr) (Fujiwara & Matsui, 1953), el cloruro de mercurio (II) ( $HgCl_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Ryan & Ingle, 1980; Friedrich, 1987).

La oxidación de tiamina a tiocromo fluorescente está acompañada por la formación simultánea de disulfuro de tiamina, producto resultante de la condensación de dos moléculas de tiamina. La relación de tiocromo a disulfuro está afectada por el pH (Kawasaki, 1963), el disolvente (Wostman & Knight, 1960) y el agente oxidante (Sykes & Todd, 1951).

Los **métodos cromatográficos** son los más utilizados en nuestros días, especialmente aquellos referidos a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) por tener la ventaja de la selectividad y velocidad del análisis. La vitamina B<sub>1</sub> puede ser determinada directamente como tiamina si la detección se realiza por medidas en el ultravioleta (Hilker & Clifford, 1982; Ayi *et al.*, 1985; Vidal-Valverde & Reche, 1990a) y como tiocromo si la detección es por fluorescencia. Las determinaciones con fluorescencia incrementan la sensibilidad de los análisis y reducen el rango de factores interferentes (Fellman *et al.*, 1982). Los métodos HPLC determinan tiamina individualmente o de forma simultánea con otras vitaminas hidrosolubles. Un breve resumen de los diferentes métodos HPLC para la determinación de tiamina se presentan en las tablas (10-12). Las tablas (16-19) exponen la determinación simultánea de tiamina y riboflavina. La

tiamina se extrae de la muestra matriz mediante hidrólisis ácida generalmente con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético o ácido perclórico en un autoclave. Posteriormente el pH se ajusta a 4,0-4,5 y luego se trata enzimáticamente. Algunas veces se precipitan las proteínas de la muestra o se centrifuga. Después, el extracto se purifica en algunos casos con cartuchos Sep-Pak (Hilker & Clifford, 1982; Vidal-Valverde & Reche, 1990a; Bauer *et al.*, 1991) y se filtra finalmente para su determinación por HPLC.

En el análisis por ultravioleta la longitud de onda empleada está en el intervalo 245-280 nm, generalmente 254 nm. En fluorescencia la longitud de onda de excitación está en el rango 320-390 nm y la longitud de onda de emisión está entre 400-530 nm. Como condiciones de HPLC, el modo más utilizado es la cromatografía en fase inversa, empleando como fase estacionaria columnas C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub>. Las fases móviles son muy diferentes, incluyendo disolventes orgánicos, mezclas de metanol, etanol o acetonitrilo con soluciones tampón de fosfato, de citrato y también con reactivos de par-iónico.

TABLA 10. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>1</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 N en autoclave, hidrólisis enzimática, filtración, oxidación con ferricianuro potásico, extracción con 2-butanol	Lichrosorb RP-8	Metanol/Acetonitrilo/2-Butanol (80:10:10)	FL 370:425 nm	Carnes, patatas y vegetales	Bognar (1981)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave, centrifugación, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	RP-18	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM/Acetonitrilo/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3,9:1:0,1)	UV 245 nm	Cereales	Hilker & Clifford (1982)
Hidrólisis ácida con HClO <sub>4</sub> , centrifugación, hidrólisis enzimática	μ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 μm	Metanol/Tampón de citrato sódico 0,05 M a pH 4,0 (45:55)	FL 367:435 nm	Sangre y leche	Wielders & Mink (1983)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N a reflujo, hidrólisis enzimática, filtración, oxidación con ferricianuro potásico, filtración 0,45 μm	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Agua/Metanol (70:30)	FL 365:435 nm	Patatas	Finglas & Faulks (1984)
Dilución en agua, purificación en columna SCX	Zorbax CN, 6 μm	Tampón de trietilamina a pH 7,7/Metanol (90:10)	UV 245 nm	Alimentos infantiles	Ayi <i>et al.</i> , (1985)
Hidrólisis ácida con TCA 30%, centrifugación, extracción con agua saturada de éter dietílico, oxidación	PRP-1, 10 μm	Tampón de Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 15 mM a pH 8,5/ Metanol/ Tetrahidrofurano (80:10:10)	FL 365:433 nm	Sangre	Bettendorff <i>et al.</i> , (1986)

TABLA 11. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>1</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M, hidrólisis enzimática, centrifugación, oxidación	Nucleosil NH <sub>2</sub> , 5 μm	Tampón de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 25% a pH 4,4 en acetonitrilo	FL 370:425 nm	Alimentos dietéticos	Bötticher & Bötticher (1986)
Hidrólisis ácida con ácido sulfosalicílico 5%, centrifugación, oxidación	Columna C <sub>18</sub> , 3 μm	Tampón de Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M a pH 5,5 y 2,6	FL 339:432 nm	Alimentos	Vanderslice & Huang (1986)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en agua hirviendo 1 h, hidrólisis enzimática, centrifugación, oxidación	Lichrosorb Li60, 5 μm	Cloroformo/Metanol (80:20)	FL 375:430 nm	Tejidos animales y sangre	Bailey & Finglas (1990)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M y 6 M en autoclave a 121 °C, hidrólisis enzimática, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 μm	Metanol/Acido acético/Hexano y heptano sulfonato	UV 254 nm	Alimentos	Vidal-Valverde & Reche (1990a)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M, hidrólisis enzimática, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub> , oxidación	Lichrosorb RP-8, 5 μm	Metanol/Acetonitrilo/2-Butanol (80:10:10)	FL 370:425 nm	Alimentos	Bauer <i>et al.</i> , (1991)
Hidrólisis ácida con TCA 10%, centrifugación, oxidación	Hypersil ODS, 5 μm	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 25 mM/Metanol	FL 365:450 nm	Tejidos	Sander <i>et al.</i> , (1991)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 N en autoclave 30 min, hidrólisis enzimática, centrifugación	Merckosorb Si60, 10 μm	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 6,5 en etanol	FL 366:464 nm	Alimentos	Abdel-Kader (1992)

TABLA 12. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>1</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M en autoclave 30 min a 120 °C, oxidación	Lichrospher RP-18, 5 µm	Metanol/Agua conteniendo ácido hexanosulfónico a pH 3,6	FL 370:425 nm	Alimentos	Bognar (1992)
Dilución en agua, hidrólisis ácida con HCl 1 N en agua hirviendo 30 min, hidrólisis enzimática, purificación en columna Bio-Rex, centrifugación, oxidación	Hypersil ODS	Tampón de citrato 0,05 M a pH 4.5	FL 365:425 nm	Pollo	Fox <i>et al.</i> , (1992)
Dilución en agua, hidrólisis ácida con HCl 0,2 M y HClO <sub>4</sub> 70%, centrifugación, hidrólisis enzimática, oxidación	Lichrosorb NH <sub>2</sub> , 5 µm	Metanol/Diclorometano (10:90)	FL 365:440 nm	Productos biológicos	Laschi-Loquerie <i>et al.</i> , (1992)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en agua hirviendo 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, purificación en columna SPE, oxidación	Novapak C <sub>18</sub> , 4 µm	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /Metanol	FL 366:435 nm	Alimentos	Ollilainen <i>et al.</i> , (1993)
Hidrólisis ácida con TCA 10%, centrifugación, purificación con éter dietílico y n-hexano, oxidación	µ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 µm	Tampón de citrato amónico 15 mM a pH 4,2/Eter dietílico 0,4% en ácido fórmico 0,1 M (90:10)	FL 365:435 nm	Sangre	Herve <i>et al.</i> , (1994)

#### 4.A.2. Vitamina B<sub>2</sub>

Primero se desarrollaron **métodos de ensayo con animales** empleando ratas y pollos. El análisis con ratas (Bourquin & Sherman, 1931) se utilizó como patrón para investigar otros métodos. Los experimentos que emplean animales son más largos, más caros y menos exactos. La ventaja principal de estos procedimientos es que se basan en respuestas biológicas (Matts, 1980; Shah, 1984) lo que es importante desde un punto de vista nutricional.

Los **métodos microbiológicos** se fundamentan en un incremento en el número de microorganismos o en la formación de ácido debido a la presencia de vitamina B<sub>2</sub>. En los primeros ensayos se utilizaron *Leuconostoc mesenteroides* o *Tetrahymena pyriformis*, pero *Lactobacillus casei* es el más usado actualmente. Estos ensayos son sensibles, pero requieren de 1 a 3 días para su determinación (Matts, 1980; Shah, 1984; Cooperman & Lopez, 1991).

Los **métodos químicos** de la vitamina B<sub>2</sub> dependen de la intensidad de fluorescencia de la misma. El método fluorimétrico es muy empleado y muy sensible, pero pueden interferir otras sustancias fluorescentes (Matts, 1980; Shah, 1984; Russell & Vanderslice, 1992a). Los métodos oficiales de la AOAC (1990 ref. 970.65) para la determinación de esta vitamina son fluorimétricos.

Los **métodos HPLC** son los más utilizados por sus múltiples ventajas. La detección de vitamina B<sub>2</sub> se realiza por ultravioleta o fluorescencia. Un breve resumen de los diferentes métodos HPLC para su determinación se presenta en las tablas (13-15).

La extracción es similar a la adoptada para la vitamina B<sub>1</sub>; pero Ashoor *et al.*, (1985) extrajeron la vitamina B<sub>2</sub> directamente de la leche y de derivados con una etapa de dilución en agua o tampón y un proceso de purificación con cartuchos Sep-Pak. Ashoor *et al.*, (1985); Barná E. (1991) y Vidal-Valverde & Reche (1990b) usaron la purificación a través de columnas y cartuchos Sep-Pak. Como condiciones de HPLC, el modo más utilizado ha sido la cromatografía en fase inversa, empleando principalmente como fase estacionaria columnas C<sub>18</sub>. También se han usado columnas C<sub>8</sub> (Macrae *et al.*, 1984; Reyes *et al.*, 1988),

columnas con fases enlazadas de grupos amino (Bognar, 1981) y columnas C<sub>22</sub> (Lumley & Wiggins, 1981). La cromatografía en fase inversa de pares iónicos también se desarrolla (Watada & Tran, 1985; Reyes *et al.*, 1988 y Vidal-Valverde & Reche, 1990b). Las condiciones de elución y las fases móviles son muy diferentes y se describen en las tablas (13-15).

TABLA 13. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>2</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 N en autoclave, hidrólisis enzimática, filtración	Lichrosorb NH <sub>2</sub> , 10 µm	Metanol/Tampón de acetato a pH 4,5 (50:50)	FL 467:525 nm	Carnes, patatas y vegetales	Bognar (1981)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en autoclave, hidrólisis enzimática	RP C <sub>22</sub>	Agua/Tampón de citrato a pH 5,8 en metanol (3:2)	FL 469:520 nm	Alimentos	Lumley & Wiggins (1981)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave, centrifugación, filtración 0,20 µm	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	Agua/Metanol/Acido acético (56:43:1)	FL 450:510 nm	Pasta	Woodcock <i>et al.</i> , (1982)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N a reflujo, hidrólisis enzimática, filtración	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	Agua/Metanol (70:30)	FL 450:510 nm	Patatas	Finglas & Faulks (1984)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave, filtración	Technicon LC-8	Tampón de citrato tripotásico 1 mM a pH 3,5/Metanol (70:30)	FL 450:520 nm	Alimentos	Macrae <i>et al.</i> , (1984)
Dilución en agua o tampón de acetato 0,02 M a pH 4,0, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	BioSil ODS 5S	Agua/Metanol/Acido acético (65:34,9:0,1)	UV 270 nm	Productos lácteos	Ashoor <i>et al.</i> , (1985)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M en autoclave 15 min a 120 °C, hidrólisis enzimática, centrifugación	Lichrosorb RP-18, 5 µm o µ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 µm	Metanol/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /Dioxal (30:60:10)	FL 453:521 nm	Alimentos	Brubacher <i>et al.</i> , (1985)

TABLA 14. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>2</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Extracción con sacarina 10%, filtración	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	Agua/Metanol (73:27)	UV 254 nm	Alimentos	Suhara <i>et al.</i> , (1985)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 30 min a 99 °C, hidrólisis enzimática	Ultrasphere ODS, 5 $\mu$ m	Metanol/Agua conteniendo ácido heptanosulfónico 5 mM a pH 4,5	FL 450:530 nm	Frutas, vegetales	Watada & Tran (1985)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas	Hypersil ODS, 5 $\mu$ m	Metanol/Agua a pH 4,5 (2:3)	FL 440:520 nm	Alimentos	Johnsson & Branzell (1987)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 N en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas	Silica, 10 $\mu$ m	Tampón de acetato y ácido acético	FL 425:525 nm	Alubias de soja	Kader & Ryley (1988)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en autoclave 30 min a 121 °C	Lichrosorb RP-8, 10 $\mu$ m	Metanol/Agua conteniendo ácido heptanosulfónico 5 mM (40:60)	FL 440:565 nm	Alimentos	Reyes <i>et al.</i> , (1988)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en autoclave 20 min, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	Nucleosil C <sub>18</sub> , 10 $\mu$ m	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 7,0/Acetonitrilo (89,5:10,5)	UV 268 nm	Alimentos infantiles	Barná E. (1991)
Hidrólisis ácida con ácido fórmico 6%, centrifugación, extracción en columna	LC-18, 3 $\mu$ m	Metanol/Acido fórmico 10% (1:4)	FL 450:530 nm	Alimentos	Bilic & Sieber (1990)

TABLA 15. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>2</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 M en autoclave 20 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	Spherisorb S5 ODS-2, 5 µm	Metanol/Agua (35:65)	FL 445:525 nm	Alimentos	Ollilainen <i>et al.</i> , (1990)
Purificación en columna y en Sep-Pak C <sub>18</sub>	µ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 µm	Metanol/Acido acético/Agua conteniendo hexanosulfonato sódico 5 mM	UV 254 nm	Alimentos	Vidal-Valverde & Reche (1990b)

TABLA 16. Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINA B<sub>1</sub> (T) y VITAMINA B<sub>2</sub> (R)

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Acido acético glacial/Agua conteniendo ácido pentanosulfónico y heptanosulfónico.	UV 254 nm	Arroz	Toma & Tabekhia (1979)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1N en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, oxidación	Spherisorb silica, 20 μm	Cloroformo/Metanol (90:10)	FL T 367 nm FL R 270 nm	Carnes	Ang & Moseley (1980)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 30 min a 121 °C, centrifugación	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Acetonitrilo/Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 7,0 conteniendo ácido heptano sulfónico 5 mM (12,5:87,5)	UV 254 nm	Alimentos	Kamman <i>et al.</i> , (1980)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 M, hidrólisis enzimática, oxidación	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Tampón de acetato 0,2 M conteniendo ácido heptano sulfónico 5 mM	UV 250 nm FL 390:475 nm	Alimentos	Skurray (1981)
Hidrólisis ácida con HCl en autoclave 15 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas, oxidación, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	C <sub>8</sub> -Radial-Pak, 10 μm	Metanol/Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 7,0 (37:63)	FL R 450:530 nm FL T+R 360:415 nm	Alimentos	Fellman <i>et al.</i> , (1982)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 30 min, hidrólisis enzimática, oxidación	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Agua/Metanol (70:30)	FL T 365:435 nm FL R 450:510 nm	Patatas	Finglas & Faulks (1984)

TABLA 17. Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINA B<sub>1</sub> (T) y VITAMINA B<sub>2</sub> (R)

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N en agua hirviendo 10 min, hidrólisis enzimática, oxidación	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Agua (60:40)	FL 360:415 nm	Cereales	Mauro & Wetzel (1984)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N en agua hirviendo 30 min, hidrólisis enzimática, centrifugación, oxidación	μ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 μm	Metanol/ Acido acético/Agua conteniendo hexanosulfonato sódico 5mM (30:1:69)	FL 360:460 nm	Cereales	Wehling & Wetzel (1984)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N, hidrólisis enzimática, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub> -Radial-Pak	Metanol/Agua conteniendo ácido hexanosulfónico 5mM (40:60)	FL T 360:425 nm FL R 360:500 nm	Alimentos	Wimalasiri & Wills (1985)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N y 6 N en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas, oxidación	Columna C <sub>10</sub> , 10 μm	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 M a pH 7,0/Metanol (70:30)	FL T 378:430 nm FL R 464:540 nm	Carnes	Dawson <i>et al.</i> , (1988)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 N en baño de agua 60 min a 70 °C, hidrólisis enzimática, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	NovaPack C <sub>18</sub>	Metanol/Solución de par iónico (20:80)	UV 254 nm	Alimentos	Bötticher <i>et al.</i> , (1989)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 M en baño de agua 30 min a 100 °C, hidrólisis enzimática, oxidación	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Tampón de acetato sódico 0,05 M a pH 4,5 (60:40)	FL T 366:435 nm FL R 422:522 nm	Alimentos dietéticos	Hasselmann <i>et al.</i> , (1989)

TABLA 18. Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINA B<sub>1</sub>(T) y VITAMINA B<sub>2</sub>(R)

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, oxidación, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 μm	Metanol/Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM a pH 7,0 (35:65)	FL T 325:400 nm FL R 360:530 nm	Cereales	Reyes & Subryan (1989)
Dilución en agua, 30 min a 90 °C, hidrólisis ácida con HCl 5 N en autoclave 15 min a 121 °C, centrifugación, oxidación	Ultrasphere C <sub>18</sub> , 5 μm	Acetonitrilo/Tampón de acetato 0,01 M a pH 5,5 (13:87)	FL T 364:436 nm FL R 436:535 nm	Alubias de soja	Fernando & Murphy (1990)
Dilución en agua, hidrólisis ácida con HClO <sub>4</sub> , precipitación proteínas	NovaPak C <sub>18</sub>	Acido hexanosulfónico/Acetonitrilo/Hidróxido amónico a pH 3,6	UV 254 nm	Alimentos infantiles	Chase <i>et al.</i> , (1992)
Dilución en agua, hidrólisis enzimática, oxidación	Nucleosil-phenyl, 7 μm (T) Nucleosil-100 C <sub>18</sub> , 5 μm(R)	Metanol/Acetonitrilo/Butanol/Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,2% a pH 5,5 (80:10:5:5)	FL T 375:430 nm FL R 455:525 nm	Leche	Gauch <i>et al.</i> , (1992)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 15 min a 125 °C, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas, oxidación, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub> -Radial - Pak	Metanol/Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 7,0 (35:65)	FL T 360:425 nm FL R 440:520 nm	Alimentos	Hägg & Kumpulainen (1993)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N en autoclave 30 min a 121 °C, oxidación, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Tampón de acetato amónico 5 mM a pH 5,0/Metanol (72:28)	FL T 370:435 nm FL R 370:520 nm	Alimentos	Sims & Shoemaker (1993)

TABLA 19. Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINA B<sub>1</sub> (T) y VITAMINA B<sub>2</sub> (R)

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con HCl 0,01 M en autoclave 30 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, purificación en Nucleosil C <sub>18</sub>	Nucleosil C <sub>18</sub> , 3 μm	Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 3,0/Acetonitrilo conteniendo heptanosulfonato sódico 5 mM	UV 254 nm	Carnes, hígado	Barna & Dworschak (1994)

#### 4.A.3. Niacina

El conocimiento de que muchas bacterias necesitaban niacina para su crecimiento, originó el desarrollo de **métodos microbiológicos** para analizar niacina, compuestos relacionados y otros con actividad niacínica (Snell & Wright, 1941; Johnson, 1945; Williams, 1946). Estos procedimientos son todavía hoy muy empleados por ser sensibles y más específicos que los químicos, con el inconveniente de ser poco precisos y largos. Se utilizan para el ensayo varios microorganismos; *Leuconostoc mesenteroides* con especificidad para diferenciar niacina, no siendo adecuado para la medida de nicotinamida; *Lactobacillus casei* aplicado a la determinación de ácido nicotínico; siendo *Lactobacillus plantarum* el más usado comúnmente.

Los **métodos químicos** son menos sensibles que los microbiológicos y menos específicos pues se ven influidos por compuestos naturales biológicamente inactivos producidos durante la extracción. De ahí la necesidad de emplear procedimientos complejos de extracción, purificación y determinación de blancos. El método se basa en la reacción que produce la niacina con el bromuro de cianógeno para dar un compuesto de piridinio, que por reajustes da lugar a derivados que se acoplan con aminas aromáticas para producir compuestos coloreados (Reacción de König). Sin embargo, presenta varias desventajas, así la niacina y nicotinamida no se diferencian entre sí debido a la hidrólisis de nicotinamida previa a la derivatización y además los reactivos usados son nocivos e inestables.

Más recientemente, se han descrito **métodos basados en HPLC** para la determinación del ácido nicotínico y su amida la nicotinamida. Dependiendo de la forma de la vitamina que se vaya a determinar y del tipo de alimento, distintos autores han adoptado diferentes métodos de extracción (tablas 20-22).

Uno de los primeros en analizar ácido nicotínico por HPLC fue Toma & Tabekhia (1979) en arroz y derivados de éste, por medio de hidrólisis ácida y enzimática, lo mismo que Skurray (1981) y más recientemente Vidal-Valverde y Reche (1991) que introdujeron una etapa para la purificación del extracto final.

Kitada *et al.*, (1982); Yoshida *et al.*, (1982); Trugo *et al.*, (1985); Takatsuki *et al.*, (1987); Hamano *et al.*, (1988) y Gigliotti & Daghetta, (1993) emplearon la extracción

acuosa simple para estimar ácido nicotínico y nicotinamida en carnes, pescados y café. Trugo *et al.*, (1985) purificaron el extracto acuoso del café con un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub>, sistema también utilizado por Tyler & Genzale (1990). Balschukat & Kress (1990) y Fontaine & Hörr (1993) usaron extracción ácida simple en compuestos alimenticios. Fujita *et al.*, (1983) eligieron la extracción alcalina para el ácido nicotínico en carnes; Tyler & Genzale (1990) en carnes y queso. Sakai *et al.*, (1985) usaron una solución acuosa de metanol y ácido acético para diversos alimentos.

La cromatografía en fase inversa de pares iónicos ha sido la más empleada, con diferentes fases móviles y contraiones (Toma & Tabekhia, 1979; Skurray, 1981; Kitada *et al.*, 1982; Yoshida *et al.*, 1982; Trugo *et al.*, 1985; Takatsuki *et al.*, 1987; Tyler & Genzale, 1990; Vidal-Valverde y Reche, 1991; Gigliotti & Daghetta, 1993). Predomina la detección por UV puesto que tanto el ácido nicotínico como la nicotinamida tienen fuerte absorción en esa zona.

TABLA 20. Condiciones de HPLC para la determinación de NIACINA

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N en autoclave 30 min, hidrólisis enzimática, dilución, filtración 0,45 µm	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Acido acético/Agua conteniendo ácido pentanosulfónico y heptanosulfónico	UV 254 nm	Arroz	Acido Nicotínico	Toma & Tabekhia (1979)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 M, hidrólisis enzimática, filtración 0,25 µm	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	Tampón de acetato 0,2 M conteniendo ácido heptano sulfónico 5 mM	UV 250 nm	Alimentos	Acido Nicotínico	Skurray (1981)
Extracción acuosa	Lichrosorb RP-8	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 2,6 conteniendo iones de tetrabutilamonio	UV 260 nm	Carnes y pescado	Acido Nicotínico y Nicotinamida	Kitada <i>et al.</i> , (1982)
Extracción acuosa a temperatura ambiente	ODS RP	Metanol/Acetato sódico conteniendo iones de tetrabutilamonio	UV 254 nm	Carnes y pescado	Acido Nicotínico	Yoshida <i>et al.</i> , (1982)
Hidrólisis con KOH 2 N, extracción acuosa	Zipax SCX	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 2,6	UV 254 nm	Carnes	Acido Nicotínico	Fujita <i>et al.</i> , (1983)
Extracción con metanol/agua/ácido acético (2:2:1)	Finepak Sil C <sub>18</sub>	Metanol/Agua conteniendo ácido hexanosulfónico (4:1)	UV 254 nm	Alimentos	Nicotinamida	Sakai <i>et al.</i> , (1985)
Extracción acuosa a 80 °C, dilución, filtración 0,45 µm, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	Spherisorb ODS-2	Metanol/Tampón a pH 7,0 conteniendo iones de tetrabutilamonio 5 mM	UV 254 nm	Café	Acido Nicotínico	Trugo <i>et al.</i> , (1985)

TABLA 21. Condiciones de HPLC para la determinación de NIACINA

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción acuosa, precipitación proteínas	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Agua a pH 7,5 conteniendo iones de tetrabutilamonio 5 mM (1:9)	UV 263 nm	Carnes	Acido Nicotínico	Takatsuki <i>et al.</i> , (1987)
Extracción acuosa, dilución, centrifugación, filtración, precipitación proteínas, dilución, filtración 0,45 $\mu$ m e inyección	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	Agua a pH 3,5 conteniendo ácido heptanosulfónico 10 mM	UV 263 nm	Carnes	Nicotinamida	Takatsuki <i>et al.</i> , (1987)
Extracción acuosa a 100 °C, enfriamiento, dilución	Partisil SCX, 10 $\mu$ m	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM a pH 3,0	UV 260 nm	Carnes	Acido Nicotínico y Nicotinamida	Hamano <i>et al.</i> , (1988)
Homogeneización con HCl 0,2 M, centrifugación, filtración 0,5 $\mu$ m	RP-18, 5 $\mu$ m	Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 4,8	UV 264 nm	Alimentos	Nicotinamida	Balschukat & Kress (1990)
Extracción acuosa en medio de Ca(OH) <sub>2</sub> en autoclave 15 min a 121 °C, precipitación proteínas con ácido oxálico, filtración, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	LX-18-DB, 5 $\mu$ m	Acetonitrilo/Agua conteniendo dodecilsulfato sódico (40:60)	UV 254 nm	Carnes y queso	Acido Nicotínico	Tyler & Genzale (1990)
Hidrólisis ácida con HCl 0,1 N y HCl 6N en autoclave 15 min a 121 °C, hidrólisis enzimática, dilución, filtración, purificación con resina ácida Dowex 1-X8 e inyección	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> , 10 $\mu$ m	Metanol/Tampón de acetato sódico 0,01 M a pH 4,66 conteniendo iones de tetrabutilamonio 5 mM	UV 254 nm	Legumbres y carnes	Acido Nicotínico	Vidal-Valverde y Reche (1991)

TABLA 22. Condiciones de HPLC para la determinación de NIACINA

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Homogeneización con ácido oxálico 1%, centrifugación, filtración, purificación con resina de intercambio catiónico	Nucleosil 100-5 SA, 5 $\mu$ m	Tampón de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M a pH 2,5	UV 264 nm	Alimentos	Acido Nicotínico y Nicotinamida	Fontaine & Hörr (1993)
Extracción de grasa con n-hexano, decantación, extracción acuosa 50-60 °C, precipitación proteínas, dilución, filtración e inyección	Lichrospher 60, 5 $\mu$ m	Acetonitrilo/Tampón a pH 2,2 conteniendo hexano sulfonato sódico 3 g/l (5:95)	UV 260 nm	Carnes frescas	Acido Nicotínico	Gigliotti & Daghetta (1993)

#### 4.A.4. Vitamina B<sub>6</sub>

La determinación de vitamina B<sub>6</sub> en alimentos y en otros materiales biológicos es un problema analítico difícil debido a la existencia en matrices complejas de seis vitámeros activos nutricionalmente. Los métodos clásicos para el análisis de vitamina B<sub>6</sub> se basan en el control del **crecimiento microbiológico**. *Saccharomyces uvarum* (formalmente conocida como *Saccharomyces carlsbergensis*) y *Kloeckera brevis* (formalmente *Kloeckera apiculata*) son los microorganismos más usados en la determinación de la vitamina B<sub>6</sub> porque responden a PL, PM y PN, mientras que otros exhiben un rango de respuesta más amplio. Un importante inconveniente de estos métodos es la diferente respuesta de la levadura a las distintas formas de la vitamina B<sub>6</sub> (Gregory, 1988). En consecuencia se han desarrollado otras propuestas alternativas para hacer posible la cuantificación de la vitamina.

Los compuestos que integran la vitamina B<sub>6</sub> tienen fluorescencia nativa, variando la intensidad de ésta y la longitud de onda de excitación y de emisión con el pH. El **análisis fluorimétrico** directo de extractos de alimentos y de materiales biológicos es inefectivo para la detección de la vitamina B<sub>6</sub> debido a la variación espectral de las formas de ésta y a la presencia de muchos compuestos interferentes. Se han usado la cromatografía preparativa en columna abierta y la conversión química a derivados fluorescentes para facilitar la cuantificación fluorimétrica. La complejidad de estos métodos, limita su utilidad.

El análisis cuantitativo de vitamina B<sub>6</sub> por **HPLC** se ha utilizado ampliamente, por tratarse de una técnica de alta resolución y sensibilidad que no requiere una exhaustiva purificación ni una compleja derivatización de la muestra, permitiendo determinar todas las formas de la vitamina.

Los métodos revisados en las referencias se exponen en las tablas (23-25), y son aplicables a muchos alimentos (cereales, leche y derivados lácteos, tejidos animales, carnes y pescados) determinando el grupo de vitámeros (PL, PM y PN) y en algunos casos sus fosfatos (PLP, PMP y PNP). Los procedimientos de extracción para estas vitaminas difieren entre autores; así para prevenir la destrucción de los ésteres fosfato de la vitamina B<sub>6</sub> se han empleado diferentes agentes extractantes, entre ellos ácido tricloroacético (Macrae *et al.*, 1984; Schoonhoven *et al.*, 1994), ácido sulfosalicílico

(Vanderslice *et al.*, 1980; Gregory & Sartain, 1991), ácido metafosfórico (Ang *et al.*, 1988) o por simple dilución en agua (Lim *et al.*, 1980). Para la destrucción de las formas fosforiladas, Bognar (1985, 1993) utilizó extracción en autoclave con ácido sulfúrico, otros autores han empleado tratamientos enzimáticos más suaves que las hidrólisis con ácido sulfúrico (Reitzer-Bergaentzle *et al.*, 1993). Se han usado muchos modos cromatográficos, procedimientos por intercambio iónico (Williams & Cole, 1975; Yasumoto *et al.*, 1975; Wong, 1978; Coburn & Mahuren, 1983; Vanderslice *et al.*, 1979, 1980); cromatografía en fase inversa (Lim *et al.*, 1980; Gregory *et al.*, 1981; Macrae *et al.*, 1984; Bognar 1985,1993; Ang *et al.*, 1988); cromatografía en fase inversa de pares iónicos (Bitsch & Möller, 1989; Gregory & Sartain, 1991; Reitzer-Bergaentzle *et al.*, 1993; Schoonhoven *et al.*, 1994).

Vanderslice *et al.*, (1984) presentaron las ventajas e inconvenientes de la cromatografía por intercambio iónico y la cromatografía en fase inversa. En concreto, el método por intercambio iónico emplea resinas estables con una larga vida media (5-6 años), la elución es isocrática y por lo tanto no se requiere la regeneración de la columna después de cada inyección. La desventaja es que el tiempo de elución necesario, es relativamente largo (60 min). La cromatografía en fase inversa es más eficiente y las separaciones se alcanzan en la mitad del tiempo que se necesita para el intercambio iónico. En este caso la vida media de las columnas es bastante inferior (6 meses-1 año). Para esta vitamina las fases móviles utilizadas son muy diferentes (tablas 23-25); en cuanto al sistema de detección predomina la fluorescencia, aunque Lim *et al.*, (1980) han empleado la detección por ultravioleta en productos lácteos.

TABLA 23. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>6</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Dilución en agua, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	Spherisorb ODS, 10 µm	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,033 M a pH 2,2/Acetonitrilo (99:1)	UV 280 nm	Productos lácteos	PL, PM y PN	Lim <i>et al.</i> , (1980)
Extracción con KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M a pH 7,0, precipitación con HClO <sub>4</sub> , centrifugación, neutralización, adición de glioxilato sódico (conversión de PMP y PM a PLP y PL)  Derivatización: con semicarbazida, filtración 0,45 µm	Ultrasphere IP, 5 µm	Tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,033 M a pH 2,2/Acetonitrilo (97,5:2,5)	FL 380:446 nm	Productos lácteos y tejidos animales	PL, PLP, PM y PMP como PL y PLP	Gregory <i>et al.</i> , (1981)
Extracción con TCA 40%, filtración 0,45 µm	Spherisorb ODS-2	Citrato tripotásico 0,01 M a pH 2,5/Metanol (50:50)	FL 290:390 nm	Alimentos	PL, PM y PN	Macrae <i>et al.</i> , (1984)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 N en autoclave, 30 min a 120 °C, filtración 0,45 µm	Spherisorb ODS, 10 µm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,08 N lavando con Metanol/Agua (95:5) después de cada análisis	FL 290:395 nm	Alimentos	PL, PM y PN	Bognar (1985)
Extracción con HPO <sub>3</sub> , centrifugación, filtración 0,45 µm	BioSil ODS-5S C <sub>18</sub>	Tampón de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,066 M a pH 3,0/Acetonitrilo (90:10)	FL 290:395 nm	Carnes	PM, PL, PMP y PLP	Ang <i>et al.</i> , (1988)

TABLA 24. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>6</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción con HClO <sub>4</sub> (0,1-0,5 M) y hielo, centrifugación, neutralización, filtración 0,45 µm	Lichrospher RP-18, 5 µm	Metanol/Tampón de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,03 M a pH 2,7 conteniendo ácido octanosulfónico 4 mM (10:90)	FL 330:400 nm	Alimentos	PL, PM, PN, PLP y PMP	Bitsch & Möller (1989)
Extracción con SSA 5% y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , centrifugación, purificación	Ultrasphere C <sub>18</sub> , 5 µm	(1) Tampón de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,033 M a pH 2,2 conteniendo ácido octanosulfónico 8 mM (2) Tampón de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,033 M a pH 2,2 e isopropanol 17%  Gradiente: 17% (1) a 31% (2)	FL 295:405 nm	Alimentos	PL, PM, PN, PLP, PMP y PNP	Gregory & Sartain (1991)
Hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M en autoclave 30 min a 121 °C, dilución, filtración 0,45 µm	Nucleosil 120 RP-18, 5 µm	Acido sulfúrico 0,04 M	FL 333:375 nm	Carnes	PL, PM y PN	Bognar (1993)
Extracción con HClO <sub>4</sub> 70%, ajuste de pH a 3,2, dilución, precipitación proteínas, filtración 0,45 µm	Nova Pak C <sub>18</sub>	Acetonitrilo/Tampón de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 3,6 conteniendo ácido hexanosulfónico (1:99)	FL 360:435 nm	Alimentos	PN	Chase <i>et al.</i> , (1993)

TABLA 25. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA B<sub>6</sub>

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Hidrólisis enzimática, dilución, filtración 0,2 µm	Lichrospher 60 RP, 5 µm	Acetonitrilo/Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M a pH 2,5 conteniendo heptanosulfonato sódico 0,5 mM (4:96)	FL 290:395 nm	Alimentos	PN	Reitzer-Bergaentzle <i>et al.</i> , (1993)
Extracción con TCA 5%, dilución, centrifugación, hidrólisis enzimática, precipitación proteínas, centrifugación, filtración 0,45 µm	Hypersil ODS	Metanol/Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M a pH 2,15 conteniendo ácido octanosulfónico (3:97)	FL 333:375 nm	Alimentos	PL y PM	Schoonhoven <i>et al.</i> , (1994)

#### 4.A.5. Vitamina C

En 1922, Sherman, LaMer y Campbell, describieron un método de bioanálisis, basado en determinar la cantidad mínima de producto necesaria para proteger un cobaya del escorbuto. Desde entonces, se han desarrollado gran cantidad de métodos químicos y biológicos para determinar la actividad de la vitamina C o el contenido de ácido L-ascórbico (AA).

Los **bioanálisis** son largos, costosos y poco precisos. Presentan la ventaja de medir globalmente todos los compuestos que poseen actividad de vitamina C, excluyendo los que carecen de ella. Actualmente los bioanálisis que tienen mayor grado de especificidad son los basados en el estudio de los cambios histológicos de la estructura dentaria (Reid, 1947).

Los **métodos microbiológicos** son más rápidos. Meyer *et al.*, (1965) presentaron un ensayo microbiológico cualitativo usando *Myrothecium verrucacia* para la estimación de ácido L-ascórbico y ácido eritórbico (EA).

Los **métodos químicos** están basados en el poder reductor del ácido L-ascórbico, son más rápidos, más reproducibles y menos específicos que los bioanálisis y los métodos microbiológicos, debido a la compleja relación biológica entre los compuestos que poseen actividad de vitamina C, así como a la semejanza química de estas moléculas con otras que son inactivas. Pueden dividirse en dos grupos: la determinación de la forma reducida del ácido L-ascórbico y la de la vitamina C “total”, representada por el ácido L-ascórbico, el ácido dehidroascórbico (DHAA) y el ácido 2,3-dicetogulónico (2,3-DCG).

El primer grupo de análisis se basa en las propiedades de oxidación-reducción del AA (Bessey & King, 1933; Harris *et al.*, 1942) o en su capacidad de asociación con derivados diazotizados de la anilina para formar hidrazidas coloreadas (Schmall *et al.*, 1953). La capacidad reductora del extracto, se mide por tratamiento con un agente oxidante adecuado; el que mejores resultados ha dado es el 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DCFI) introducido por Tillmans (1927), otros también utilizados son el yodo, el azul de metileno, entre otros. Otra reacción para determinar AA, es la que tiene lugar con compuestos de diazonio. Mientras que los compuestos

diazónicos del benceno reaccionan para dar productos incoloros o de color amarillo pálido, los nitroderivados forman compuestos de intenso color azul en solución alcalina (Schmall *et al.*, 1953). Esta reacción se ha aplicado para determinar AA en productos farmacéuticos y en piensos. El método más usado para determinar vitamina C “total”, se basa en la reacción del 2,3-DCG con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH), para formar una osazona (Roe *et al.*, 1948) que por tratamiento con ácido sulfúrico se convierte en un pigmento soluble de color rojo, medido a 540 nm por los métodos de Roe *et al.*, (1948).

Los **métodos electroquímicos** para la determinación de AA son más simples que los métodos químicos. Entre ellos destaca el uso de la polarografía (Lindquist & Ferroha., 1975) por ser un método muy específico, que requiere una pequeña cantidad de muestra y una mínima preparación.

Las **separaciones cromatográficas por HPLC** desarrolladas en los últimos años han sido muy numerosas (tablas 26-30), debido a la alta sensibilidad y selectividad de esta técnica. Se observa un especial interés en la determinación de AA y DHAA para estimar la actividad fisiológica de la vitamina C “total” y en la separación de AA de otros compuestos 2,3-DCG y EA. La extracción se realiza con varios agentes ( $\text{HPO}_3$ , TCA, EDTA, EDTA y ácido cítrico, agua, tampón de fosfato), generalmente seguida de dilución e inyección de la muestra.

Se han presentado diversas técnicas especiales de preparación de la muestra y de extracción como la reducción de DHAA (Dennison *et al.*, 1981 y Sawamura *et al.*, 1990), la utilización de  $\text{HPO}_3$ /etanol (Moledina & Flink, 1982 y Sawamura *et al.*, 1990), la oxidación enzimática y derivatización con o-fenilendiamina (OFDA) (Speek *et al.*, 1984 y Vanderslice & Higgs, 1988), la oxidación de AA y derivatización con 2,4-DNFH (Kodaka *et al.*, 1985), el empleo de tiourea/acetonitrilo (Morawski, 1984), el uso de  $\text{HClO}_4$  (Barja de Quiroga *et al.*, 1991).

Los modos cromatográficos que se han usado son: cromatografía de adsorción en fase normal (Kodaka *et al.*, 1985); cromatografía por intercambio iónico (Carr *et al.*, 1983; Rizzolo *et al.*, 1984); cromatografía de partición sobre fases enlazadas de grupos amino (Dennison *et al.*, 1981); cromatografía en fase inversa (Buslig *et al.*,

1982; Speek *et al.*, 1984; Sawamura *et al.*, 1990; Iwase & Ono, 1993); cromatografía en fase inversa de pares iónicos (Sood *et al.*, 1976; Coustard & Sudraud, 1981; Finley & Duang, 1981; Hedlund, 1982; Moledina & Flink, 1982; Parolari, 1982; Tsao & Salimi, 1982; Kutnink & Omaye, 1987; Schüep & Keck, 1990; Barja de Quiroga *et al.*, 1991; Vanderslice & Higgs, 1988). La detección por UV ha sido la más utilizada, excepto para la detección electroquímica adoptada por Tsao & Salimi (1982), Carr *et al.*, (1983), Kutnink & Omaye, (1987), Iwase & Ono, (1993) y la determinación por fluorescencia después de derivatización empleada por Speek *et al.*, (1984), Vanderslice & Higgs (1988 y 1990).

TABLA 26. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Dilución en tampón fosfato a pH 5,0 (Preparados farmacéuticos) o Extracción con HPO <sub>3</sub> 6%, dilución (Alimentos)	μ-Bondapak C <sub>18</sub> , 10 μm	Metanol/Solución amónica 2mM a pH 5,0 conteniendo ácido fórmico 1% o hidróxido sódico (50:50)	UV 254 nm	Alimentos y preparados vitamínicos	AA	Sood <i>et al.</i> , (1976)
Dilución con HPO <sub>3</sub> 2%, filtración 0,45 μm	Lichrosorb RP-8 o RP-18	Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M conteniendo bromuro cetiltrimetilamonio 5 mM/Metanol (90:10)	UV 264 nm	Zumos y jamón	AA, EA	Coustard & Sudraud (1981)
Dilución en agua, ensayo inmediato (AA)  Adición de DL-homocisteína 0,8 %, ajuste a pH 7,0 con tampón de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , filtración 0,45 μm (AA total)	μ-Bondapak NH <sub>2</sub>	Metanol/Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,25 % a pH 3,5 (50:50)	UV 244 nm	Bebidas	AA y AA Total	Dennison <i>et al.</i> , (1981)
Extracción con HPO <sub>3</sub> , purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Tampón de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> conteniendo iones de tetrabutilamonio	UV 210 y 254 nm	Frutas, zumos y vegetales	AA, DHAA y DCG	Finley & Duang (1981)
Dilución en agua	RCM-100 C <sub>18</sub> , 10 μm	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2% a pH 2,4	UV 254 nm	Zumos	AA y DHAA	Buslig <i>et al.</i> , (1982)

TABLA 27. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción con $\text{HPO}_3$ 8%	Columna fase reversa	Agua/Metanol conteniendo iones de tetrahidroxiamonio	UV 254 nm	Zumos, bebidas y alimentos	AA	Hedlund (1982)
Extracción con $\text{HPO}_3$ 6% y etanol (10:90), filtración, centrifugación, purificación en Sep-Pak $\text{C}_{18}$	Spherisorb ODS, 10 $\mu\text{m}$	Tampón fosfato conteniendo pares iónicos/Metanol (50:50)	UV 254 nm	Frutas y vegetales	AA	Moledina & Flink (1982)
Extracción con $\text{HPO}_3$ 6%, centrifugación, filtración 0,45 $\mu\text{m}$	$\mu$ -Bondapak $\text{C}_{18}$	Metanol/Tampón de cloruro de trioctilmetilamonio 3mM a pH 5,05	UV 255 nm	Carnes	AA	Parolari (1982)
Extracción con $\text{HClO}_4$ 0,05 M, centrifugación	Ultrasphere ODS 5 $\mu\text{m}$	Metanol conteniendo 40 mM de acetato/Agua (15:85)	Detección electroquímica 0,7 V vs. Ag/AgCl	Zumos, leche y alimentos	AA y EA	Tsao & Salimi (1982)
Extracción con $\text{HClO}_4$ 250 mM y TCA 5%, centrifugación	Partisil 10 SAX	Tampón de acetato sódico 60 mM a pH 4,6	Detección electroquímica 0,75 V vs. Ag/AgCl	Tejidos animales	AA	Carr <i>et al.</i> , (1983)
Extracción con tiourca 10 mM en acetonitrilo	Radial-Pak, $\mu$ -Bondapak $\text{NH}_2$	Metanol/ Solución de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,01 M (80:20)	UV 254 nm	Leche	AA	Morawski (1984)

TABLA 28. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción con HPO <sub>3</sub> 6%, centrifugación, filtración, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	Partisil 10 SAX	Tampón de acetato sódico 0,1 M a pH 4,25	UV 250 nm	Frutas y vegetales	AA	Rizzolo <i>et al.</i> , (1984)
Extracción con TCA 0,3 M, filtración, dilución, adición de tampón de acetato sódico 4,5 M a pH 6,2, incubación con ascorbato oxidasa, adición de OFDA 0,1%, reacción 30 min a 37 °C (AA Total y EA)	Hypersil ODS, 3 μm	Metanol/Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,08 M a pH 7,8 (20:80)	FL 365:418 nm	Alimentos y bebidas	AA, AA Total, EA, DHAA y DHEA	Speck <i>et al.</i> , (1984)
Las etapas anteriores sin oxidación enzimática (DHAA y DHEA)						
Oxidación de AA, derivatización con DNFH	Nucleosil Si, 3 μm	n-Hexano/Acetato de etilo/Acido acético/2-Propanol (40:30:10:20)	UV 495 nm	Alimentos	AA Total	Kodaka <i>et al.</i> , (1985)
Extracción con ácido cítrico 3%, purificación en Sep-Pak C <sub>18</sub>	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	Acetonitrilo/Agua conteniendo NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M a pH 4,3 (70:30)	UV 254 nm (AA) UV 214 nm (DHAA)	Frutas y vegetales	AA y DHAA	Wimalasiri & Wills (1985)
Extracción con HPO <sub>3</sub> 5% y EDTA, centrifugación, dilución, filtración 0,2 μm	Altex Ultrasphere ODS C <sub>18</sub> , 5 μm	Acetato de sodio 0,04 M, fosfato de tetrabutilamonio 5 mM, EDTA disódico 0,2 mg/ml a pH 5,25	Detección electroquímica 0,6 V vs. Ag/AgCl	Carnes curadas	AA, EA y A.Urico	Kutnink & Omaye, (1987)

TABLA 29. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción con ácido cítrico 0,1 M, EDTA 5mM y n-hexano, centrifugación, filtración 0,45 $\mu$ m (AA e IAA)	Ultrasphere ODS C <sub>18</sub> (3 columnas en serie)	Tampón de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M a pH 5,0 conteniendo EDTA 5 mM e iones de tetrabutilamonio 5mM	FL 350:430 nm	Alimentos	AA, IAA, DHAA y DHIA	Vanderslice & Higgs (1988)
Oxidación de AA e IAA a DHAA y DHIA, condensación con OFDA (DHAA y DHIA)						
Extracción con HPO <sub>3</sub> 80 g/l y etanol (35:65), centrifugación, adición de NaSH 12 g/l, filtración 0,45 $\mu$ m	Cosmosil 5 C <sub>18</sub>	Acido HPO <sub>3</sub> 2 g/l	UV 243 nm	Zumos	AA y AA Total	Sawamura <i>et al.</i> , (1990)
Extracción con HPO <sub>3</sub> 0,5%, centrifugación, dilución, filtración 0,45 $\mu$ m	Hypersil ODS, 5 $\mu$ m	Agua/Metanol/Tampón acetato conteniendo 1,5-dimetilhexilamina (94,5:4:1,5)	UV 254 nm	Carnes procesadas	AA y EA	Schüep & Keck, (1990)
Extracción con HPO <sub>3</sub> 3%, ácido acético glacial 1,5 mM y n-hexano, centrifugación, filtración 0,45 $\mu$ m (AA e IAA)	PLRP-S, 5 $\mu$ m (2 columnas en serie)	Tampón de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M a pH 2,14	FL 350:430 nm	Alimentos y tejidos animales	AA, IAA, DHAA y DHIA	Vanderslice & Higgs (1990)
Oxidación con HgCl <sub>2</sub> , condensación con OFDA (DHAA y DHIA)						

TABLA 30. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA C

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Extracción con HClO <sub>4</sub> 50 mM, centrifugación, filtración 0,5 µm	Nucleosil C <sub>18</sub> , 7 µm	Acetonitrilo/Tampón de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,3 mM conteniendo bromuro de miristiltrimetilamonio 1,07 mM a pH 5,5	UV 280 nm	Tejidos animales	AA y A.Urico	Barja de Quiroga <i>et al.</i> , (1991)
Dilución en agua, filtración 0,45 µm  Adición de α-metil-L-dopa 125 µg/ml y HPO <sub>3</sub> 2% (AA)  Adición de α-metil-L-dopa 125 µg/ml y L-cisteína 2,5 mg/ml en tampón de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM a pH 6,8 (DHAA)	Inertsil ODS-2, 5 µm	Tampón de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M a pH 3 y EDTA.2Na 1mM	Detección electroquímica 0,3 V vs. Ag/AgCl	Zumos	AA y DHAA	Iwase & Ono, (1993)

## 4.B. VITAMINAS LIPOSOLUBLES

### 4.B.1. Vitamina A

Se han utilizado muchos métodos analíticos en la determinación de la vitamina A, siendo los más empleados de naturaleza físico-química.

Los **métodos colorimétricos** son los primeros que se han aplicado en el análisis de las vitaminas liposolubles. La vitamina A por su estructura reacciona con ácidos de Lewis (tricloruro de antimonio, ácido trifluoroacético y ácido tricloroacético) dando un intenso color azul cuya absorbancia máxima está en el rango 616-620 nm. El tricloruro de antimonio en cloroformo se conoce como reactivo de Carr-Price, introducido en 1926. Esta reacción presenta varios inconvenientes. El color es extremadamente transitorio y las absorbancias deben ser leídas dentro de 5-10 s de la adición del reactivo, evitando la presencia de trazas de agua. El ácido trifluoroacético (Dugan *et al.*, 1964; Olson, 1965; Roels & Mahadevan, 1967; Hashmi, 1973) y el ácido tricloroacético (Grys, 1975, 1980; Kamangar & Fawzi, 1978; Bayfield & Cole, 1980) reaccionan con la vitamina A en una forma similar al tricloruro de antimonio. Sin embargo, los colores producidos por TFA y TCA son menos susceptibles a interferencias por trazas de agua. La reacción de Carr-Price se emplea en los métodos de la AOAC para el ensayo de vitamina A en alimentos (AOAC, 1990 ref. 974.29).

Se han aplicado también **ensayos espectrofotométricos** en la región ultravioleta para la determinación de esta vitamina en el análisis de alimentos siendo uno de los inconvenientes en estos ensayos las interferencias espectrales. Si hay sustancias presentes en la muestra que absorben entre 300 nm y 350 nm, se obtienen contenidos falsos de vitamina A. Este problema se resuelve aplicando la ecuación de Morton y Stubbs, que mide la absorbancia a 325 nm ( $\lambda$  máx), a 310 nm y a 334 nm. La espectrofotometría se usa en los métodos AOAC para el ensayo de vitamina A en margarina, después de la purificación de la fracción insaponificable sobre una columna de alúmina (AOAC, 1990 ref. 960.45).

Una modificación del método espectrofotométrico para estimar la vitamina A se basa en la conversión del retinol a su forma anhidro usando ácido p-toluensulfónico en benceno como agente deshidratante (Budowski & Bondi, 1957).

El retinol y sus ésteres presentan fuerte fluorescencia para una longitud de onda de excitación en el intervalo 330-360 nm (máximo 325-330 nm) y una longitud de onda de emisión en el rango 470-490 (máximo 480 nm). Se han desarrollado **métodos fluorimétricos** basándose en esta propiedad, los cuáles son muy sensibles para la determinación de la vitamina A con un límite de detección de 0,01 ppm (Senyk *et al.*, 1975). Son muy específicos, puesto que compuestos como esteroides, vitamina D y bajas concentraciones de carotenoides, que interfieren en los ensayos colorimétricos y espectrofotométricos, no afectan la determinación fluorimétrica de la vitamina A (Christie & Wiggins, 1978). Sin embargo, los diferentes isómeros de esta vitamina no exhiben el mismo grado de fluorescencia (Lawn *et al.*, 1983).

Los **métodos HPLC** usados en el análisis de la vitamina A han sido fundamentalmente cromatografía de adsorción y cromatografía de partición. Permiten la separación de las vitaminas y de sus vitámeros y quedan detallados en la tabla 31.

La cromatografía de adsorción se realiza en fase normal permitiéndole la separación de los isómeros *cis/trans* (Scotter *et al.*, 1992; Rettenmaier & Schüep, 1992; Leth & Jacobsen, 1993; Brinkmann *et al.*, 1994, 1995). Utiliza variados rellenos de sílice (Lichrosorb Si 60, Apex Silica, Spherisorb SW) que difieren entre sí en la estructura porosa. La fase móvil emplea disolventes no polares (hexano principalmente) conteniendo un porcentaje inferior al 5% (v/v) de un disolvente más polar (éter dietílico, cloroformo, etanol, isopropanol, 1-octanol). Es posible la inyección directa de la muestra en la columna de sílice puesto que se disuelve en un disolvente no polar (hexano o heptano) el cuál es compatible con la fase móvil, predominantemente (hexano o heptano). La cromatografía de adsorción es apropiada para la detección por fluorescencia, puesto que los eluyentes no polares presentan más sensibilidad que las fases móviles polares.

La cromatografía de partición operando en fase inversa con fases móviles semi-acuosas también se ha empleado para determinar vitamina A en varios alimentos, leche y derivados, cereales, comidas de animales, alimentos infantiles e hígado. Este tipo de cromatografía permite separar un pico de retinol simple (Reuvers *et al.*, 1982; Pikkarainen & Parviainen, 1992) o la separación de los isómeros *cis/trans* (Lawn *et al.*, 1983). El grupo funcional más empleado como fase estacionaria es un hidrocarburo octadecil (C<sub>18</sub>). La fase móvil es un disolvente más polar que la fase

estacionaria, generalmente metanol o acetonitrilo, algunas veces acompañado de agua. En la mayoría de estos métodos en fase inversa, la solución que contiene la materia insaponificable se evapora a sequedad y el residuo se redisuelve en un disolvente compatible con la fase móvil. La detección se ha realizado por medidas en la zona ultravioleta.

TABLA 31. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA A

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Saponificación, extracción con 1,2-dicloroetano, evaporación	Spherisorb ODS	Metanol/Agua (97:3)	UV 325 nm	Alimentos	Total retinol	Lawn <i>et al.</i> , (1983)
Saponificación, extracción con éter de petróleo, evaporación	Sin especificar ODS	Metanol/Agua (97:3)	UV 325 nm	Alimentos	Total retinol	Analytical Methods Committee (1985)
Extracción con n-hexano, evaporación	ChromSep Nucleosil C <sub>18</sub> , 5 µm	Metanol	UV 295 nm	Hígado y derivados	Acetato y palmitato de retinol	Pikkarainen & Parviainen (1992)
Saponificación, extracción con éter dietílico, evaporación	Apex silica, 5 µm	n-Hexano conteniendo isopropanol 1%	FL 328-473 nm	Hígado	Todo- <i>trans</i> -retinol y 13- <i>cis</i> -retinol	Scotter <i>et al.</i> , (1992)
Saponificación, extracción con éter dietílico, evaporación	Lichrosorb Si 60, 5 µm	n-Heptano/Isopropanol Gradiente: 0,5% isopropanol a 8,5%	UV 325 nm	Hígado	Todo- <i>trans</i> -retinol y 13- <i>cis</i> -retinol	Leth & Jacobsen (1993)
Saponificación, extracción, evaporación	Spherisorb SW, 3 µm	Isooctano/Isopropanol (98,75:1,25)	UV 324 y 329 nm	Hígado	Todo- <i>trans</i> -retinol y 13- <i>cis</i> -retinol	Brinkmann <i>et al.</i> , (1994)
Saponificación, extracción, evaporación	Spherisorb SW, 3 µm	n-Hexano conteniendo 1-octanol 0,3%	UV 325 nm	Alimentos	Todo- <i>trans</i> -retinol y 13- <i>cis</i> -retinol	Brinkmann <i>et al.</i> , (1995)

#### 4.B.2. Vitamina E

El **método colorimétrico de Emmerie-Engel** ha sido muy utilizado para estimar vitamina E en aceites y en alimentos desde su introducción en 1939. El reactivo empleado es una mezcla de cloruro férrico y 2,2'-bipiridilo en solución etanólica. Los tocoferoles y tocotrienoles reducen el hierro al estado ferroso, que se combina con el bipiridilo para formar un complejo de color rojo, cuya concentración se determina por espectrofotometría a 520 nm. El método presenta un alto grado de exactitud y precisión con tocoferoles puros, pero no es específico. Frecuentemente se realiza sobre extractos de vitamina E purificados por cromatografía en capa fina (Bunnell, 1967; Brubacher, 1968; Zandi & McKay, 1976).

Se han usado **métodos voltamétricos** para determinar tocoferoles en grasas, aceites y alimentos después de la saponificación (Atuma & Lindquist, 1973; Atuma, 1975) y en aceites vegetales insaponificados (McBride & Evans, 1973; Walting *et al.*, 1977; Deldime *et al.*, 1978).

Se ha propuesto un **método espectrofotométrico** para la determinación de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol en productos lácteos en polvo suplementados con vitamina A (Indyk, 1983). La medida de la absorbancia se hace directamente sobre el lípido insaponificable, sin implicar purificación cromatográfica. Sin embargo la mayoría de los alimentos demandan esta purificación de forma previa a la medida espectrofotométrica, por lo que la técnica no ha sido muy empleada en el análisis de alimentos.

Los **métodos HPLC** para estimar la vitamina E en alimentos se detallan en las tablas (32-33).

La cromatografía de adsorción es capaz de separar isocráticamente los ocho vitámeros de la vitamina. La detección de los vitámeros se realiza generalmente por medida de la absorbancia o de la fluorescencia, siendo la sensibilidad de un detector de fluorescencia al menos diez veces superior a la de un detector espectrofotométrico (Thompson *et al.*, 1979). Los máximos de excitación, emisión son 295 y 330 nm respectivamente. La pequeña diferencia entre esas longitudes de onda puede crear problemas de solapamiento espectrales, que no ocurren cuando se utilizan equipos

con monocromadores de banda ancha (Woollard, 1987). Una excepción presentaron Rammell *et al.*, (1983), que propusieron una longitud de onda de excitación de 210 nm y una longitud de onda de emisión de 325 nm. El acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol posee sólo un 9% de la fluorescencia del tocoferol libre a longitudes de onda de 290 nm para la excitación y 330 nm para la emisión (Barnes & Taylor, 1980; Hakansson *et al.*, 1987). La detección por absorción en la zona del UV no es lo suficientemente selectiva apareciendo picos que interfieren con los de los vitámeros. Con la ayuda de un detector de fluorescencia programable, que permite cambiar las longitudes de onda de excitación-emisión con el tiempo, pueden optimizarse la selectividad y sensibilidad del análisis (Rettenmaier & Schüep, 1992). La cromatografía en fase inversa permite separar DL- $\alpha$ -tocoferol de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, siendo a menudo utilizada para la determinación de éstos en alimentos de origen animal. Si la fase móvil es semi-acuosa, los extractos de la muestra son evaporados a sequedad y redisoluertos en un disolvente polar compatible con los eluyentes.

TABLA 32. Condiciones de HPLC para la determinación de VITAMINA E

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Saponificación, extracción con n-hexano, evaporación	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Agua (95:5)	FL 296:330 nm	Alimentos	Total $\alpha$ -T	McMurray <i>et al.</i> , (1980)
Saponificación, extracción con éter dietílico, evaporación	Lichrosorb Si-60	n-Hexano conteniendo isopropanol 0,1%	FL 293:326 nm	Alimentos	Total $\alpha$ -T	Manz & Philipp (1981)
Extracción con etanol en Soxhlet, saponificación, extracción con éter de petróleo, evaporación	Chromegasphere Si-60	Isooctano/Tetrahidrofurano (97,5:2,5)	FL 294:325 nm	Alimentos	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T $\alpha$ , $\gamma$ -T3	Cort <i>et al.</i> , (1983)
Saponificación, extracción con n-hexano	Partisil ODS	n-Hexano/Isopropanol (99:1)	FL 210:325 nm	Hígado	$\alpha$ -T	Rammell <i>et al.</i> , (1983)
Digestión alcalina, extracción con éter dietílico, evaporación	Lichrosorb Si-60	n-Hexano conteniendo isopropanol 0,4%	UV 295 nm	Grasas y aceites	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T	Zonta & Stancher (1983)
Saponificación, extracción con n-hexano, evaporación	Lichrosorb Si-60, 5 $\mu$ m	n-Hexano/Diisopropiléter (93:7)	FL 292:324 nm	Carnes	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T $\alpha$ , $\beta$ -T3	Piironen <i>et al.</i> , (1985)
Dispersión en disolvente orgánico, extracción con n-hexano	Radial-Pak conteniendo Resolve Silica	n-Hexano conteniendo isopropanol 0,08%	UV 280 nm	Alimentos	Tocoferol acetato	Blott & Woollard (1986)
Saponificación, extracción con n-hexano, evaporación	BioSil ODS-5S C <sub>18</sub>	Metanol	FL 296:330 nm	Carnes	$\alpha$ , $\gamma$ -T	Ang <i>et al.</i> , (1990)

TABLA 33. Condiciones de HPLC para la determinación simultánea de VITAMINAS A y E

PREPARACION DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	DETECCION	MATRIZ	SEPARACION	REFERENCIA
Saponificación, extracción con n-hexano, evaporación	Radial-Pak C <sub>18</sub> , 10 µm	Metanol	UV 280 y 313 nm	Alimentos infantiles	Todo- <i>trans</i> -retinol y α-T	Reuvers <i>et al.</i> , (1982)
Saponificación, extracción con n-hexano y tolueno (1:1)	Lichrosorb Si-60, 5 µm	A: n-Hexano conteniendo isopropanol 2,5%	FL (A) 330:480 nm	Hígado	Todo- <i>trans</i> -retinol, 13- <i>cis</i> -retinol y α-T	Rettenmaier & Schüep (1992)
		E: n-Hexano conteniendo 1,4-dioxano 3%	FL (E) 295:330 nm			

Tras la revisión de las referencias bibliográficas se observa que no existen métodos de extracción y de análisis cromatográficos específicos para la determinación de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en productos cárnicos cocidos. Por ello, se han puesto a punto unos métodos propios cuyas características se exponen a continuación. Para el desarrollo de algunos procedimientos se ha tomado como base la experiencia de otros investigadores con otras muestras y otras condiciones que ya se han comentado.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

## **5.A. MATERIA PRIMA**

### **5.A.1. PRODUCTOS CARNICOS TRATADOS POR EL CALOR**

Para la realización del presente trabajo, se han empleado seis productos cárnicos diferentes. Tal y como lo contempla la Legislación alimentaria todos ellos pertenecen al grupo V (Productos cárnicos tratados por el calor). Los datos de información nutricional que aparecen en la descripción de los mismos, representan la media de doce análisis realizados y facilitados por el Laboratorio de Gestión de Calidad de la empresa Campofrío Alimentación, S.A. durante un período de tres meses.

#### **Productos cárnicos tratados por el calor**

Se denomina “productos cárnicos tratados por el calor” a todo producto preparado esencialmente con carnes y/o despojos comestibles de una o varias de las especies animales de abasto, aves y caza autorizadas, que se han sometido en su fabricación a la acción del calor, alcanzando en su punto crítico una temperatura suficiente para lograr la coagulación total o parcial de sus proteínas cárnicas y opcionalmente, a ahumado y/o maduración (Boletín Oficial del Estado, 1981).

Los productos seleccionados son (lunch, chopped pork, chopped beef, chopped de pavo, chopped vitaminado y mortadela siciliana) siendo derivados cárnicos fabricados fundamentalmente con carne o carne y grasa, picadas o troceadas.

Debido a que las vitaminas son extremadamente lábiles y muy sensibles a la luz y el oxígeno, todas las manipulaciones a las que se someten las muestras, durante el proceso de extracción de las vitaminas, deben realizarse en el menor tiempo posible, almacenándose las muestras a analizar en condiciones óptimas a 4 °C.

En todos los casos el estudio se ha hecho en dos fases tecnológicas de los productos:

- 1.- Antes de la cocción
- 2.- Después de la cocción, cuando ya están preparados para su salida al mercado

**Lunch**

En su elaboración se ha empleado carne de cerdo y de vacuno, panceta, agua, sal común, proteína vegetal, glucosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes y ascorbato de sodio como antioxidante.

Consiste en una mezcla de pasta fina y pasta gruesa embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno, no diferenciándose la panceta incorporada en el producto acabado.

La información nutricional se presenta en la tabla 34:

TABLA 34. Composición de Lunch

---

Valor energético por 100 g	205,14 Kcal
Proteínas (g)	12,20 ± 0,28
Hidratos de carbono (g)	5,11 ± 0,42
Grasas (g)	15,10 ± 0,74

---

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

### Chopped pork

En su elaboración se ha empleado carne de cerdo, de vacuno y de pavo, panceta, agua, sal común, proteína vegetal, glucosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, almidón como estabilizante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes y ascorbato de sodio como antioxidante.

Consiste en una mezcla de pasta fina y trozos de magro curados y picados en un calibre mayor, embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno.

La información nutricional se presenta en la tabla 35:

TABLA 35. Composición de Chopped pork

Valor energético por 100 g	158 Kcal
Proteínas (g)	12,48 ± 0,33
Hidratos de carbono (g)	4,34 ± 0,51
Grasas (g)	10,08 ± 0,47

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

**Chopped beef**

En su elaboración se ha empleado carne de vacuno y de cerdo, panceta, agua, sal común, proteína vegetal, glucosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, almidón como estabilizante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes y ascorbato de sodio como antioxidante.

Consiste en una mezcla de pasta fina y trozos de carne de vacuno, embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno.

La información nutricional se presenta en la tabla 36:

TABLA 36. Composición de Chopped beef

---

Valor energético por 100 g	149,01 Kcal
----------------------------	-------------

---

Proteínas (g)	13,33 ± 0,52
---------------	--------------

Hidratos de carbono (g)	3,65 ± 0,30
-------------------------	-------------

Grasas (g)	9,01 ± 0,66
------------	-------------

---

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

### Chopped de pavo

En su elaboración se ha empleado carne de pavo, agua, gelatina, leche en polvo, sal común, proteína vegetal, glucosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, sorbitol como gelificante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes, ascorbato de sodio como antioxidante y caramelo como reforzador de color.

Consiste en una mezcla de pasta fina y pasta gruesa elaboradas a partir de muslos y contramuslos de pavo, embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno.

La información nutricional se presenta en la tabla 37:

TABLA 37. Composición de Chopped pavo

Valor energético por 100 g	133,46 Kcal
Proteínas (g)	13,17 ± 0,10
Hidratos de carbono (g)	1,34 ± 0,08
Grasas (g)	8,38 ± 0,41

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

**Chopped vitaminado**

En su elaboración se ha empleado carne de cerdo, de vacuno y de pavo, agua, sal común, proteína vegetal, glucosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, almidón como estabilizante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes, ascorbato de sodio como antioxidante y complejo vitamínico.

Consiste en una mezcla de pasta fina y pasta gruesa de magros con un enriquecimiento vitamínico, embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno.

La información nutricional se presenta en la tabla 38:

TABLA 38. Composición de Chopped vitaminado

---

Valor energético por 100 g	152,22 Kcal
Proteínas (g)	12,08 ± 0,16
Hidratos de carbono (g)	3,97 ± 0,81
Grasas (g)	9,78 ± 0,36

---

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

### Mortadela siciliana

En su elaboración se ha empleado carne de cerdo, de vacuno y de pavo, panceta, agua, sal común, proteína vegetal, sacarosa, especias y saborizantes, nitrito de sodio como conservante, almidón como estabilizante, polifosfatos y carragenatos como emulsionantes y estabilizantes, ascorbato de sodio como antioxidante y cochinilla como reforzador de color.

Consiste en una mezcla de pasta fina y pasta gruesa embutida en tripa de plástico impermeable a la humedad y al oxígeno, diferenciándose la panceta incorporada en el producto acabado.

La información nutricional se presenta en la tabla 39:

TABLA 39. Composición de Mortadela siciliana

Valor nutricional por 100 g	245,91 Kcal
Proteínas (g)	10,46 ± 0,50
Hidratos de carbono (g)	8,92 ± 0,51
Grasas (g)	18,71 ± 1,10

Los datos representados son  $\bar{x}$  (n = 12) ± SD

## **5.B. METODOS**

**5.B.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA  
(HPLC) EN LA SEPARACION DE LAS VITAMINAS  
ESTUDIADAS**

---

### **5.B.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) EN LA SEPARACION DE LAS VITAMINAS ESTUDIADAS (Yost *et al.*, 1981 & Hewlett-Packard Española, 1988).**

#### **5.B.1.1. Separaciones analíticas por cromatografía**

Los métodos para el análisis químico son selectivos en los casos más favorables aunque pocos son verdaderamente específicos. Por lo tanto, la separación de una especie de las posibles interferencias es una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos siendo la forma más usada para llevar a cabo estas determinaciones la *cromatografía*.

La cromatografía se desarrolló a principios de siglo por el botánico ruso Mikhail Tswett para la separación y aislamiento de varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato cálcico finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método, del griego *croma* que significa “color” y *graphein* que significa “escribir”. Después de Tswett transcurrió un período de tiempo durante el que no tuvo lugar ningún nuevo desarrollo de la técnica. En 1930-31, Kuhn y E. Lederer retomaron el método en los laboratorios de Heidelberg, Alemania. En pocos años, la cromatografía líquida en columna se universalizó, desarrollándose las diferentes variantes. Entre 1960-1970, se desarrolló una nueva expansión de la moderna cromatografía líquida en columna, actualmente conocida como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, acrónimo del inglés High Performance Liquid Chromatography). Durante las cuatro últimas décadas, se ha producido un incremento en el número de métodos analíticos implicando HPLC; no sólo debido al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a la gran demanda, por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización y separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

La técnica de HPLC dispone de una amplia gama de columnas empaquetadas con micropartículas porosas de sílice, las cuáles permiten una rápida distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Una bomba de alta presión regula el flujo de la fase móvil y la introducción de la muestra se realiza con un inyector automático. La detección de los componentes separados se logra por control continuo de los eluyentes de la columna. Mediante HPLC se realizan en una columna determinada cientos de separaciones individuales, de forma rápida, eficaz y reproducible, incluso cuando los compuestos se hallan en muy bajas concentraciones en matrices complejas como son los alimentos.

Estas características, unido a su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, permiten que la técnica HPLC sea seleccionada para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de las vitaminas hidrosolubles y liposolubles estudiadas en este trabajo.

Sin embargo, a pesar de las ventajas, esta técnica no está completamente exenta de problemas. La cromatografía líquida es tan sólo el último paso del análisis, siendo partes muy significativas a considerar el muestreo, la extracción y la purificación previa de las vitaminas en cada matriz concreta, sucediendo con frecuencia que el método de extracción para una vitamina determinada en una matriz, no es reproducible cuando se intenta aplicar en otra diferente.

### **5.B.1.2. Instrumentación para HPLC**

#### **5.B.1.2.1. Modelo**

El equipo utilizado es el modelo HP 1090 serie M, cuya estructura principal la integran cuatro módulos.

- 1.- El sistema de suministro de disolventes
- 2.- El compartimento de columna

- 3.- El sistema de inyección de la muestra
- 4.- La unidad de detección

Todo el control se lleva desde un ordenador conectado al equipo, cuyo sistema operativo es Vectra MS-DOS 3,3.

#### **5.B.1.2.2. Descripción funcional del equipo**

##### **1. Sistema de suministro de disolventes**

El sistema de distribución de fase móvil con el que opera el equipo tiene tres canales para disolventes. Cada canal lleva asociado un depósito con capacidad para un litro y una bomba de medida de doble jeringa. Cada una de ellas toma la proporción correspondiente de disolvente, usando alternativamente las dos jeringas en el desplazamiento de dicho volumen. Así la aspiración y distribución del disolvente están sincronizadas.

El disolvente, una vez medido (0-5 ml/min), entra en una cámara de baja presión (LPC), que almacena el volumen de flujo mientras la bomba de alta presión suministra eluyente. La presión en la LPC nunca excede los 6 bar. El disolvente contenido en la LPC fluye al interior de la bomba de alta presión (0-400 bar), desde esa posición se envía a una unidad de amortiguación que reduce las fluctuaciones de la presión originadas en la bomba de alta presión.

La elección de la fase móvil es una de las decisiones más importantes al establecer los parámetros de una separación en cromatografía líquida.

En la figura 13 se observa el funcionamiento descrito anteriormente.

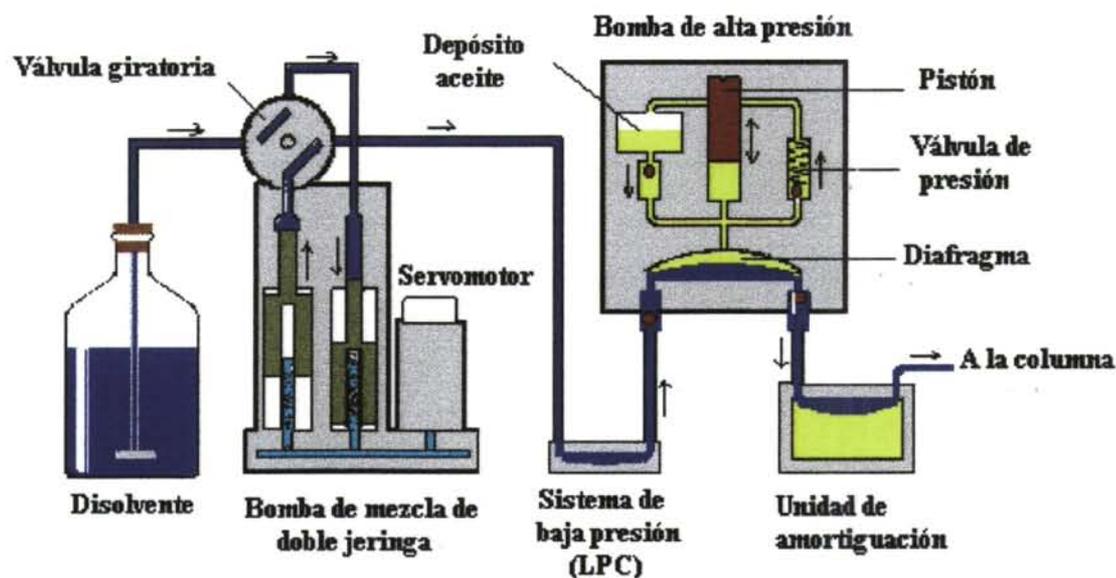


Fig. 13. Sistema de bombeo isocrático del HP 1090

## 2. Compartimento de columna

El compartimento de columna está situado cerca del inyector y del detector para minimizar el ensanchamiento de los picos. Tiene capacidad para permitir la utilización de cualquier configuración de columnas, que se instalan en los soportes integrados. La homogeneidad de la temperatura a lo largo de toda la columna es fundamental para la eficacia de la separación. Precalentando el eluyente cuando entra en el compartimento de la columna, se iguala la temperatura de éste y de la columna para cualquier flujo y muestra. El inyector hace pasar la fase móvil a través de un capilar de 0,12 mm DI en contacto con un intercambiador de calor. Para que la temperatura sea completamente homogénea, el aire que circula por el interior del compartimento está a igual temperatura que la fase móvil. El termostato de control y el ventilador aseguran una precisión de  $\pm 0,5$  °C, esencial para obtener tiempos de retención reproducibles.

---

La columna define la calidad de la separación y una parte vital de la documentación de cualquier método desempeñando un papel principal en la cromatografía analítica. Optimizando las variables de relleno de columna (tamaño de poro, tamaño de partícula, carga de carbono, área superficial, modo de separación, fase enlazada y presencia de grupos residuales) y las variables de configuración de columna (longitud, diámetro interno y material de construcción) se consigue la separación analítica óptima para cada vitamina.

En los últimos años ha habido un fuerte interés en disminuir la longitud y el diámetro interno de la columna, así como el tamaño de partícula del relleno. Los inherentes beneficios de reducir la longitud y el diámetro interno son una disminución en el consumo de disolvente y un incremento en el límite de detección. De forma paralela, el relleno de columna ha experimentado una reducción en el tamaño de partícula, manteniendo la eficacia mientras disminuye el tiempo de análisis. Todo ello permite una menor dispersión de la muestra en la fase estacionaria durante el proceso de separación.

### **3. Sistema de inyección de la muestra**

El método de introducción de la muestra es muy importante en HPLC. Un dispositivo de inyección poco eficiente da lugar a una resolución de los componentes de la muestra en forma de bandas largas y anchas.

El equipo utilizado dispone de un mecanismo de inyección automático para 100 muestras que opera mediante una válvula de rotación de seis vías. Antes de la inyección la válvula está en el modo "normal", permitiendo que el disolvente fluya a través del auto-inyector y de la columna. Cuando comienza un ciclo de inyección, la válvula rota a la posición de "carga" y la fase móvil circula sólo a la columna. La aguja de inyección se conecta a la jeringa (25  $\mu\text{l}$ ), se levanta y el vial que contiene la muestra se sitúa inmediatamente debajo. La aguja desciende hasta el vial y aspira la muestra (normalmente 10  $\mu\text{l}$ , pudiendo llegar a ser 2  $\mu\text{l}$ ) introduciéndola en el capilar. Con la aguja y el vial situados de nuevo en su posición normal, el inyector automático vuelve al modo de operación normal, inyectando toda la muestra en la

columna como un todo sin diluir. La precisión de operación es inferior al 1% (normalmente 0,6%).

La figura 14 describe las etapas del ciclo del inyector automático.

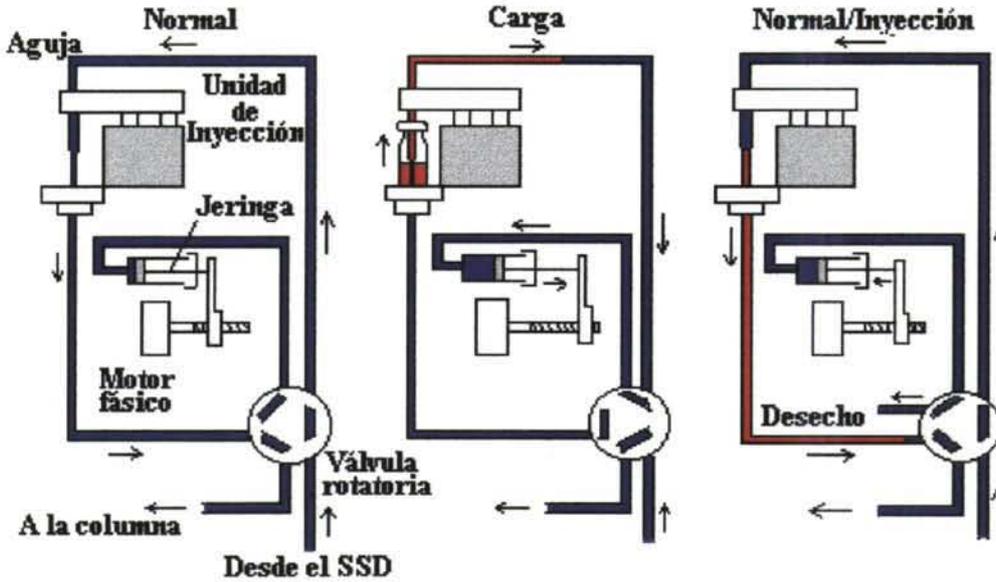


Fig. 14. Etapas en el ciclo del inyector automático

#### 4. Unidad de detección

Los detectores utilizados en la cromatografía líquida son de tipo óptico. En ellos, se hace pasar la corriente líquida a través de una microcubeta de pequeño volumen (10  $\mu$ l) que se atraviesa por un rayo de luz. Los cambios en la intensidad de la luz, causados en este estudio por absorbanza UV y/o emisión de fluorescencia, resultantes de la interacción de la luz con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta se registran en forma de variaciones del voltaje de salida, suministrándose a un integrador que proporciona los tiempos de retención y las áreas de los picos cromatográficos.

En este estudio de investigación se han empleado dos detectores:

A.- Detector de matriz de fotodiodos (DAD)

B.- Detector de fluorescencia

#### A.- Detector de matriz de fotodiodos (DAD)

La detección por matriz de fotodiodos (DAD) proporciona una sensibilidad y selectividad, aplicable al análisis de trazas. La identificación de los componentes de la muestra se incrementa al poder registrar simultáneamente y en un sólo análisis hasta ocho longitudes de onda diferentes en el rango (190-600 nm) adquiriendo datos espectrales y cromatográficos en paralelo.

El haz de luz procedente de una lámpara de deuterio pasa a través de la celda de flujo antes de ser dispersada hacia los 211 fotodiodos de la matriz, realizándose una lectura completa de los mismos cada 10 milisegundos. Puesto que la matriz de fotodiodos y la red de difracción están fijas, no se pueden producir errores por desajuste mecánico lo que permite mantener un alto nivel de reproducibilidad y exactitud. En la figura 15 se presenta el sistema óptico del detector de matriz de fotodiodos.

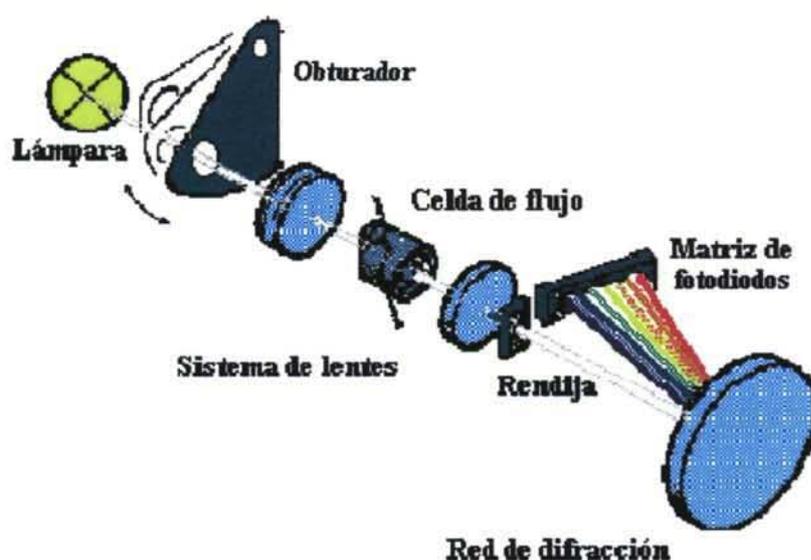


Fig. 15. Sistema óptico del detector de matriz de fotodiodos

## **B.- Detector de fluorescencia**

Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por simple derivatización este modo de detección permite alcanzar mayores cotas en sensibilidad y selectividad que el sistema DAD. Efectúa barridos de los espectros de excitación y de emisión, mediante técnicas de registro con paro de flujo, encontrando los mejores pares de longitudes de onda de sus componentes.

La radiación UV procedente de una fuente de xenon se hace pasar a través de la célula de flujo donde las moléculas de soluto se excitan con energía de longitud de onda corta emitiendo instantáneamente en todas las direcciones una radiación de fluorescencia a una longitud de onda mayor, midiéndose en un ángulo de incidencia perpendicular a la excitación.

**5.B.2. DETERMINACIONES ANALITICAS DE LAS  
VITAMINAS ESTUDIADAS**

## 5.B.2.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES

### 5.B.2.1.1. VITAMINA B<sub>1</sub>

#### 5.B.2.1.1.1. Reactivos

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Hidrocloruro de tiamina.- (99%, Merck, Art. 8181, D-6100 Darmstadt 1, Germany)
- Acido clorhídrico.- (37%, 1,19 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 131020)
- Acido tricloroacético.- (99,5%, Grado PA, Panreac, Ref. 131067)
- Acido ortofosfórico.- (85%, 1,69 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141032)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Metanol.- (99,8%, 0,79 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 261091)
- Acetato de sodio 3-hidrato.- (99%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141632)
- Clara-Diastasa.- (Fluka Química, Art. 27540, Apt. de Correos 161, 28100 Alcobendas, Madrid)
- Hidróxido de sodio.- (97%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141687)
- Ferricianuro de potasio.- (99%, Merck, Art. 4973)

- Solución oxidante (Se prepara nueva cada día y se protege de la luz).- Se añade 1 ml de solución acuosa de ferricianuro de potasio al 1% a 24 ml de solución fría de hidróxido de sodio al 15%.
  
- Solución estándar.- La solución patrón de tiamina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 100 ml con una solución de ácido clorhídrico 0,1 N. Solución estable un mes si se guarda en oscuridad en un frigorífico. A partir de ella las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.
  
- Hidrógeno fosfato de dipotasio.- (99%, Grado PA, Panreac, Ref. 131512)
  
- Dihidrógeno fosfato de potasio.- (99%, Grado PA, Panreac, Ref. 131509)
  
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7,0  $\pm$  0,1 .- Se disuelven 0,44 g de hidrógeno fosfato de dipotasio y 0,34 g de dihidrógeno fosfato de potasio en 400 ml de agua, ajustando la solución a pH 7,0 con ácido ortofosfórico al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 500 ml con agua. Esta solución se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .
  
- Fase móvil.- Está integrada por:
  - A- 70% Tampón fosfato pH 7,0
  - B- 30% Acetonitrilo
  
- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

#### **5.B.2.1.1.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)
- Detectores.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A y detector de fluorescencia modelo HP 1046A (Hewlett-Packard Co.)
- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)
- Cartucho HPLC.- Spherisorb C<sub>8</sub>, 5 µm tamaño de partículas de relleno, 25 x 0,4 cm DI, N° TR-015045 (Teknokroma, 08190 - Sant Cugat del Vallés, Barcelona)
- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)
- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)
- Autoclave.- Modelo Autester-E Dry, Ref. 4000854 (J.P.Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)
- pH-metro.- Modelo micropH 2002 (Crison Instrumente, AG, CH-6340 Baar, Switzerland)
- Baño termostático.- Modelo Precistern, Ref. 6000388 (J.P.Selecta S.A.)
- Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45 µm Millex-HV (Millipore Co.)

- Cartuchos de purificación.- Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters Associates, Milford, MA 01757, U.S.A.)

- Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han empleado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

### **5.B.2.1.1.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de tiamina, que se ha conservado en refrigeración y oscuridad, se prepara en el momento de utilización una solución de trabajo de menor concentración que permite a su vez mediante diluciones en agua obtener soluciones de inferiores concentraciones, de las que se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 0,5, 1, 2, 2,5, 5 y 7,5 µg de tiamina se prepara la curva de calibración, que permite cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 16.

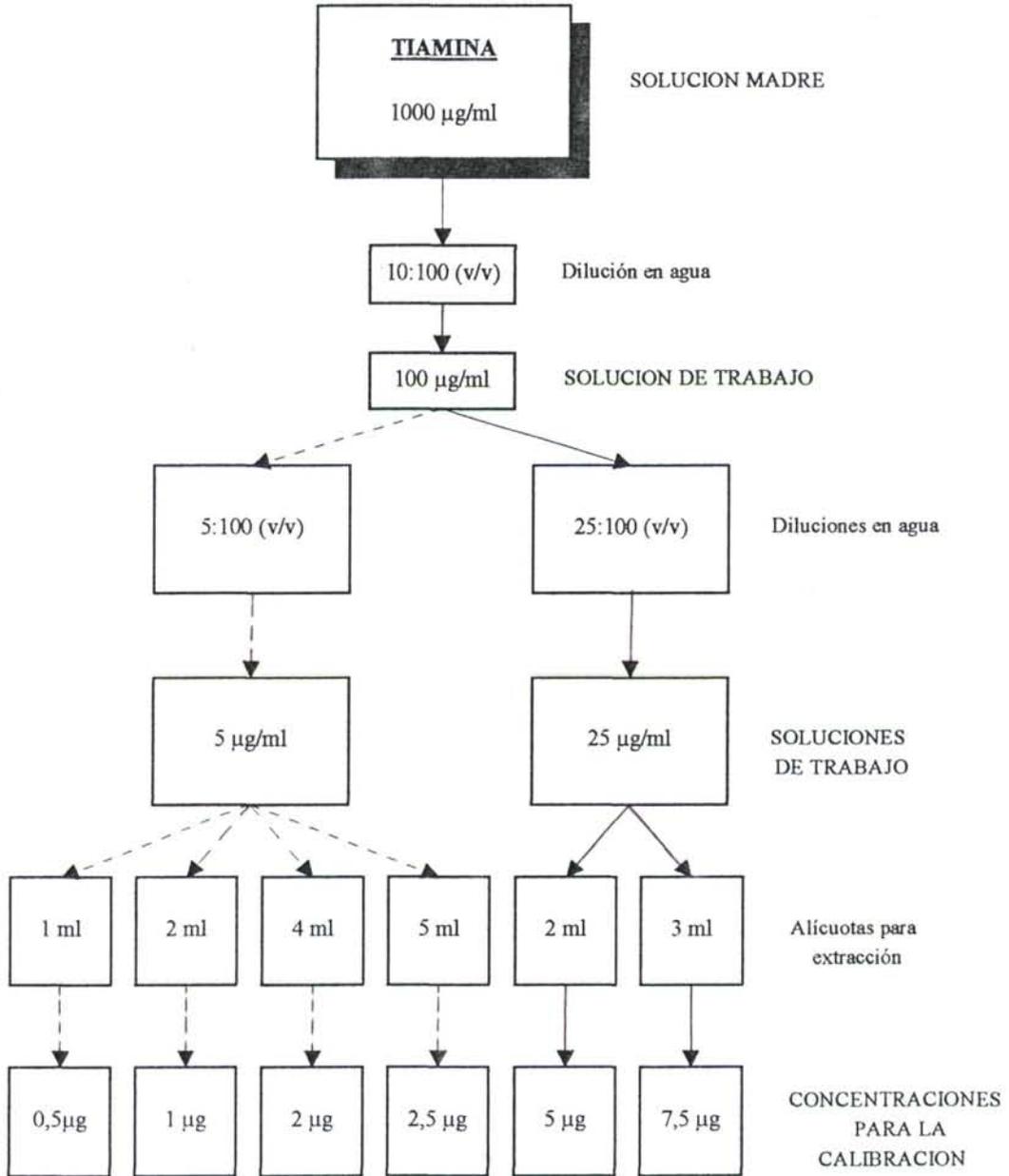


Fig. 16. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de TIAMINA

#### **5.B.2.1.1.4. Procedimiento analítico**

En este método la tiamina y la riboflavina se extraen de forma similar y conjunta del alimento, por medio de una hidrólisis ácida y enzimática común a ambas vitaminas pero con procesos de derivatización, purificación y análisis cromatográfico diferentes en cada caso.

Se pesan por duplicado en matraces erlenmeyer topacio de 250 ml muestras de 10,000 g a temperatura ambiente finamente picadas y homogéneas. A patrones, muestras y blanco se añaden 60 ml de HCl 0,1 N, se agitan las muestras y se llevan a hidrolizar en un autoclave 20 min a 120 °C (Ang & Moseley, 1980). Las mezclas se dejan enfriar a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 4,0-4,5 añadiendo solución acuosa de acetato de sodio 2,5 M. A las muestras se adicionan 5 ml de solución enzimática acuosa (6% (p/v) de Clara-diestasa) y se llevan a incubar 3 horas a 50 °C. Para precipitar las proteínas, se añaden 2 ml de ácido tricloroacético al 50% (p/v) y las soluciones se calientan en un baño de agua termostático 15 min a 90 °C. Después las muestras se enfrían a temperatura ambiente y se enrasan hasta 100 ml con agua en matraces aforados color topacio. Las mezclas se filtran a través de papel de filtro ALBET, y se conservan en material de color topacio y refrigeradas para su uso al día siguiente.

La tiamina en el extracto recogido se oxida a su derivado fluorescente, tiocromo. Para ello se toman 10 ml de los filtrados y se adicionan 5 ml de solución recién hecha de ferricianuro potásico al 1% (p/v) preparada en solución acuosa fría de hidróxido sódico al 15% (AOAC 1990, ref. 942.23); se mezclan por agitación manual durante 15 s, permitiendo 45 s para oxidación. Inmediatamente, a cada muestra se adiciona 1 ml de ácido ortofosfórico al 85% y se mezcla para neutralizar y minimizar la formación de disulfuro de tiamina, reacción dependiente del pH (Ryan & Ingle, 1980).

La concentración y posterior purificación de estos extractos se lleva a cabo pasando los mismos a través de un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> previamente activado mediante lavado por duplicado con metanol (2 ml) seguido de agua (2 ml). Para

eliminar sustancias interferentes el cartucho se lava una vez con 3 ml de una solución al 5% (v/v) de metanol en tampón fosfato 5 mM a pH 7. La tiamina se eluye con 3 ml de metanol puro en un tubo de ensayo y se filtra a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  en un vial de color topacio para el análisis por cromatografía líquida. Las muestras se han protegido de la luz durante todo el proceso usando material de vidrio de color topacio o cubriendo con papel de aluminio.

La separación cromatográfica se realiza en un cartucho Spherisorb C<sub>8</sub> 25 x 0,4 cm. La determinación de tiamina como tiocromo se mide a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 430 nm, para una ganancia de 14. El volumen de inyección es 10  $\mu\text{l}$  y la fase móvil es una mezcla al 70% de solución tampón fosfato a pH 7 y 30% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,650 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 17.

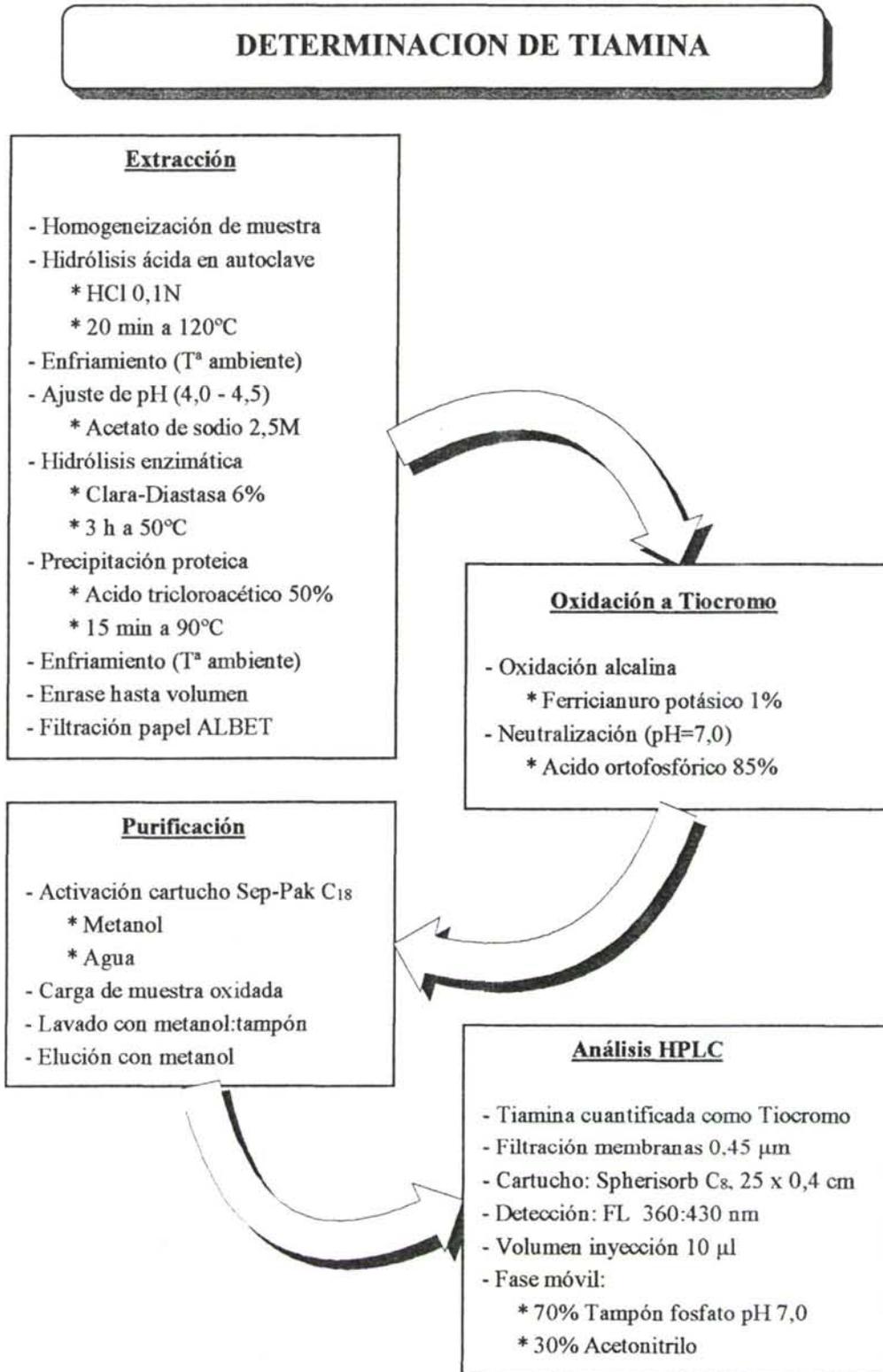


Fig. 17. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de TIAMINA

---

**5.B.2.1.1.5. Cálculos**

El contenido de tiamina presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la fórmula:

$$\text{mg Tiamina/100 g} = \frac{10 \times Y}{P \times V}$$

Siendo :

Y =  $\mu\text{g}$  de tiamina leídos en la curva de calibración a partir del área cromatográfica

P = peso, en g, de la muestra inicial

V = volumen, en ml, de alícuota tomada

### **5.B.2.1.2. VITAMINA B<sub>2</sub>**

#### **5.B.2.1.2.1. Reactivos**

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Riboflavina.- (99%, Merck, Art. 7609, D-6100 Darmstadt 1, Germany)
- Acido clorhídrico.- (37%, 1,19 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 131020)
- Acido tricloroacético.- (99,5%, Grado PA, Panreac, Ref. 131067)
- Acido ortofosfórico.- (85%, 1,69 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141032)
- Acido acético glacial.- (99,5%, 1,05 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141008)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Tolueno.- (99,5%, Merck, Art. 8325)
- Acetato de sodio 3-hidrato.- (99%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141632)
- Clara-Diastasa.- (Fluka Química, Art. 27540, Apt. de Correos 161, 28100 Alcobendas, Madrid)
- Solución estándar.- La solución patrón de riboflavina (50 µg/ml) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 1000 ml con una solución de ácido acético 0,02 N conservándola con unas gotas de tolueno. Esta solución es estable durante dos meses si se almacena en oscuridad en un frigorífico. A partir de ella las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.

- Acido 1-heptanosulfónico (Sal sódica, Sigma Chemical Co., Ref. H-2766, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)

- Reactivo de par-iónico 5 mM, pH  $2,7 \pm 0,1$ .- Se disuelven 0,505 g de ácido 1-heptanosulfónico en 400 ml de agua, ajustando la solución a pH 2,7 con ácido ortofosfórico al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 500 ml con agua. Esta solución se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$ .

- Fase móvil.- Está integrada por:

A- 75% Reactivo de par-iónico pH 2,7

B- 25% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

#### **5.B.2.1.2.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)

- Detectores.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A y detector de fluorescencia modelo HP 1046A (Hewlett-Packard Co.)

- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)

- Cartucho HPLC.- Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partículas de relleno, 25 x 0,4 cm DI, N° TR-015033 (Teknokroma, 08190 - Sant Cugat del Vallés, Barcelona)
- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)
- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)
- Autoclave.- Modelo Autester-E Dry, Ref. 4000854 (J.P.Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)
- pH-metro.- Modelo micropH 2002 (Crison Instrumente, AG, CH-6340 Baar, Switzerland)
- Baño termostático.- Modelo Precistern, Ref. 6000388 (J.P.Selecta S.A.)
- Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45  $\mu\text{m}$  Millex-HV (Millipore Co.)
- Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han empleado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

#### **5.B.2.1.2.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de riboflavina, que se ha conservado en refrigeración y oscuridad, se preparan en el momento de utilización varias soluciones de trabajo mediante diluciones en agua. De cada una de las soluciones resultantes se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación

que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 10, 20, 40, 80 y 100  $\mu\text{g}$  de riboflavina se prepara la curva de calibración, que permite cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 18.

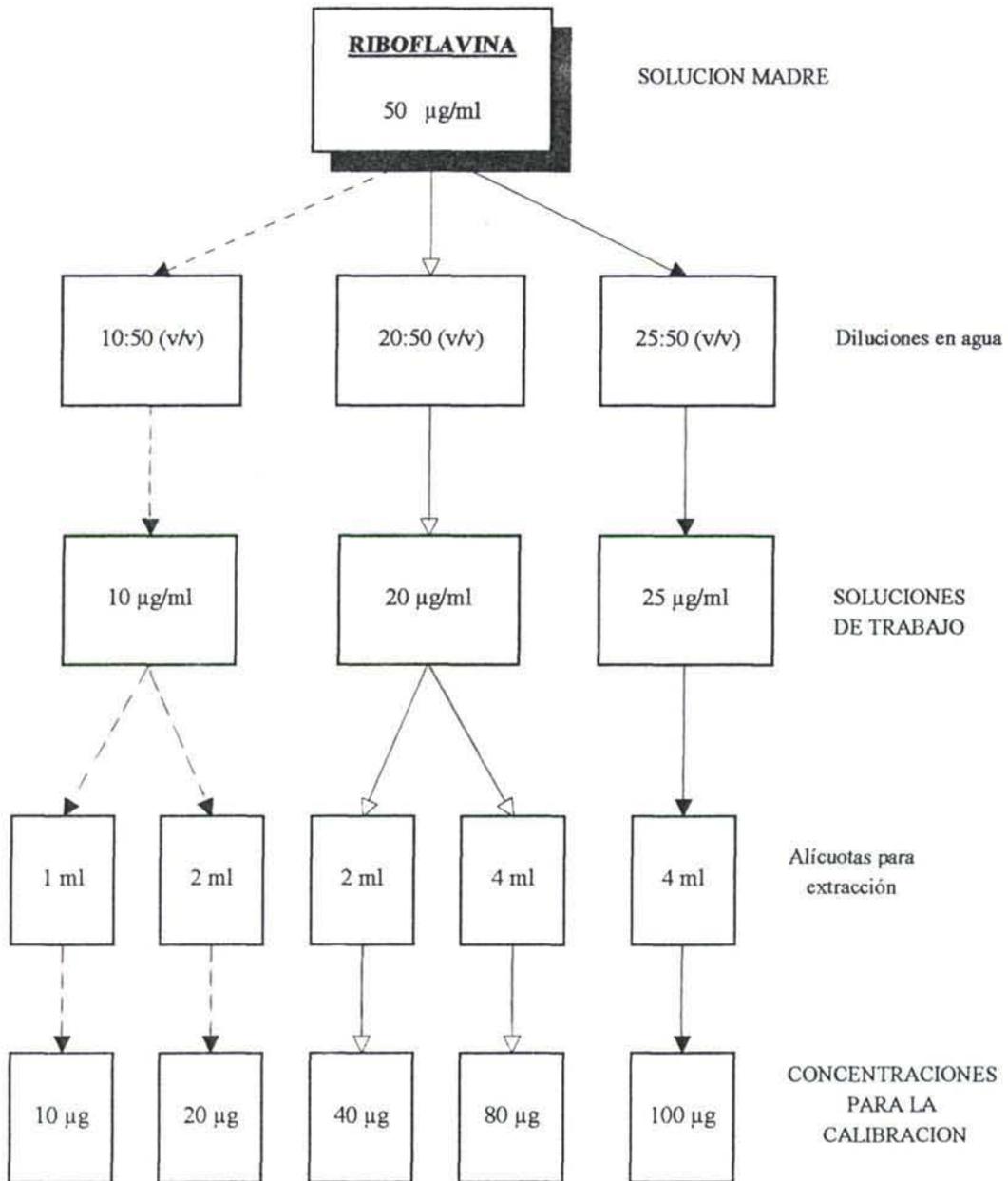


Fig.18. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de RIBOFLAVINA

#### **5.B.2.1.2.4. Procedimiento analítico**

El proceso de extracción de la riboflavina como se indicó en el apartado 5.B.2.1.1.4. es común al utilizado con la tiamina hasta conseguir el extracto de filtración, que se inyecta directamente al sistema cromatográfico, sin necesidad de ningún proceso de derivatización y purificación.

La separación cromatográfica se realiza en un cartucho Spherisorb ODS-2 25 x 0,4 cm. La determinación de riboflavina se mide a una longitud de onda de excitación de 227 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm, para una ganancia de 14. El volumen de inyección es 10  $\mu$ l y la fase móvil es una mezcla al 75% de reactivo par-iónico a pH 2,7 y 25% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,600 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 19.

**DETERMINACION DE RIBOFLAVINA****Extracción**

- Homogeneización de muestra
- Hidrólisis ácida en autoclave
  - \* HCl 0,1N
  - \* 20 min a 120°C
- Enfriamiento (Tª ambiente)
- Ajuste de pH (4,0 - 4,5)
  - \* Acetato de sodio 2,5M
- Hidrólisis enzimática
  - \* Clara-Diastasa 6%
  - \* 3 h a 50°C
- Precipitación proteica
  - \* Acido tricloroacético 50%
  - \* 15 min a 90°C
- Enfriamiento (Tª ambiente)
- Enrase hasta volumen
- Filtración papel ALBET

**Análisis HPLC**

- Filtración membranas 0,45 µm
- Cartucho: Spherisorb ODS-2, 25 x 0,4 cm
- Detección: FL 227:520 nm
- Volumen inyección 10 µl
- Fase móvil:
  - \* 75% Reactivo de par-iónico pH 2,7
  - \* 25% Acetonitrilo

Fig. 19. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de RIBOFLAVINA

### 5.B.2.1.2.5. Cálculos

El contenido de riboflavina presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la fórmula:

$$\text{mg Riboflavina/100 g} = \frac{0,1 \times Y}{P}$$

Siendo :

Y =  $\mu\text{g}$  de riboflavina leídos en la curva de calibración a partir del área cromatográfica

P = peso, en g, de la muestra inicial

---

### 5.B.2.1.3. NIACINA

#### 5.B.2.1.3.1. Reactivos

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Acido nicotínico.- (99,5%, Merck, Art. 6817, D-6100 Darmstadt 1, Germany)
- Nicotinamida.- (Sigma Chemical Co., Ref. N-3376, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)
- Sulfato de zinc.- (Heptahidrato, Grado PA, Panreac, Ref. 131787)
- Hidróxido de sodio.- (97%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141687)
- Acido ortofosfórico.- (85%, 1,69 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141032)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Acido 1-heptanosulfónico.- (Sal sódica, Sigma Chemical Co., Ref. H-2766)
- Solución estándar.- La solución patrón de ácido nicotínico y nicotinamida (1000 µg/ml) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 100 ml con agua ultrapura (Milli-Q Plus). Esta solución puede almacenarse en un frigorífico durante una semana. A partir de ella las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.
- Reactivo de par-iónico 5 mM, pH 3,3 ± 0,1.- Se disuelven 0,505 g de ácido 1-heptanosulfónico en 400 ml de agua, ajustando la solución a pH 3,3 con ácido ortofosfórico al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 500 ml con agua. Esta solución se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

- Fase móvil.- Está integrada por :

A - 75% Reactivo de par-iónico pH 3,3

B - 25% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

### **5.B.2.1.3.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)

- Detectores.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A (Hewlett-Packard Co.)

- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)

- Cartucho HPLC.- Spherisorb ODS-2 , 5 µm tamaño de partículas de relleno, 25 x 0,4 cm DI, N° TR-015033 (Teknokroma, 08190 - Sant Cugat del Vallés, Barcelona)

- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)

- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)

- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)

- 
- pH-metro.- Modelo micropH 2002 (Crison Instrumente, AG, CH-6340 Baar, Switzerland)
  - Baño termostático.- Modelo Precistern, Ref. 6000388 (J.P.Selecta S.A.)
  - Centrífuga.- Modelo Megafuge 1,0 (Heraeus, Agustín de Foxá 25, 28036 Madrid)
  - Agitador magnético.- Modelo Agimatic-N, Ref. 7000243 (J.P. Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
  - Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45  $\mu\text{m}$  Millex-HV (Millipore Co.)
  - Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han empleado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

### **5.B.2.1.3.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de ácido nicotínico y nicotinamida que se ha preparado en un único matraz y se ha conservado en refrigeración, se hacen en el momento de utilización varias soluciones de trabajo mediante diluciones en agua. Se toman alícuotas de las soluciones resultantes para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 20, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{g}$  de ácido nicotínico y nicotinamida respectivamente, se preparan las dos curvas de calibración, que permiten cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 20.

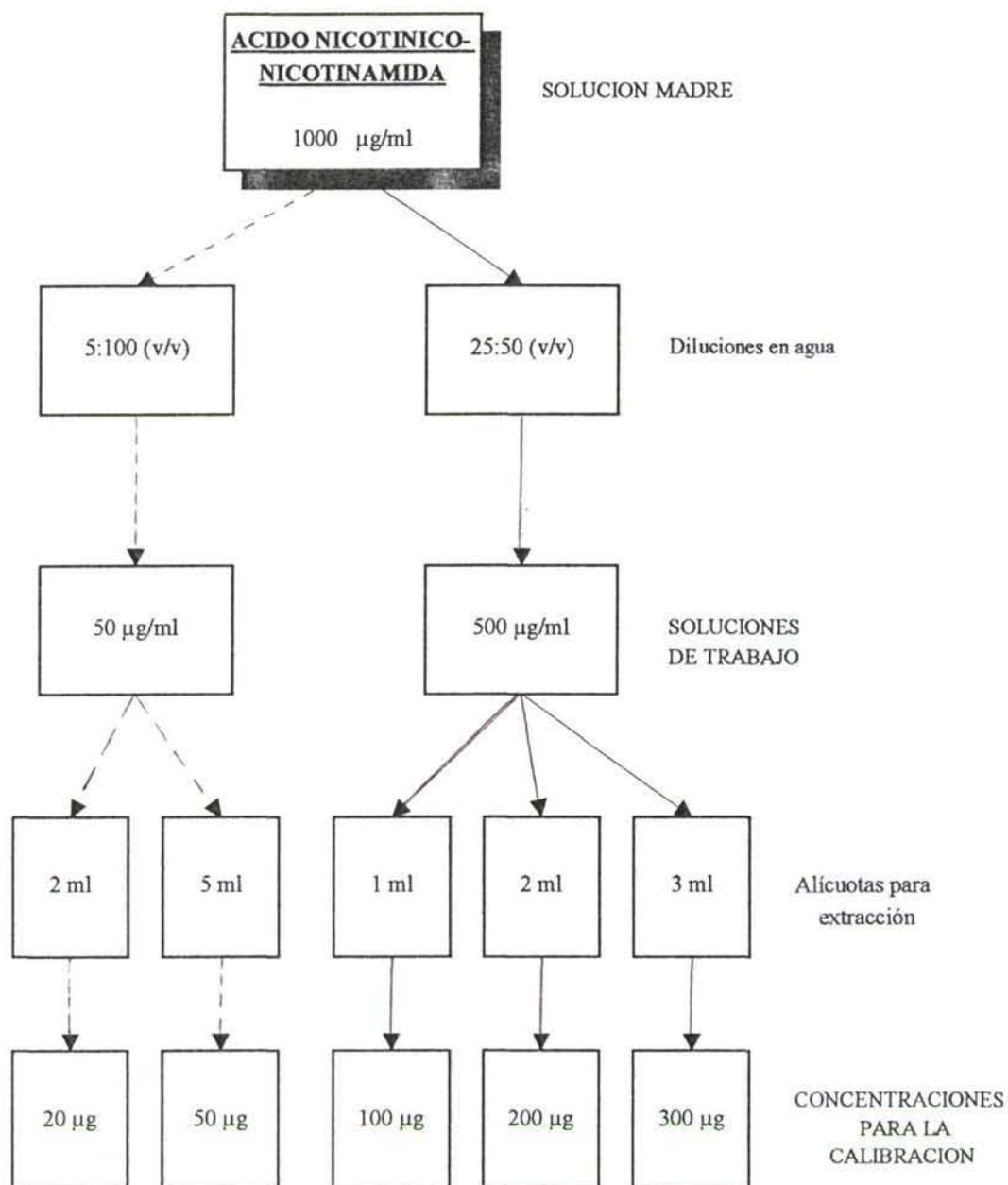


Fig. 20. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACIDO NICOTINICO y NICOTINAMIDA

#### 5.B.2.1.3.4. Procedimiento analítico

Se pesan por duplicado en vasos de precipitados de 50 ml muestras de 10,000 g a temperatura ambiente finamente picadas y homogéneas. A patrones, muestras y blanco se adicionan 30 ml de agua mezclándose 2 min en un agitador magnético. Se transfieren a matraces aforados color topacio de 100 ml de volumen enrasando con agua ultrapura. Se centrifugan las muestras 5 min a 3000 r.p.m.. Se filtran a través de papel de filtro ALBET. Se pipetea 20 ml de los respectivos extractos en matraces aforados color topacio de 25 ml, se adicionan 1 ml de solución acuosa saturada de sulfato de zinc y 1 ml de solución 1 N de hidróxido de sodio sucesivamente. Se diluyen a volumen con agua, se mezclan bien y se dejan en reposo 30 min a temperatura ambiente. Se filtran las soluciones a través de papel de filtro ALBET y después se pasan por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  recogiendo en viales de color topacio para el análisis cromatográfico.

La separación cromatográfica se realiza en un cartucho Spherisorb ODS-2 25 x 0,4 cm, siendo la detección por UV a 261 nm. El volumen de inyección es 10  $\mu\text{l}$  y la fase móvil es una mezcla al 75% de reactivo par-iónico a pH 3,3 y 25% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,650 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 21.

## DETERMINACION DE NIACINA

### Extracción

- Homogeneización de muestra
- Extracción acuosa (T° ambiente)
- Enrase hasta volumen
- Centrifugación 5 min/3000 r.p.m.
- Filtración papel ALBET
- Precipitación proteica
  - \* Solución saturada ZnSO<sub>4</sub>
  - \* NaOH 1N
- Enrase hasta volumen
- Reposo
  - \* 30 min (T° ambiente)
- Filtración papel ALBET

### Análisis HPLC

- Filtración membranas 0,45 µm
- Cartucho: Spherisorb ODS-2, 25 x 0,4 cm
- Detección: UV 261 nm
- Volumen inyección 10 µl
- Fase móvil:
  - \* 75% Reactivo de par-iónico pH 3,3
  - \* 25% Acetonitrilo

Fig. 21. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de NIACINA

### 5.B.2.1.3.5. Cálculos

El contenido total de niacina presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la suma del contenido de ácido nicotínico y nicotinamida, calculados respectivamente por las fórmulas:

$$\text{mg Acido nicotínico/100 g} = \frac{10 \times Y}{P \times V}$$

$$\text{mg Nicotinamida/100 g} = \frac{10 \times Y}{P \times V}$$

Siendo :

Y =  $\mu\text{g}$  de ácido nicotínico o de nicotinamida leídos en las curvas de calibración respectivas a partir de las áreas cromatográficas

P = peso, en g, de la muestra inicial

V = volumen, en ml, de alícuota tomada

$$\text{mg Niacina/100 g} = \text{mg Acido nicotínico/100 g} + \text{mg Nicotinamida/100 g}$$

#### **5.B.2.1.4. VITAMINA B<sub>6</sub>**

##### **5.B.2.1.4.1. Reactivos**

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Hidrocloruro de piridoxal (PL).- (Sigma Chemical Co., Ref. P-9130, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)
- Fosfato de piridoxal (PLP).- (98%, Sigma Chemical Co., Ref. P-9255)
- Dihidrocloruro de piridoxamina (PM).- (98%, Sigma Chemical Co., Ref. P-9380)
- Fosfato de piridoxamina (PMP).- (Sigma Chemical Co., Ref. P-9505)
- Hidrocloruro de piridoxol, piridoxina (PN).- (Sigma Chemical Co., Ref. P-9755)
- Acido metafosfórico.- (35,9%, Sigma Chemical Co., Ref. M-5043)
- Acido tricloroacético.- (99,5%, Grado PA, Panreac, Ref. 131067)
- Acido clorhídrico.- (37%, 1,19 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 131020)
- Acido ortofosfórico.- (85%, 1,69 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141032)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Dihidrógeno fosfato de potasio.- (99%, Grado PA, Panreac, Ref. 131509)
- Solución estándar.- Las soluciones patrón de PL, PLP, PM y PMP (100 µg/ml) y la solución patrón de PN (500 µg/ml) se preparan respectivamente en matraces

aforados de color topacio de 100 ml con una solución de ácido clorhídrico 0,1 N. Estas soluciones pueden almacenarse en oscuridad en un frigorífico durante un mes. A partir de ellas las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.

- Tampón fosfato 0,05 M, pH 3,2 ± 0,1.- Se disuelven 3,44 g de dihidrógeno fosfato de potasio en 400 ml de agua, ajustando la solución a pH 3,2 con ácido ortofosfórico al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 500 ml con agua. Esta solución se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

- Fase móvil.- Está integrada por:

A- 99% Tampón fosfato pH 3,2

B- 1% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

#### **5.B.2.1.4.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)

- Detectores.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A y detector de fluorescencia modelo HP 1046A (Hewlett-Packard Co.)

- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)

- Columna HPLC.- Hypersil BDS C<sub>18</sub>, 5 µm tamaño de partículas de relleno, 10 x 0,46 cm DI, N° 59864581 (Shandon HPLC, Life Sciences (Spain) S.A., Carretera Real 95, 08960 Sant Just Desvern, Barcelona)
- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)
- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)
- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)
- pH-metro.- Modelo micropH 2002 (Crison Instrumente, AG, CH-6340 Baar, Switzerland)
- Centrífuga.- Modelo Megafuge 1,0 (Heraeus, Agustín de Foxá 25, 28036 Madrid)
- Agitador magnético.- Modelo Agimatic-N, Ref. 7000243 (J.P. Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
- Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45 µm Millex-HV (Millipore Co.)
- Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han empleado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

#### **5.B.2.1.4.3. Preparación de patrones**

A partir de las soluciones madre preparadas para los diversos vitámeros de la vitamina B<sub>6</sub>, que se han conservado en refrigeración y oscuridad, se preparan en el momento de utilización las soluciones de trabajo mediante diluciones en agua. De

éstas se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos obtenidos para las concentraciones finales de cada vitámero se preparan las respectivas curvas de calibración, que permiten cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en las figuras (22-24).

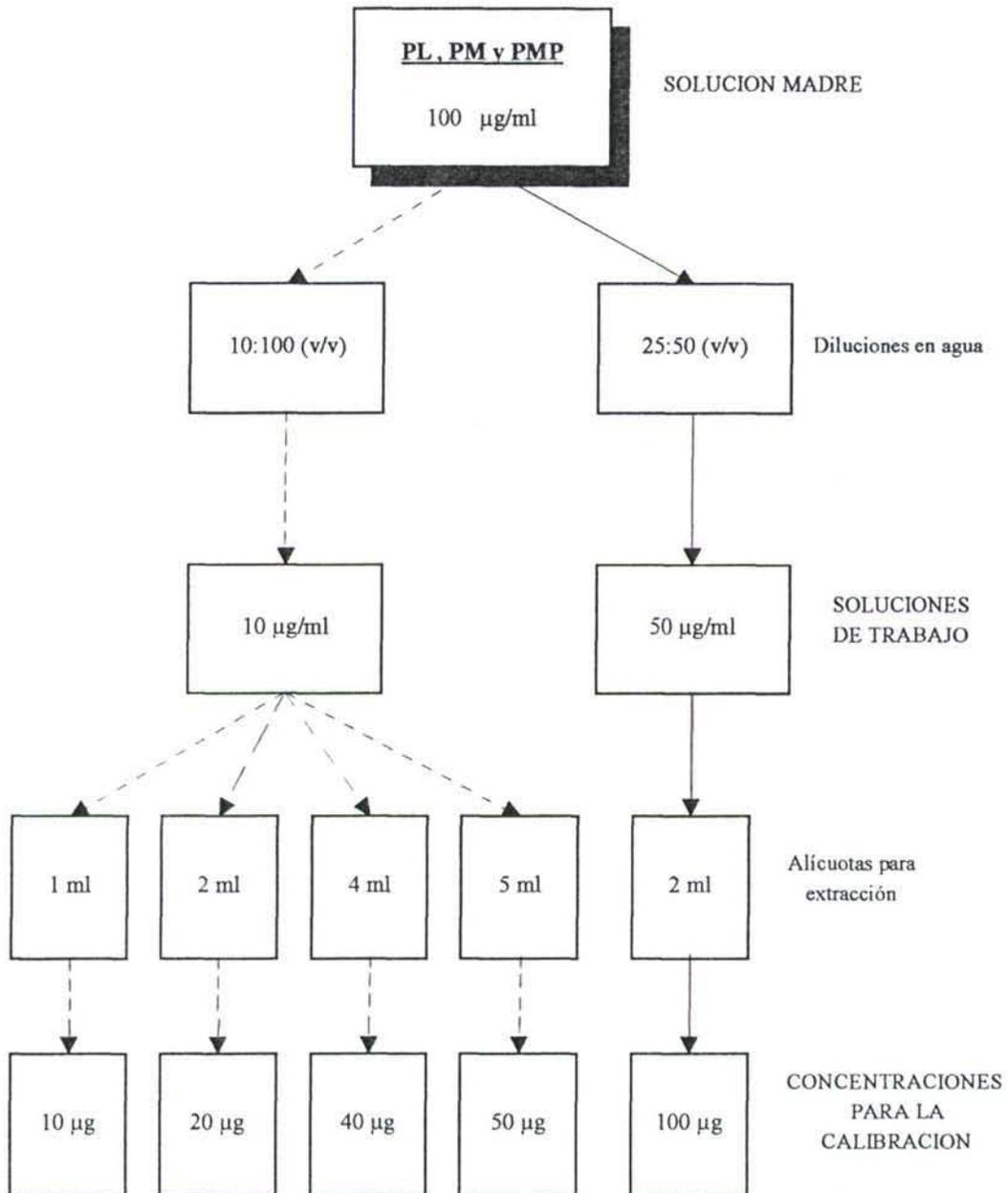


Fig. 22. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL, DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA y FOSFATO DE PIRIDOXAMINA

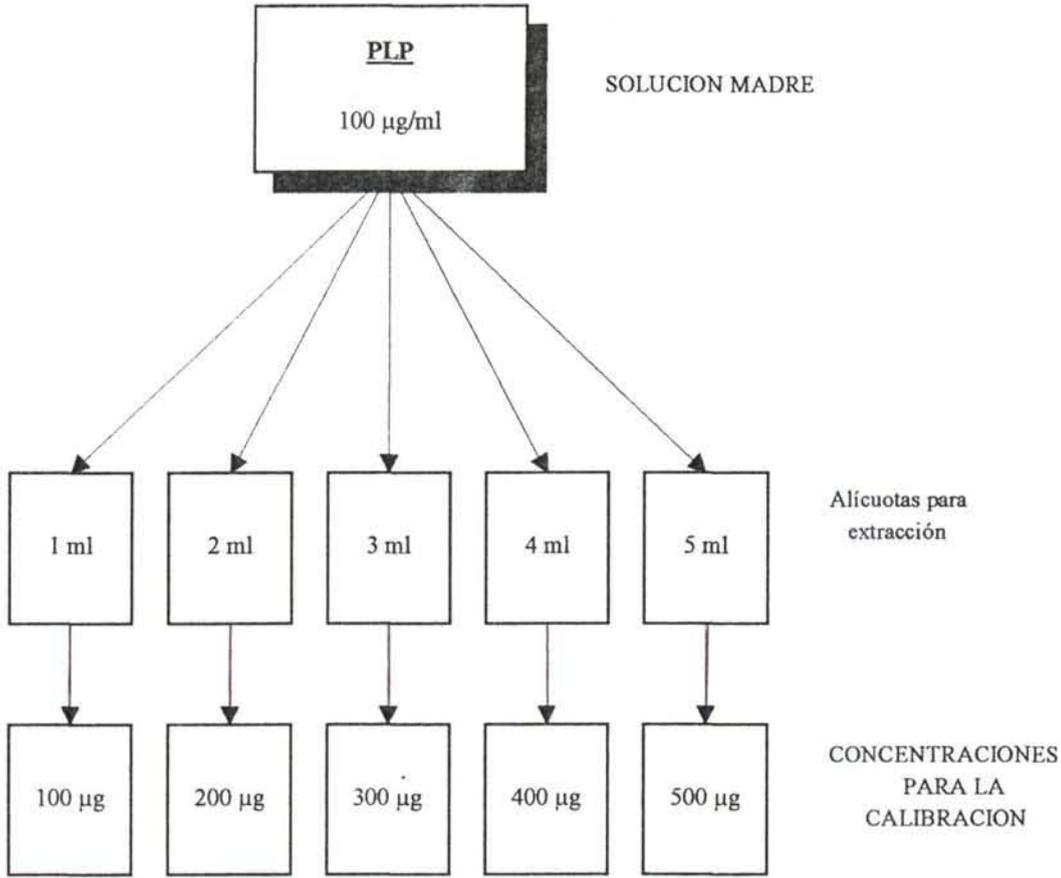


Fig. 23. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de FOSFATO DE PIRIDOXAL

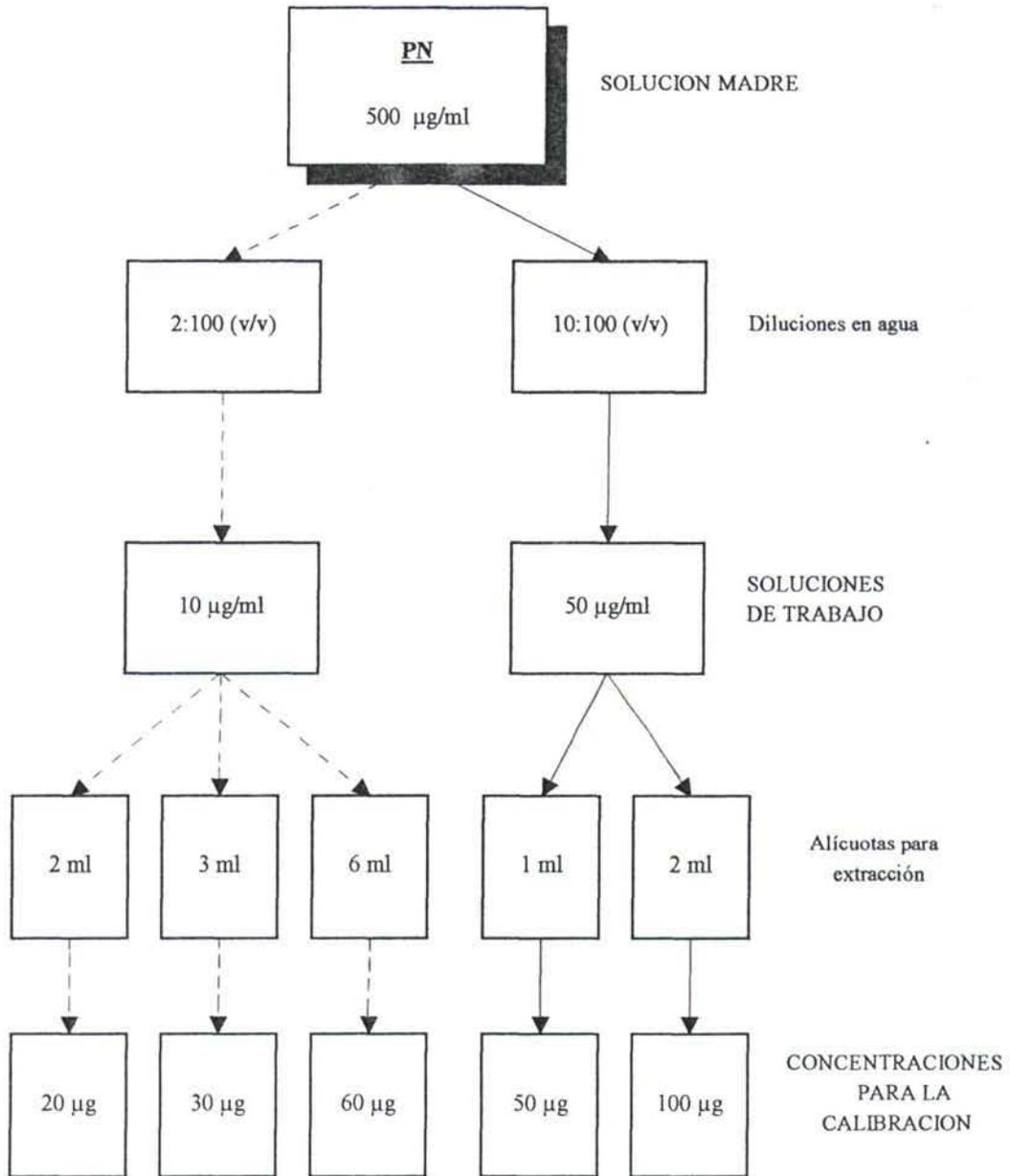


Fig. 24. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL

#### **5.B.2.1.4.4. Procedimiento analítico**

Se ha desarrollado un método HPLC para la separación de cinco vitámeros B<sub>6</sub> (PL, PLP, PM, PMP y PN). Se pesan por duplicado en vasos de precipitados de 50 ml muestras de 10,000 g a temperatura ambiente finamente picadas y homogéneas. A patrones, muestras y blanco se adicionan 20 ml de una solución fría de ácido metafosfórico al 5% (p/v). Los extractos se mezclan 2 min en un agitador magnético para facilitar la extracción. Después se llevan hasta un volumen de 100 ml con agua en matraces aforados de color topacio. Se centrifugan las muestras 5 min a 3000 r.p.m.. Se filtran a través de papel de filtro ALBET y de forma previa al análisis HPLC las muestras se pasan a través de un filtro de 0,45 µm reuniéndose en viales color topacio para su análisis cromatográfico. Las muestras se han protegido de la luz durante todo el proceso usando material de vidrio de color topacio o cubriendo con un papel de aluminio.

La separación cromatográfica se realiza en una columna Hypersil BDS C<sub>18</sub> 10 x 0,46 cm, siendo la detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 290 nm y una longitud de onda de emisión de 395 nm, para una ganancia de 16. El volumen de inyección es 10 µl y la fase móvil es una mezcla al 99% de solución tampón fosfato a pH 3,2 y 1% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,800 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 25.

**DETERMINACION DE VITAMINA B<sub>6</sub>**

**Extracción**

- Homogeneización de muestra
- Hidrólisis ácida (T<sup>a</sup> ambiente)
  - \* Acido metafosfórico 5%
- Enrase hasta volumen
- Centrifugación 5 min/3000 r.p.m.
- Filtración papel ALBET

**Análisis HPLC**

- Filtración membranas 0,45 µm
- Columna: Hypersil BDS C<sub>18</sub>, 10 x 0,46 cm
- Detección: FL 290:395 nm
- Volumen inyección 10 µl
- Fase móvil:
  - \* 99% Tampón fosfato pH 3,2
  - \* 1% Acetonitrilo

Fig. 25. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de VITAMINA B<sub>6</sub>

**5.B.2.1.4.5. Cálculos**

El contenido de vitamina B<sub>6</sub> presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la suma del contenido de los diversos vitámeros, calculados por la fórmula:

$$\text{mg Vitamina B}_6/100 \text{ g} = \sum \frac{0,1 \times Y}{P}$$

Siendo :

$\Sigma$  = símbolo que indica la suma de ese cálculo para cada vitámero

Y =  $\mu\text{g}$  de cada vitámero leídos en las curvas de calibración respectivas a partir de las áreas cromatográficas

P = peso, en g, de la muestra inicial

## 5.B.2.1.5. VITAMINA C

### 5.B.2.1.5.1. Reactivos

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Acido L-ascórbico.- (Vitamina C, 99,7%, Merck, Art. 127, D-6100 Darmstadt 1, Germany)
- Acido metafosfórico.- (35,9%, Sigma Chemical Co., Ref. M-5043, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)
- Acido ortofosfórico.- (85%, 1,69 Kg/l, Grado PRS, Panreac, Ref. 141032)
- Acido etilendiaminotetraacético (EDTA).- (99%, Grado Puro, Sigma Chemical Co., Ref. ED)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Dihidrógeno fosfato de potasio.- (99%, Grado PA, Panreac, Ref. 131509)
- Solución estándar.- La solución patrón de ácido L-ascórbico (1000 µg/ml) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 100 ml con una solución de ácido metafosfórico al 2% (p/v) y 2 ml de solución EDTA de 0,1 mg/ml. Esta solución puede almacenarse en oscuridad en un frigorífico durante una semana. A partir de ella las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.
- Tampón fosfato 0,02 M, pH 3,6 ± 0,1.- Se disuelven 1,37 g de dihidrógeno fosfato de potasio en 400 ml de agua, ajustando la solución a pH 3,6 con ácido ortofosfórico al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 500 ml con agua. Esta solución se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

- Fase móvil.- Está integrada por:

A - 40% Tampón fosfato pH 3,6

B - 60% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

### **5.B.2.1.5.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)

- Detector.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A (Hewlett-Packard Co.)

- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)

- Cartucho HPLC.- Spherisorb NH<sub>2</sub>, 5 µm tamaño de partículas de relleno, 25 x 0,4 cm DI, N° TR-015051 (Teknocroma, 08190- Sant Cugat del Vallés, Barcelona)

- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)

- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)

- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)

- pH-metro.- Modelo micropH 2002 (Crison Instrumente, AG, CH-6340 Baar, Switzerland)
- Centrífuga.- Modelo Megafuge 1,0 (Heraeus, Agustín de Foxá 25, 28036 Madrid)
- Agitador magnético.- Modelo Agimatic-N, Ref. 7000243 (J.P. Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
- Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45  $\mu\text{m}$  Millex-HV (Millipore Co.)
- Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han empleado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

### **5.B.2.1.5.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de ácido L-ascórbico, que se ha conservado en refrigeración y oscuridad, se preparan en el momento de utilización varias soluciones de trabajo mediante diluciones en agua. De las soluciones resultantes se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 50, 75, 100, 150 y 200  $\mu\text{g}$  de ácido L-ascórbico se prepara la curva de calibración, que permite cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 26.

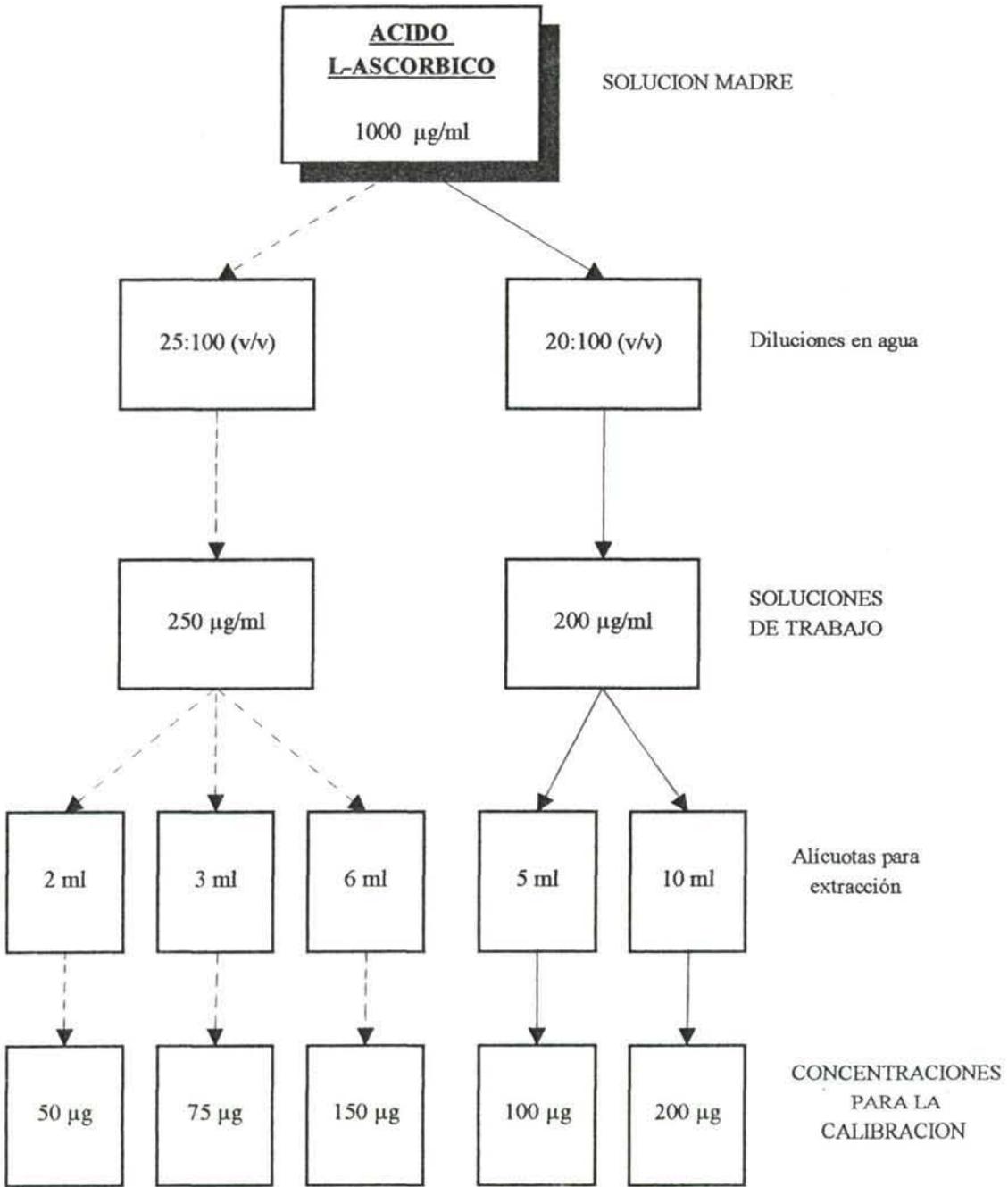


Fig. 26. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACIDO L-ASCORBICO

#### 5.B.2.1.5.4. Procedimiento analítico

Se pesan por duplicado en vasos de precipitados de 50 ml muestras de 5,000 g a temperatura ambiente finamente picadas y homogéneas. A patrones, muestras y blanco se adicionan 20 ml de una solución fría de ácido metafosfórico al 5% (p/v) y 1 ml de una solución EDTA de 0,1 mg/ml, mezclándose 2 min en un agitador magnético para facilitar la extracción. Después se llevan hasta un volumen de 50 ml con agua en matraces aforados de color topacio. Se centrifugan las muestras 5 min a 3000 rpm. Se filtran a través de papel de filtro ALBET, y se diluyen (1:2) con agua ultrapura (Milli-Q Plus). De forma previa al análisis HPLC las muestras se pasan a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  recogiendo en viales color topacio para su análisis cromatográfico. Las muestras se han protegido de la luz durante todo el proceso usando material de vidrio de color topacio o cubriendo con papel de aluminio.

La separación cromatográfica se realiza en un cartucho Spherisorb  $\text{NH}_2$  25 x 0,4 cm, siendo la detección por UV a 248 nm. El volumen de inyección es 10  $\mu\text{l}$  y la fase móvil es una mezcla al 40% de solución tampón fosfato a pH 3,6 y 60% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 1,000 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 27.

## DETERMINACION DE ACIDO L-ASCORBICO

### Extracción

- Homogeneización de muestra
- Hidrólisis ácida (T° ambiente)
  - \* Acido metafosfórico 5%
  - \* EDTA 0,1 mg/ml
- Enrase hasta volumen
- Centrifugación 5 min/3000 r.p.m.
- Filtración papel ALBET
- Dilución (1:2)
  - \* Agua ultrapura

### Análisis HPLC

- Filtración membranas 0,45 µm
- Cartucho: Spherisorb NH<sub>2</sub> 25 x 0,4 cm
- Detección: UV 248 nm
- Volumen inyección 10 µl
- Fase móvil:
  - \* 40% Tampón fosfato pH 3,6
  - \* 60% Acetonitrilo

Fig. 27. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de ACIDO L-ASCORBICO

**5.B.2.1.5.5. Cálculos**

El contenido de ácido L-ascórbico presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la fórmula:

$$\text{mg Acido L-ascórbico/100 g} = \frac{5 \times Y}{P \times V}$$

Siendo :

Y =  $\mu\text{g}$  de ácido L-ascórbico leídos en la curva de calibración a partir del área cromatográfica

P = peso, en g, de la muestra inicial

V = volumen, en ml, de alícuota tomada

## **5.B.2.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES**

### **5.B.2.2.1. VITAMINA A**

#### **5.B.2.2.1.1. Reactivos**

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Acetato de todo-*trans*-retinol.- (Sigma Chemical Co., Ref. R-4632, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)
- 2-Propanol.- (99,8%, 0,79 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 261090)
- Pirogalol.- (Reactivo ACS, Sigma Chemical Co., Ref. P-2923)
- Hidróxido de potasio.- (85%, Grado PA, Panreac, Ref. 131515)
- Etanol.- (96% , 0,81 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 131085)
- n-Hexano.- (99%, 0,66 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 132063)
- Sulfato de sodio anhidro.- (99%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141716)
- Gas nitrógeno.- (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón, 300, 08009 Barcelona)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Tetrahidrofurano.- (99%, 0,89 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 261736)
- Fenolftaleína.- (Merck, Art. 7233, D-6100 Darmstadt 1, Germany)

- Solución estándar.- La solución patrón de acetato de todo-*trans*-retinol (aproximadamente 350 µg/ml) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 100 ml con una solución pura de 2-propanol. Esta solución puede almacenarse en oscuridad en un frigorífico y en presencia de nitrógeno durante un mes. A partir de ella las soluciones de trabajo se preparan en el momento de su uso.

- Fase móvil.- Está integrada por:

A - 10% Tetrahidrofurano

B - 90% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

#### **5.B.2.2.1.2. Aparatos**

Material fungible de laboratorio en color topacio y en particular:

- Cromatógrafo de líquidos.- Modelo HP 1090 equipado con un sistema de inyección automático, modelo Rheodyne 7010 e integrador modelo HP 3390A (Hewlett-Packard Española, S.A., Ctra. N-VI, Km 18,400, 28230 Las Rozas, Madrid)

- Detector.- Detector de fotodiodos modelo HP 8452A (Hewlett-Packard Co.)

- Impresora.- Modelo HP ThinkJet (Hewlett-Packard Co.)

- Cartucho HPLC.- Spherisorb ODS-2, 5 µm tamaño de partículas de relleno, 15 x 0,4 cm DI, N° TR-015032 (Teknocroma, 08190- Sant Cugat del Vallés, Barcelona)

- Picadora.- Modelo "Luxe" Ref. 643, (Moulinex)

- Balanza analítica y de precisión.- Modelo AE 160 (Mettler Instrumente AG, CH - 8606 Greifensee, Switzerland)
- Frigorífico.- Modelo US-2360 P3 (Fagor)
- Refrigerante Liebig-West.- Ref. 2306 (Pobel, C/. Luis I, s/n., Polígono Industrial Vallecas IV, 28031 Madrid)
- Centrífuga.- Modelo Megafuge 1,0 (Heraeus, Agustín de Foxá 25, 28036 Madrid)
- Agitador magnético.- Modelo Agimatic-N, Ref. 7000243 (J.P. Selecta S.A., Ctra. N-II, Km 585,1, Abrera, Barcelona)
- Rotavapor.- Modelo RE/A (Büchi Laboratoriums-Technik AG, CH-9230 Flawil, Switzerland)
- Vacobox.- Modelo B-160 (Büchi Laboratoriums-Technik AG, CH-9230 Flawil, Switzerland)
- Filtros.- De papel plegado ALBET N° 1305 y filtros 0,45  $\mu\text{m}$  Millex-HV (Millipore Co.)
- Sistema Milli-Q Plus, 220-240 V / 50 Hz - Ref. ZFMQ050 (Millipore Co.)

También se han usado otros materiales de uso corriente en el laboratorio.

#### **5.B.2.2.1.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de acetato de todo-*trans*-retinol, que se ha conservado en refrigeración, oscuridad y atmósfera inerte de nitrógeno, se preparan en el momento de utilización varias soluciones de trabajo de menor concentración

mediante diluciones en agua. De las soluciones resultantes se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 3,5, 7, 14, 17,5 y 21  $\mu\text{g}$  de acetato de todo-*trans*-retinol se prepara la curva de calibración, que permite cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 28.

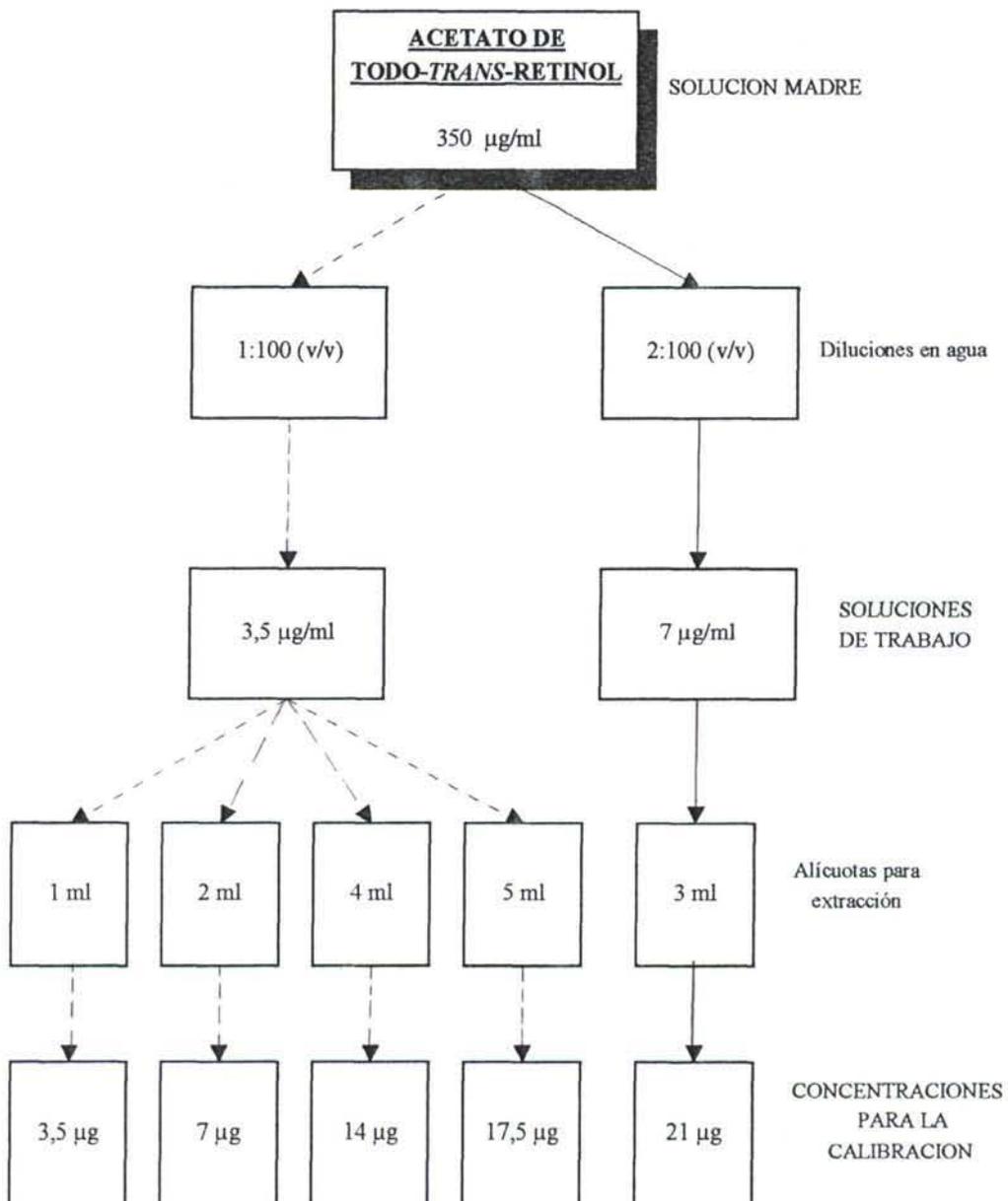


Fig. 28. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACETATO DE TODO-*TRANS*-RETINOL

#### 5.B.2.2.1.4. Procedimiento analítico

Se pesan por duplicado en matraces de fondo plano en color topacio de 250 ml muestras de 7,000 g a temperatura ambiente finamente picadas y homogéneas. A patrones, muestras y blanco se añaden 50 mg de pirogalol, 10 ml de agua, 10 ml de solución de hidróxido potásico 13 N en agua y 15 ml de etanol, mezclándose en atmósfera de nitrógeno 15 min. Los extractos de muestra se saponifican a reflujo en baño María 20 min a 45 °C. Se enfrían rápidamente con agua corriente, las mezclas se centrifugan 5 min a 3000 r.p.m. y después se transfieren los sobrenadantes a embudos cónicos de decantación de 250 ml. Las vitaminas liposolubles se extraen tres veces con volúmenes de 50 ml de n-hexano, permitiendo la separación de la fase acuosa y orgánica. Los extractos orgánicos combinados se lavan cuidadosamente con sucesivas porciones de 20 ml de agua destilada hasta que las aguas de lavado quedan libres de álcalis, no dando coloración a una solución de fenolftaleína al 1%. Durante los lavados la agitación debe ser suave para evitar la formación de emulsiones, las cuáles, si no se rompen, retienen algunas de las vitaminas resultando en una pobre recuperación. Las soluciones se hacen pasar seguidamente por un filtro ALBET que contiene sulfato sódico anhidro, lavando a continuación con 10 ml de n-hexano. Las muestras se transfieren a matraces de fondo plano de 250 ml evaporándolas a vacío en un rotavapor a 40 °C hasta disminuir su volumen a unos mililitros (< 5ml). Los extractos se disuelven en etanol, se vuelven a evaporar reduciendo volumen y los residuos se arrastran con etanol hasta un volumen final de 5 ml en tubos de color topacio graduados. A continuación se pasan las muestras por un filtro de 0,45 µm recogiendo en viales color topacio para su análisis cromatográfico.

La separación cromatográfica se realiza en un cartucho Spherisorb ODS-2 15 x 0,4 cm, siendo la detección para el todo-*trans*-retinol por UV a 325 nm. El volumen de inyección es 10 µl y la fase móvil es una mezcla al 10% de tetrahidrofurano y 90% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,800 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 30.

### 5.B.2.2.1.5. Cálculos

El contenido de todo-*trans*-retinol presente en la muestra, expresado en microgramos por ciento, viene dado por la fórmula:

$$\mu\text{g Todo-Trans-Retinol}/100 \text{ g} = \frac{100 \times Y \times f}{P}$$

Siendo:

Y =  $\mu\text{g}$  de acetato de todo-*trans*-retinol leídos en la curva de calibración a partir del área cromatográfica

f = 0,872 (factor que permite transformar los  $\mu\text{g}$  de acetato de todo-*trans*-retinol en  $\mu\text{g}$  de todo-*trans*-retinol)

P = peso, en g, de la muestra inicial

## 5.B.2.2.2. VITAMINA E

### 5.B.2.2.2.1. Reactivos

Todos los reactivos que se han utilizado son de grado analítico reconocido y el agua se ha purificado por sistema Milli-Q Plus (Millipore Co., Milford, Massachusetts 01757 U.S.A.).

- Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol.- (97-102%, Merck, Art. 8284, D-6100 Darmstadt 1, Germany)
- Etanol.- (96% , 0,81 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 131085)
- Pirogalol.- (Reactivo ACS, Sigma Chemical Co., Ref. P-2923, St. Louis, MO 63178, U.S.A.)
- Hidróxido de potasio.- (85%, Grado PA, Panreac, Ref. 131515)
- n-Hexano.- (99%, 0,66 Kg/l, Grado PA, Panreac, Ref. 132063)
- Sulfato de sodio anhidro.- (99%, Grado PRS, Panreac, Ref. 141716)
- Gas nitrógeno.- (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón, 300, 08009 Barcelona)
- Acetonitrilo.- (99,9%, 0,78 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 263093)
- Tetrahidrofurano.- (99%, 0,89 Kg/l, Grado HPLC, Panreac, Ref. 261736)
- Solución estándar.- La solución patrón de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (aproximadamente 1000  $\mu$ g/ml) se prepara en un matraz aforado de color topacio de 100 ml con una solución pura de etanol. Esta solución puede almacenarse en oscuridad en un frigorífico y en presencia de nitrógeno durante un mes. A partir de ella la solución de trabajo se prepara en el momento de su uso.

- Fase móvil.- Está integrada por:

A - 10% Tetrahidrofurano

B - 90% Acetonitrilo

- Gas helio.- Usado en la desgasificación de la fase móvil (S.E. de Carburos Metálicos S.A., Aragón 300, 08009 Barcelona)

#### **5.B.2.2.2.2. Aparatos**

Se ha utilizado el mismo material que el empleado en la determinación del acetato de todo-*trans*-retinol, detallado en 5.B.2.2.1.2.

#### **5.B.2.2.2.3. Preparación de patrones**

A partir de la solución madre de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, que se ha conservado en refrigeración, oscuridad y atmósfera inerte de nitrógeno, se prepara en el momento de utilización una solución de trabajo de menor concentración mediante dilución en agua. De la solución resultante se toman alícuotas por duplicado para someter al mismo proceso de extracción y cuantificación que el blanco y las muestras. Con los resultados cromatográficos que se han obtenido para las concentraciones finales de 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g}$  de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol se prepara la curva de calibración, que permite cuantificar el contenido de vitamina en las muestras. Una descripción más detallada se presenta en la figura 29.

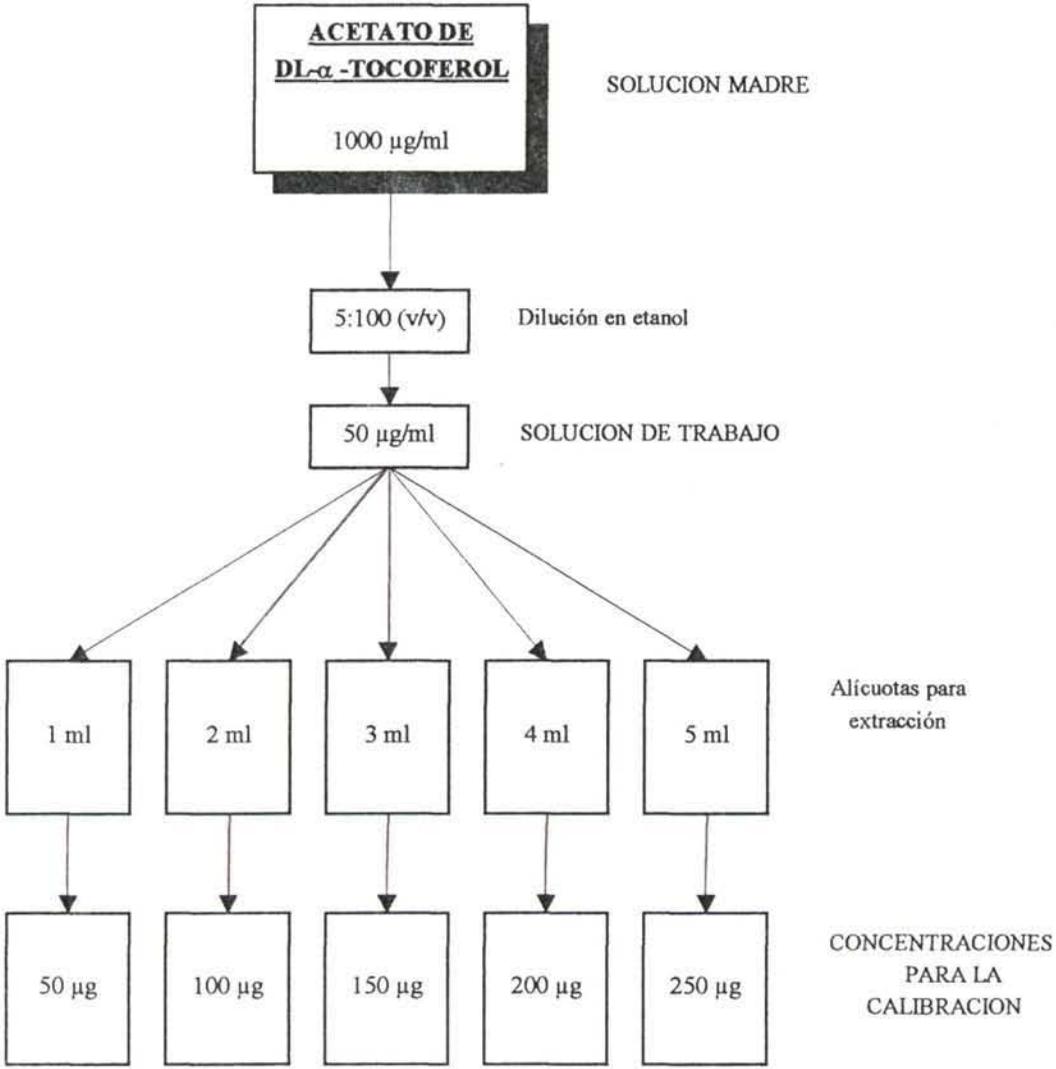


Fig. 29. Diagrama de preparación de patrones para la calibración de ACETATO DE DL-α-TOCOFEROL

#### **5.B.2.2.2.4. Procedimiento analítico**

El proceso de extracción se ha detallado en el apartado 5.B.2.2.1.4.

La separación cromatográfica se realiza en un único análisis junto con el todo-*trans*-retinol, siendo la detección para el DL- $\alpha$ -tocoferol por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 292 nm y una longitud de onda de emisión de 330 nm, para una ganancia de 14. El volumen de inyección es 10  $\mu$ l y la fase móvil es una mezcla al 10% de tetrahidrofurano y 90% de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,800 ml/min. La temperatura de la columna es de 35 °C.

Las etapas principales del procedimiento analítico se presentan en la figura 30.

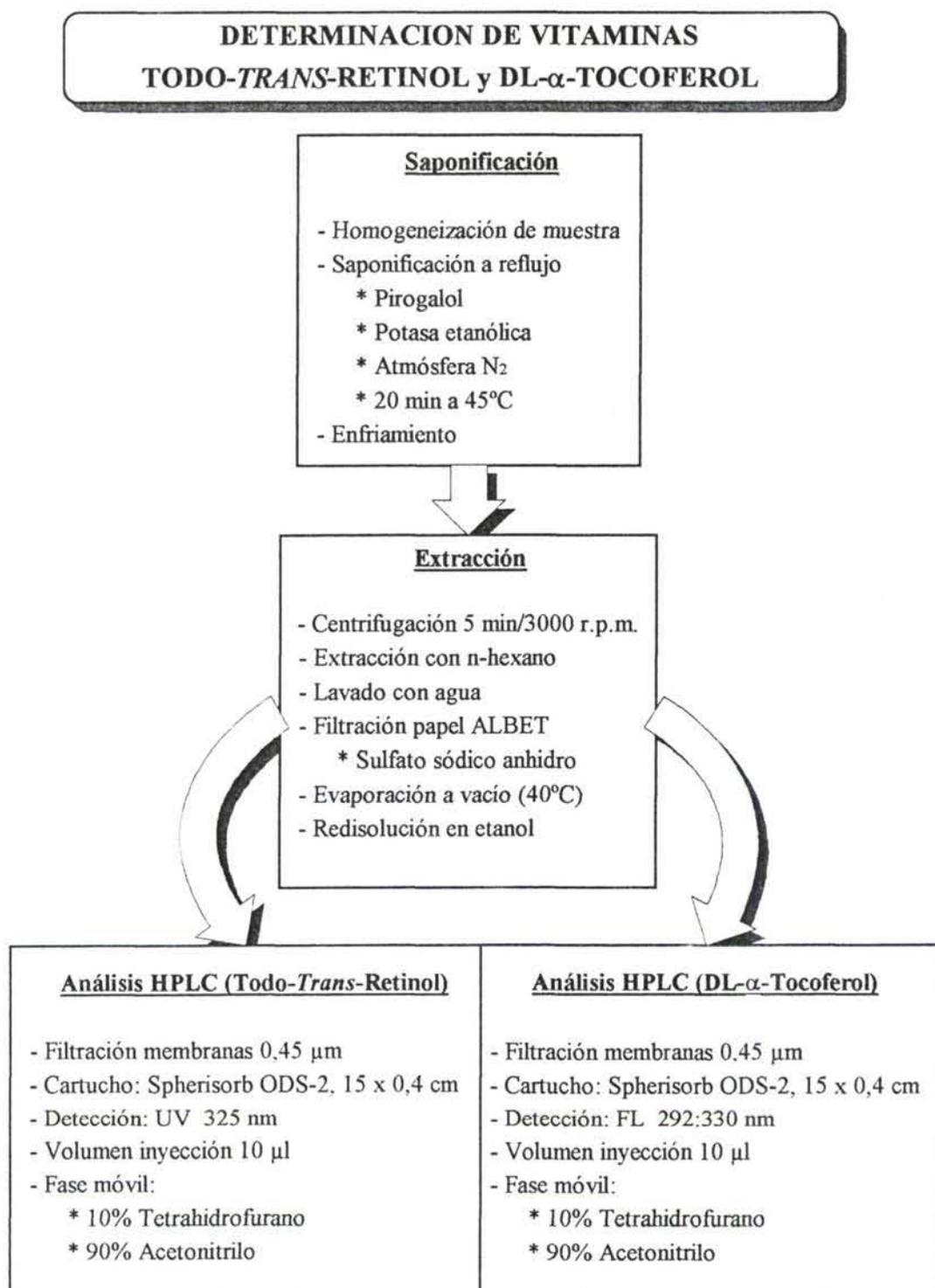


Fig. 30. Diagrama del procedimiento analítico para la determinación de TODO-TRANS-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

**5.B.2.2.2.5. Cálculos**

El contenido de DL- $\alpha$ -tocoferol presente en la muestra, expresado en miligramos por ciento, viene dado por la fórmula:

$$\text{mg DL-}\alpha\text{-Tocoferol/100 g} = \frac{0,1 \times Y \times f}{P}$$

Siendo:

Y =  $\mu\text{g}$  de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol leídos en la curva de calibración a partir del área cromatográfica

f = 0,911 (factor que permite transformar los  $\mu\text{g}$  de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol en  $\mu\text{g}$  de DL- $\alpha$ -tocoferol)

P = peso, en g, de la muestra inicial

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION**

## **6.A. EXPERIMENTOS METODOLOGICOS**

## **6.A.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES**

### **6.A.1.1 VITAMINA B<sub>1</sub>**

El procedimiento analítico descrito para la extracción de vitamina B<sub>1</sub> indicado en el apartado 5.B.2.1.1.4. se ha elaborado después de la realización de una serie de estudios basados en la bibliografía revisada que se exponen a continuación.

#### **6.A.1.1.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de tiocromo**

El objetivo ha sido preparar un método que permita la separación cromatográfica más adecuada para la vitamina B<sub>1</sub> en productos cárnicos cocidos con el mínimo tiempo, esfuerzo y coste. Revisada la bibliografía no se han encontrado métodos específicos para estos productos, por lo que aprovechando la experiencia de diferentes autores (tablas 10-12) se inicia el estudio empleando un método de separación en fase inversa, por ser el más utilizado.

Se ha seleccionado como columna un cartucho Spherisorb C<sub>8</sub> (5 µm, 25 x 0,4 cm DI). Se ha elegido este relleno por tratarse de micropartículas de sílice esféricas, totalmente porosas con una total ausencia de silanoles residuales para evitar su interacción con los compuestos a cromatografiar. A continuación, el primer paso ha sido determinar la composición óptima de la fase móvil. Inicialmente se han estudiado mezclas de acetonitrilo-agua (60:40 v/v) y mezclas de metanol-agua (70:30 v/v) en eluciones isocráticas, intentando simplificar los eluyentes que han empleado otros investigadores para productos que son diferentes. Se ha aplicado el ensayo a un patrón puro de tiamina de 2 µg que previamente ha sido oxidado a tiocromo según se describe en el apartado 5.B.2.1.1.4.

Observando los cromatogramas que se han obtenido en seis inyecciones efectuadas para cada uno de los casos estudiados, la mejor señal para la separación de tiocromo se ha logrado empleando como fase móvil la mezcla de

acetonitrilo-agua, aunque el compuesto eluye muy rápido, a un tiempo de retención de 2,262 min y el pico cromatográfico tiene poca intensidad. Por lo tanto, se ha decidido modificar la relación de la fase móvil a (30:70 v/v) y se ha estudiado la influencia del pH en la separación cromatográfica. Para ello, se ha tamponado la fase acuosa a pH 2,7 (Tampón fosfato 5mM), a pH 5,2 (Tampón fosfato 5mM) y a pH 7,0 (Tampón fosfato 5mM), estudiándose por separado las tres opciones en seis determinaciones respectivamente. Como se observa en las tablas (10-12) los autores no coinciden entre sí en los valores de pH utilizados, Ayi *et al.*, (1985) trabajaron a pH 7,7, Bettendorff *et al.*, (1986) a pH 8,5, Bötticher & Bötticher (1986) a pH 4,4. Debe considerarse que los métodos no son homólogos entre sí, cada uno está aplicado a un producto y a una columna determinada, obteniéndose buenos resultados en cada uno de los casos.

En este estudio concreto la mejor separación para el tiocromo se ha logrado utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-tampón fosfato 5 mM a pH 7,0 en una proporción de (30:70 v/v), operando con una velocidad de flujo de 0,650 ml/min a una temperatura de 35 °C. El tiempo de retención en estas condiciones para el tiocromo ha sido de 3,929 min. Incrementando la cantidad de acetonitrilo en la fase móvil el tiempo de retención disminuye. Fellman *et al.*, (1982), Dawson *et al.*, (1988) y Hägg & Kumpulainen (1993) han usado en la determinación simultánea de vitamina B<sub>1</sub> y vitamina B<sub>2</sub> una fase móvil de composición parecida formada por una mezcla de metanol-tampón fosfato (0,01 M; 0,02 M; 5 mM) a pH 7,0 pero trabajando con columnas C<sub>8</sub>-Radial-Pak, C<sub>10</sub> y  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>-Radial-Pak que son diferentes y aplicándolo a otras muestras, obteniendo también buenos resultados.

La mayor intensidad para la señal de tiocromo se ha alcanzado con el tampón fosfato a pH 7,0. Se confirma que la intensidad de fluorescencia del tiocromo es función del pH y alcanza un valor fijo para valores de pH superiores a 8,0 (Ishii *et al.*, 1979). Para valores de pH inferiores a 7,0 la intensidad de fluorescencia disminuye. Mediante el espectro de excitación y de emisión del tiocromo, se ha encontrado que los máximos corresponden en las condiciones de operación a una

longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 430 nm.

Este método se ha aplicado al patrón de tiamina obteniendo el cromatograma de la figura 31. Las condiciones cromatográficas permiten una buena separación de la tiamina con una señal simétrica y bien definida, habiéndose preparado un procedimiento adecuado para aplicación en productos cárnicos cocidos.

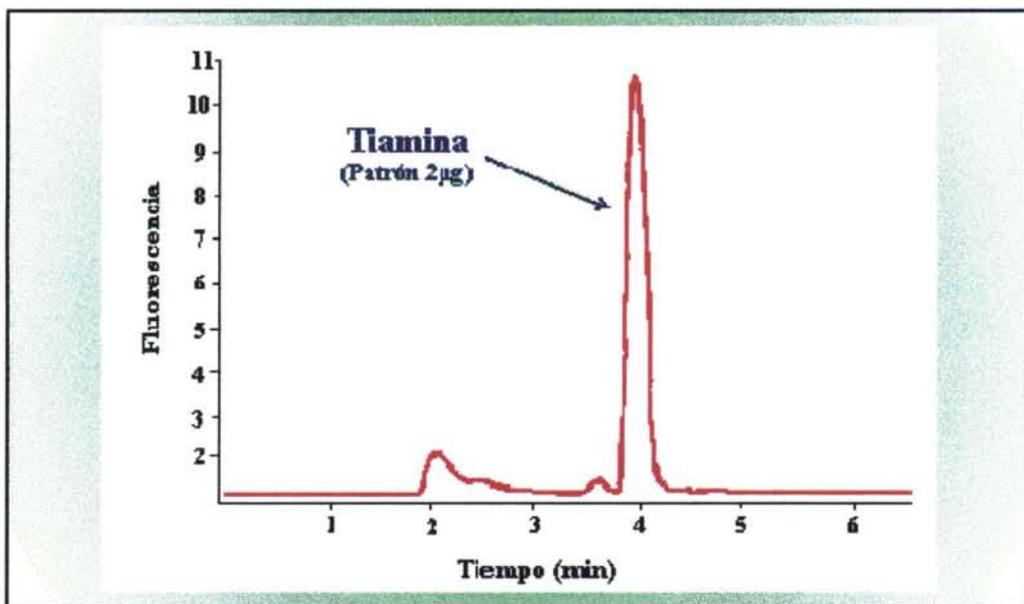


Fig. 31. Cromatograma de TIAMINA en Patrón (2 µg; 3,929 min)

#### **6.A.1.1.2. Estudio para la determinación cuantitativa de tiocromo por HPLC**

La conversión de tiamina en su derivado fluorescente, tiocromo, según el método de la AOAC, 1990 (Ref. 942.23) implica la oxidación del extracto de la muestra con ferricianuro alcalino, mezclando suavemente, y extrayendo el tiocromo resultante con un disolvente orgánico, alcohol isobutílico, midiendo posteriormente por fluorescencia la concentración de tiocromo.

Se ha experimentado este proceso con varios patrones de tiamina (2,5 y 5  $\mu\text{g}$ ). Puesto que los resultados son poco precisos se ha buscado otra alternativa que sustituya la extracción de tiocromo con alcohol isobutílico. En la bibliografía revisada se ha observado la propuesta de incorporar una etapa de purificación y concentración de tiocromo mediante extracción en fase sólida con cartuchos Sep-Pak (Fellman *et al.*, 1982; Hasselmann *et al.*, 1989; Ollilainen *et al.*, 1993). El proceso se ha ensayado con los anteriores patrones de tiamina, y las concentraciones finales de lavado y de elución de los cartuchos que se han usado se detallan en 5.B.2.1.1.4., siendo diferentes a las utilizadas por los autores anteriores, por permitir obtener mejor límite de detección (0,01 mg/100 g).

La tabla 40 presenta los datos obtenidos en el estudio. Como se observa, la operación en la que se produce y extrae el tiocromo, es menos reproducible si se utiliza el método de la AOAC. Sin embargo, la investigación realizada utilizando un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> para concentrar y purificar el tiocromo presente, eliminando la presencia del exceso de reactivo oxidante (ferricianuro potásico) en la fase móvil, mejora la sensibilidad, linealidad y precisión del método. Estos cartuchos se reutilizan durante diez veces sin cambio aparente en la capacidad de separación, lo que hace que la etapa de concentración sea relativamente económica.

TABLA 40. Determinación cuantitativa de TIOCROMO por HPLC

<b>Muestra</b> ( $\mu\text{g}$ )	<b>Método AOAC</b> $\bar{x}^a$ (n=10) $\pm$ SD	<b>Extracción Sep-Pak</b> $\bar{x}^a$ (n=10) $\pm$ SD
2,5	133,62 $\pm$ 5,773	184,53 $\pm$ 1,673
5,0	197,24 $\pm$ 8,834	357,42 $\pm$ 1,937

<sup>a</sup> Los datos representan las áreas cromatográficas obtenidas en el análisis por duplicado de las muestras

#### **6.A.1.1.3. Estudio para la optimización de la digestión enzimática en la extracción de tiamina a partir de productos cárnicos cocidos**

Basándose en la bibliografía y considerando la naturaleza proteica de las muestras se han ensayado tres enzimas diferentes en la búsqueda de la digestión enzimática adecuada para la extracción de tiamina en productos cárnicos cocidos, así como pruebas sin ningún tipo de tratamiento enzimático.

Se ha usado papaína (Difco N° 0253-17-5), pepsina (Merck N° 7190) y clara-diastasa (Fluka N° 27540) trabajando con diferentes concentraciones (3, 6 y 9%) y variando el tiempo de incubación (2, 3 y 4 h). Las determinaciones se han llevado a cabo con tres productos distintos (chopped beef, lunch y chopped de pavo). La tabla 41 detalla los datos óptimos obtenidos después de los varios tratamientos enzimáticos realizados en la extracción de tiamina. En la figura 32 se representan dichos resultados, los cuáles son constantes e independientes del producto utilizado. La concentración de enzima a emplear y el tiempo de incubación óptimos son un 6% (p/v) durante 3 h a una temperatura de 50 °C. Se

observan diferencias significativas, dependiendo del enzima usado (o de si no se ha empleado). Esto indica que la tiamina no se encuentra en la muestra en forma libre, sino combinada como complejo proteico o como éster del ácido pirofosfórico.

Observando los datos de la tabla adjunta se aprecia que la mayor cuantificación de tiamina en los productos analizados, se consigue utilizando el enzima clara-diastasa. Puesto que los valores obtenidos para ese caso, son los más altos, se han tomado como referencia y se ha supuesto que corresponden con el 100% de extracción de tiamina en el producto. Teniendo en cuenta esto, en el caso de emplear papaína los resultados son de  $34,7 \pm 0,7\%$ , en el caso de usar pepsina son  $47,6 \pm 1,3\%$  y cuando no hay tratamiento enzimático son  $41,5 \pm 0,6\%$ . Por lo tanto, se ha decidido el empleo de clara-diastasa, que al ser una mezcla de seis enzimas diferentes ( $\alpha$ -amilasa, celulasa, invertasa, peptidasa, fosfatasa y sulfatasa) permite liberar con más facilidad a la vitamina y lograr mejor detección de la misma. Este mismo enzima ha sido anteriormente utilizado con éxito por Hägg & Kumpulainen (1993) en cereales principalmente.

TABLA 41. Efecto de diversos tratamientos enzimáticos en la determinación de TIAMINA

Enzima <sup>b</sup>	Chopped beef		Lunch		Chopped pavo	
	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)
Papaína	0,054 ± 0,004	34,4	0,177 ± 0,018	35,5	0,014 ± 0,002	34,1
Pepsina	0,075 ± 0,005	47,8	0,231 ± 0,021	46,3	0,020 ± 0,003	48,8
Clara-Diastasa	0,157 ± 0,007	100,0	0,499 ± 0,030	100,0	0,041 ± 0,004	100,0
Ningún enzima	0,066 ± 0,004	42,0	0,204 ± 0,026	40,9	0,017 ± 0,002	41,5

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=6) ± SD por duplicado

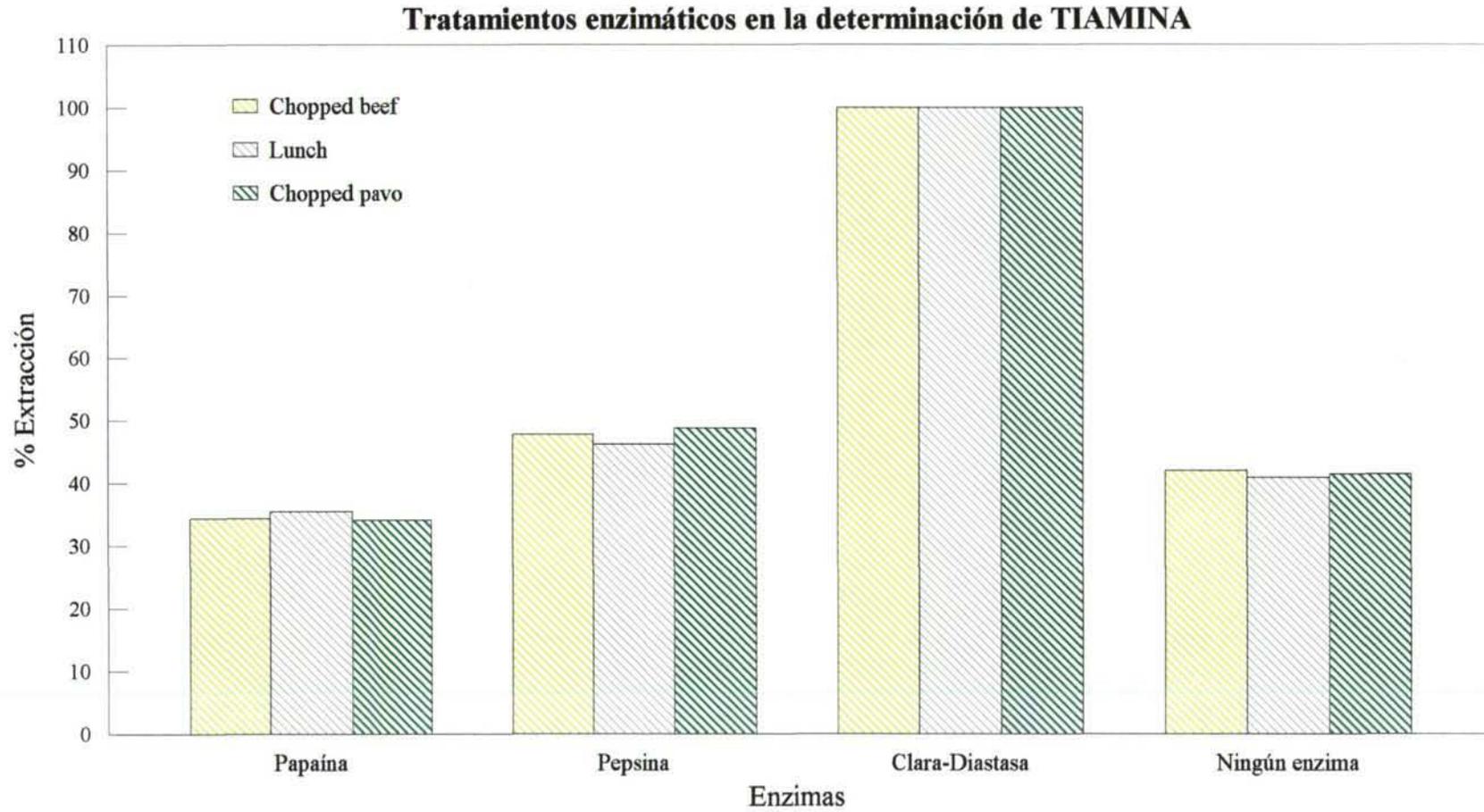


Fig. 32. Diagrama correspondiente al % de extracción de tiamina para los tratamientos enzimáticos aplicados a varios productos

#### 6.A.1.1.4. Determinación de los parámetros analíticos

Para comprobar la bondad de los métodos analíticos seleccionados se ha evaluado la precisión y la exactitud de cada uno de ellos.

#### PRECISION

La precisión se expresa como coeficiente de variación y representa el grado de dispersión entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a una muestra homogénea.

Para cada vitamina analizada se ha calculado la repetibilidad durante un día como el coeficiente de variación obtenido en el análisis de seis réplicas de una única muestra y la reproducibilidad durante tres meses como el coeficiente de variación obtenido en el análisis por duplicado de diez muestras diferentes de un mismo producto.

El estudio se ha ensayado con la muestra de lunch y los resultados se presentan en la tabla 42.

TABLA 42. Determinación de TIAMINA: Precisión

<b>Muestra</b>	<b>n</b>	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	<b>CV</b> (%)
Lunch <sup>a</sup>	1	0,455 ± 0,007	1,5
Lunch <sup>b</sup>	10	0,496 ± 0,026	5,2

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

Cuando se analizan muestras diferentes de un mismo producto a lo largo de un tiempo, el coeficiente de variación es más alto que si se trabaja con réplicas de una única muestra de dicho producto. Ello es debido a que la composición vitamínica de la materia prima varía según la especie animal y según la alimentación. Este comportamiento se ha observado para todas las vitaminas estudiadas.

### EXACTITUD

Se evalúa mediante ensayos de recuperación. Para cada vitamina analizada se han tomado doce alícuotas de una única muestra, adicionándose cantidades conocidas de dicha vitamina a seis de ellas. Todas las muestras se analizan siguiendo el correspondiente procedimiento analítico. El porcentaje de recuperación se calcula en todos los casos mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad hallada} - \text{Cantidad presente}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Los resultados de exactitud para tiamina se detallan en la tabla 43.

TABLA 43. Determinación de TIAMINA: Exactitud

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad presente (mg/100 g)</b>	<b>Cantidad adicionada (mg/100 g)</b>	<b>Cantidad hallada (mg/100 g)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
Lunch <sup>a</sup>	-		0,448	
	-		0,445	
	-		0,457	
	-		0,463	
	-		0,455	
	-		0,461	
$\bar{x} \pm SD$			0.455 ± 0,007	
	0,455	0,250	0,688	93,2
	0,455	0,250	0,685	92,0
	0,455	0,250	0,691	94,4
$\bar{x} \pm SD$			0,688 ± 0,003	
	0,455	0,500	0,924	93,8
	0,455	0,500	0,929	94,8
	0,455	0,500	0,926	94,2
$\bar{x} \pm SD$			0,926 ± 0,003	93,7 ± 1,0

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para la tiamina oscila entre 92,0-94,8% con un valor medio de 93,7%. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 1,5%.

**6.A.1.1.5. Sistema de calibración y ensayo**

La cuantificación de las vitaminas se ha realizado mediante estandarización externa. Las concentraciones de los diversos patrones que se han preparado en cada caso se representan frente a las áreas cromatográficas que se han obtenido por HPLC para cada una de esas señales; construyendo así las correspondientes curvas de calibración. La reproducibilidad de la regresión se ha ensayado para cada vitamina seis veces durante un período de tres meses, detallándose el coeficiente de variación obtenido para la pendiente.

La tabla 44 contiene los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de tiamina detalladas en 5.B.2.1.1.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.1.1.4.

TABLA 44. Datos de calibración para TIAMINA

<b>Tiempo de retención</b> (min)	<b>Contenido vitamina</b> ( $\mu\text{g}$ )	<b>Area cromatográfica</b> $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
3,928	0,5	32,90 $\pm$ 0,569
3,931	1	68,11 $\pm$ 0,369
3,929	2	139,83 $\pm$ 2,238
3,933	2,5	187,87 $\pm$ 1,988
3,940	5	359,46 $\pm$ 2,247
3,932	7,5	562,05 $\pm$ 5,465

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 33. Es una línea recta en el margen de trabajo de 0,5-7,5  $\mu\text{g}$  y cubre en el alimento un rango de 0,050-0,750 (mg/100 g). El coeficiente de variación para la pendiente es 13,9% por lo

que cada día deben analizarse los correspondientes patrones. El límite de detección corresponde a 0,010 (mg/100 g).

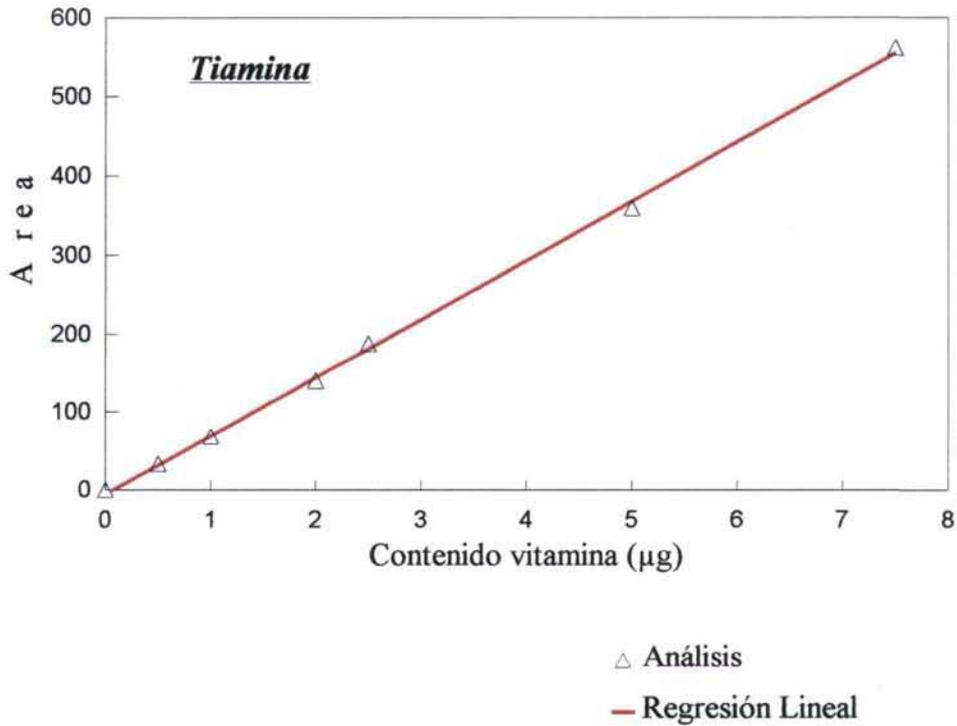


Fig. 33. Curva de calibración para TIAMINA

El resultado de la regresión se expone en la tabla 45.

TABLA 45. Regresión lineal TIAMINA = - 4,654 + 74,746 x

#### RESULTADO REGRESION TIAMINA

Constante	- 4,654
Coefficiente X	74,746
Coef. correlación lineal (r)	0,9996

El valor de (r) obtenido indica una buena correlación entre las variables. Parámetro que se ha mantenido en las diversas calibraciones realizadas.

#### **6.A.1.1.6. Cromatogramas de tiamina en productos cárnicos cocidos**

Puesto a punto el método que permite la determinación de vitamina B<sub>1</sub>, se aplica a las muestras objeto del estudio, obteniendo los cromatogramas de las figuras (34-39). Las interferencias lógicamente son más acentuadas en las muestras que en el patrón, no afectando a la señal de la vitamina, por lo que no se ha realizado ninguna investigación posterior. La identificación del pico se ha basado en el tiempo de retención, siendo el coeficiente de variación del mismo de 1,6%.

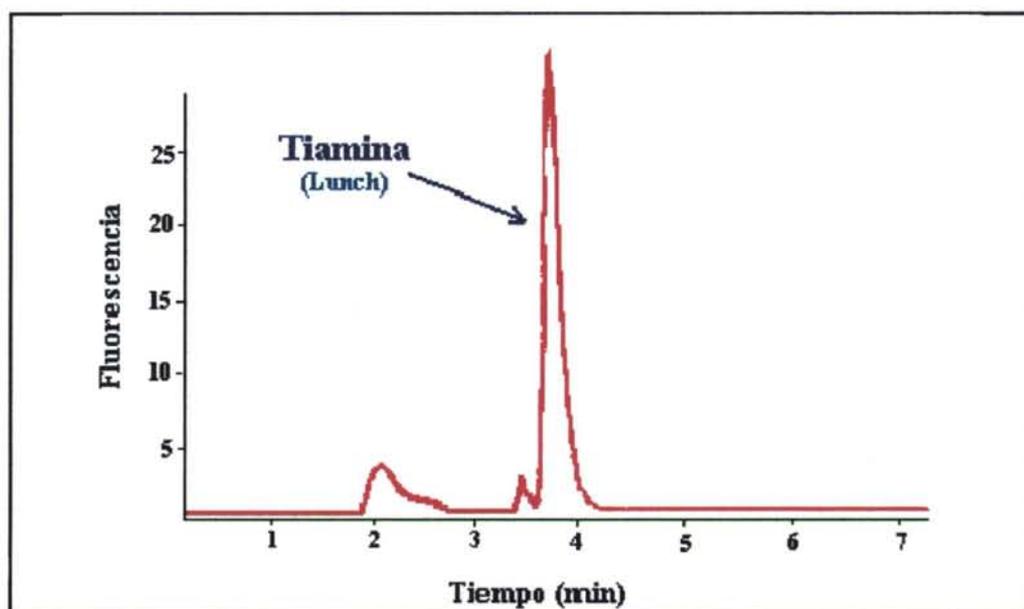


Fig. 34. Cromatograma de TIAMINA en Lunch (0,503 mg/100 g; 3,771 min)

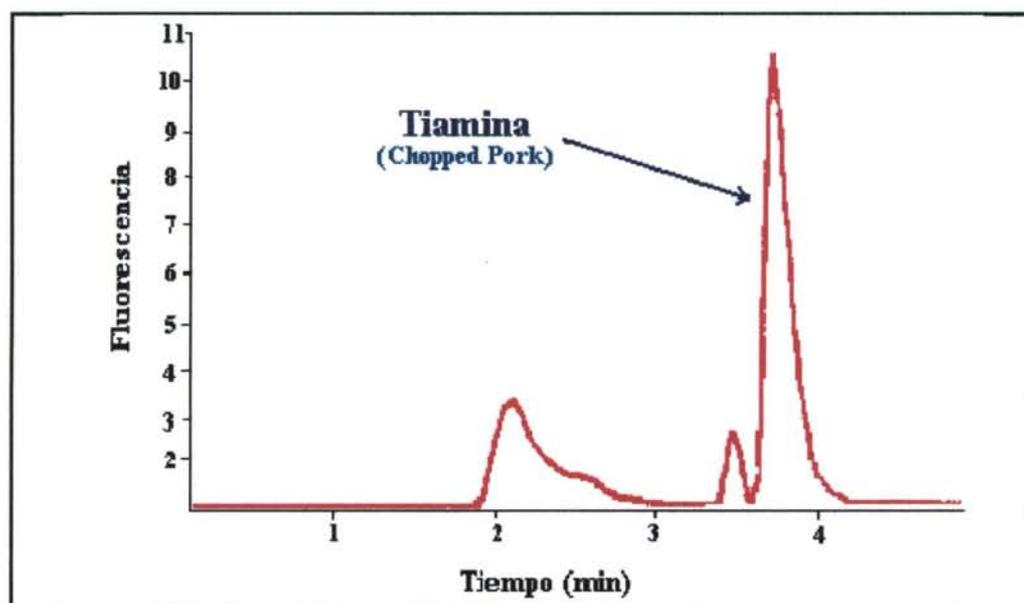


Fig. 35. Cromatograma de TIAMINA en Chopped pork (0,165 mg/100 g; 3,775 min)

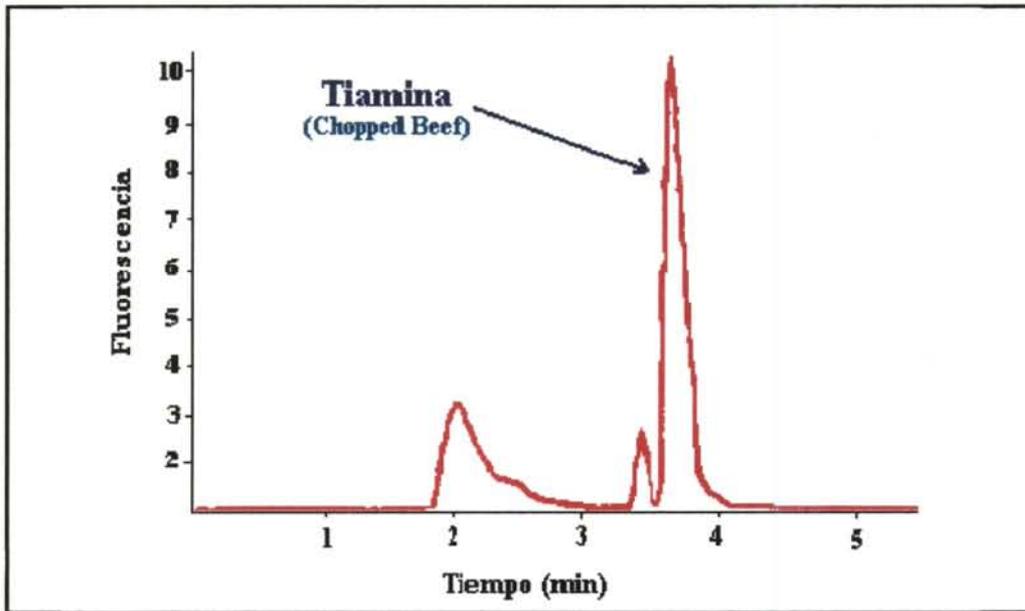


Fig. 36. Cromatograma de TIAMINA en Chopped beef (0,145 mg/100 g; 3,768 min)

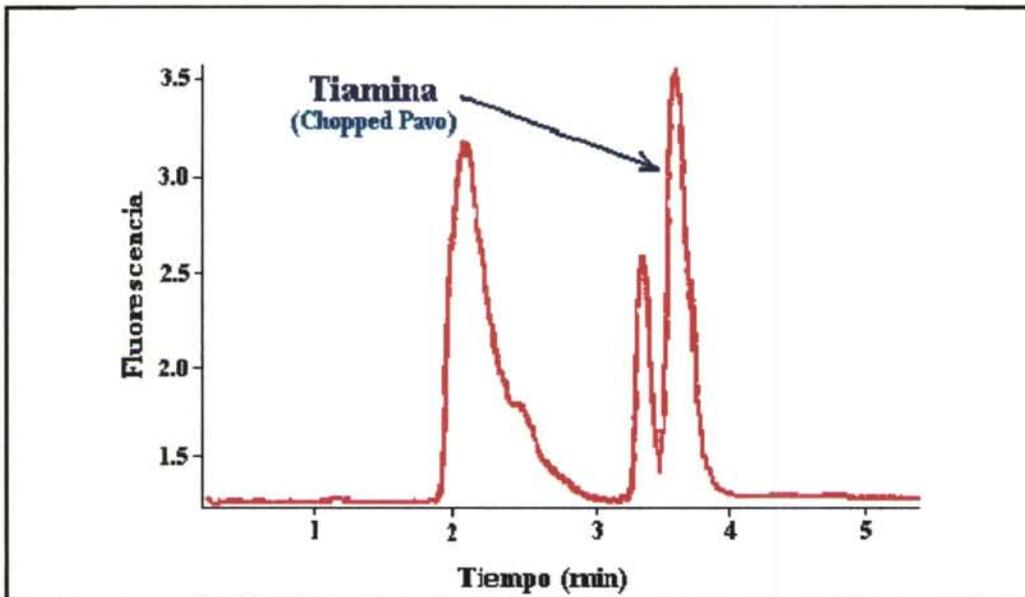


Fig. 37. Cromatograma de TIAMINA en Chopped pavo (0,041 mg/100 g; 3,786 min)

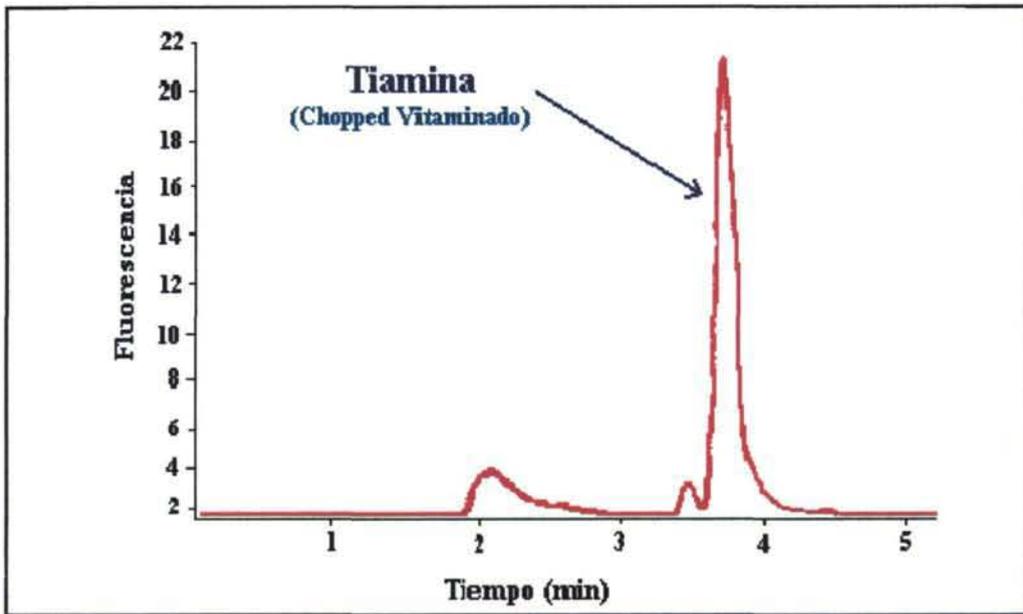


Fig. 38. Cromatograma de TIAMINA en Chopped vitaminado (0,413 mg/100 g; 3,784 min)

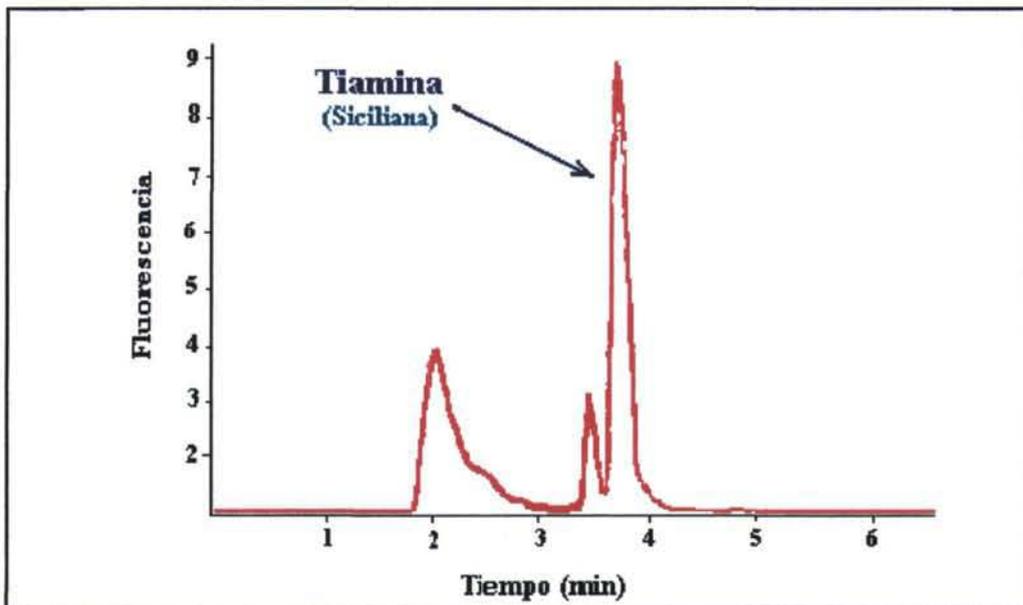


Fig. 39. Cromatograma de TIAMINA en Mortadela siciliana (0,139 mg/100 g; 3,755 min)

## 6.A.1.2. VITAMINA B<sub>2</sub>

### 6.A.1.2.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de riboflavina

Revisada la bibliografía no se hallan métodos específicos para la separación cromatográfica óptima de la vitamina B<sub>2</sub> en productos cárnicos cocidos, por ello se ha iniciado el estudio intentando preparar un método de separación en fase inversa, por observarse que es muy utilizado (tablas 13-15).

Se dispone de dos columnas adecuadas que se han seleccionado para el ensayo, un cartucho Spherisorb ODS-2 (5 μm, 25 x 0,4 cm DI) y una columna LiChrospher RP-18 (5 μm, 25 x 0,4 cm DI). Ambas presentan un relleno esférico, y difieren fundamentalmente en la carga de carbono, 12 y 21,5% respectivamente. Se ha intentado determinar la composición óptima de la fase móvil, estudiando mezclas de acetonitrilo-agua (40:60 v/v) y mezclas de metanol-agua (50:50 v/v) en eluciones isocráticas; aplicando el ensayo a un patrón puro de riboflavina de 20 μg.

Observando los cromatogramas obtenidos en seis inyecciones efectuadas para cada uno de los casos estudiados, se obtiene mejor separación para la riboflavina, cuando se trabaja con el cartucho Spherisorb ODS-2 empleando como fase móvil la mezcla de acetonitrilo-agua. La vitamina eluye a un tiempo de 3,164 min quedando la señal unida a la de los interferentes, por lo que se ha modificado la relación de la fase móvil a (25:75 v/v) y la naturaleza de la misma cambiando el pH de la fase acuosa a 2,7 (Acido ortofosfórico 85%), puesto que los bajos pH permiten mejor separación en fase inversa. Finalizado este estudio con objeto de mejorar la separación obtenida se ha adicionado a la fase acuosa un reactivo de intercambio iónico, el ácido 1-heptanosulfónico a una concentración de 5 mM (Watada & Tran, 1985 y Reyes *et al.*, 1988).

Combinando estas variables se ha conseguido separar la riboflavina de las moléculas interferentes empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-

reactivo de par-iónico 5 mM a pH 2,7 en una proporción de (25:75 v/v), operando con una velocidad de flujo de 0,600 ml/min a una temperatura de 35 °C. El tiempo de retención en estas condiciones para la riboflavina ha sido de 4,032 min. Incrementando la cantidad de acetonitrilo en la fase móvil el tiempo de retención disminuye. Watada & Tran (1985), Reyes *et al.*, (1988) y Vidal-Valverde & Reche (1990b) han utilizado también con buenos resultados métodos de separación en fase inversa de pares iónicos empleando el ácido heptanosulfónico o su sal, aplicándolos en otras columnas y alimentos.

Se ha trabajado con un detector de fluorescencia puesto que permite obtener una respuesta diez veces mayor a la que resulta si esa misma muestra se analiza con un detector de matriz de fotodiodos (DAD). A pesar de que la riboflavina se caracteriza por tener fluorescencia con longitud de onda de excitación en el intervalo 440-500 nm y longitud de onda de emisión a 525 nm, en las condiciones de operación se ha encontrado que los máximos corresponden a una excitación de 227 nm y a una emisión de 520 nm. Conviene recordar que la riboflavina presenta espectros de absorción con máximos a varias longitudes de onda (223, 268, 359-375, 446 y 475 nm), dependiendo del valor de pH.

Este método se ha aplicado con éxito al patrón de riboflavina obteniendo el cromatograma de la figura 40.

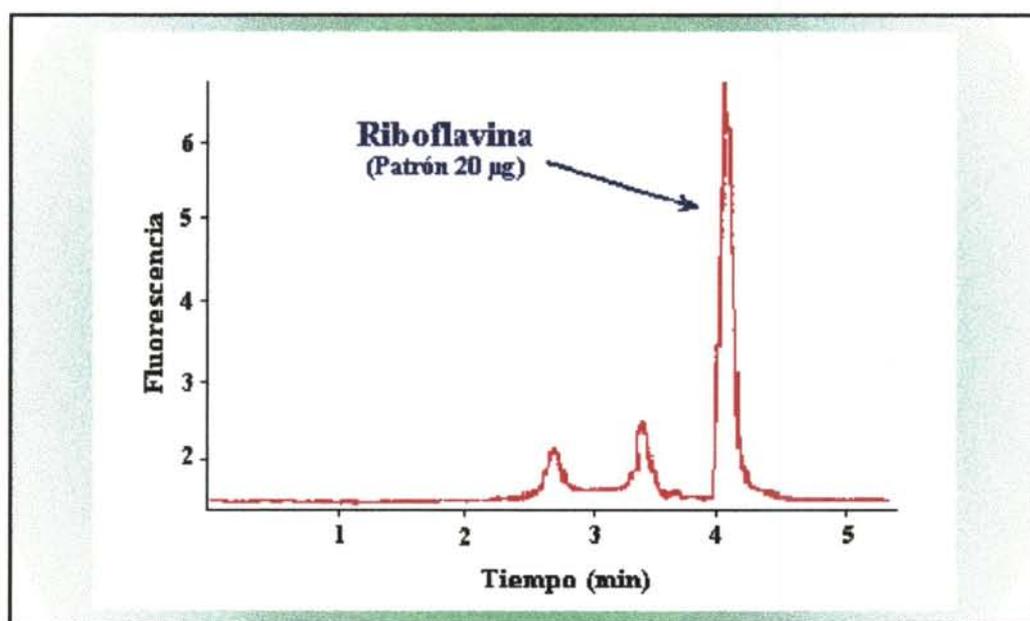


Fig. 40. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Patrón (20 µg; 4,032 min)

#### **6.A.1.2.2. Estudio para la optimización de la digestión enzimática en la extracción de riboflavina a partir de productos cárnicos cocidos**

En la determinación analítica de riboflavina se ha seguido el mismo estudio enzimático realizado para la tiamina. La tabla 46 presenta los datos óptimos obtenidos después de los varios tratamientos enzimáticos ensayados, representándose en la figura 41. Son valores constantes e independientes del producto empleado. Se hallan diferencias significativas, dependiendo del enzima usado (o de si no se ha utilizado). Esto indica que la riboflavina en la muestra no se encuentra en forma libre.

Observando los resultados se ha apreciado que la mayor cuantificación de riboflavina en los productos analizados, se consigue utilizando el enzima clara-diastasa. Por obtenerse para ese caso los valores más altos, se han tomado como referencia y se ha supuesto que corresponden con el 100% de extracción de riboflavina en el producto. Considerando esto, en el caso de emplear papaína los resultados son de  $53,8 \pm 1,7\%$ , en el caso de usar pepsina son  $41,0 \pm 1,9\%$  y cuando no hay tratamiento enzimático son  $26,8 \pm 0,9\%$ ; por lo que se utiliza clara-diastasa para la liberación de la riboflavina de su combinación proteica.

A la vista de las tablas 41 y 46 se desprende que independientemente del producto empleado, ambas vitaminas presentan un comportamiento diferente para un mismo enzima, lo que se representa en la figura 42.

TABLA 46. Efecto de diversos tratamientos enzimáticos en la determinación de RIBOFLAVINA

Enzima <sup>b</sup>	Chopped beef		Lunch		Chopped pavo	
	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)	(mg/100 g) <sup>a</sup>	Extracción (%)
Papaína	0,082 ± 0,003	53,9	0,103 ± 0,005	55,4	0,089 ± 0,002	52,0
Pepsina	0,062 ± 0,001	40,8	0,080 ± 0,003	43,0	0,067 ± 0,003	39,2
Clara-Diastasa	0,152 ± 0,005	100,0	0,186 ± 0,009	100,0	0,171 ± 0,005	100,0
Ningún enzima	0,042 ± 0,002	27,6	0,048 ± 0,002	25,8	0,046 ± 0,002	26,9

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=6) ± SD por duplicado

<sup>b</sup> Tratamiento enzimático (6 %, 3 h a 50 °C)

### Tratamientos enzimáticos en la determinación de RIBOFLAVINA

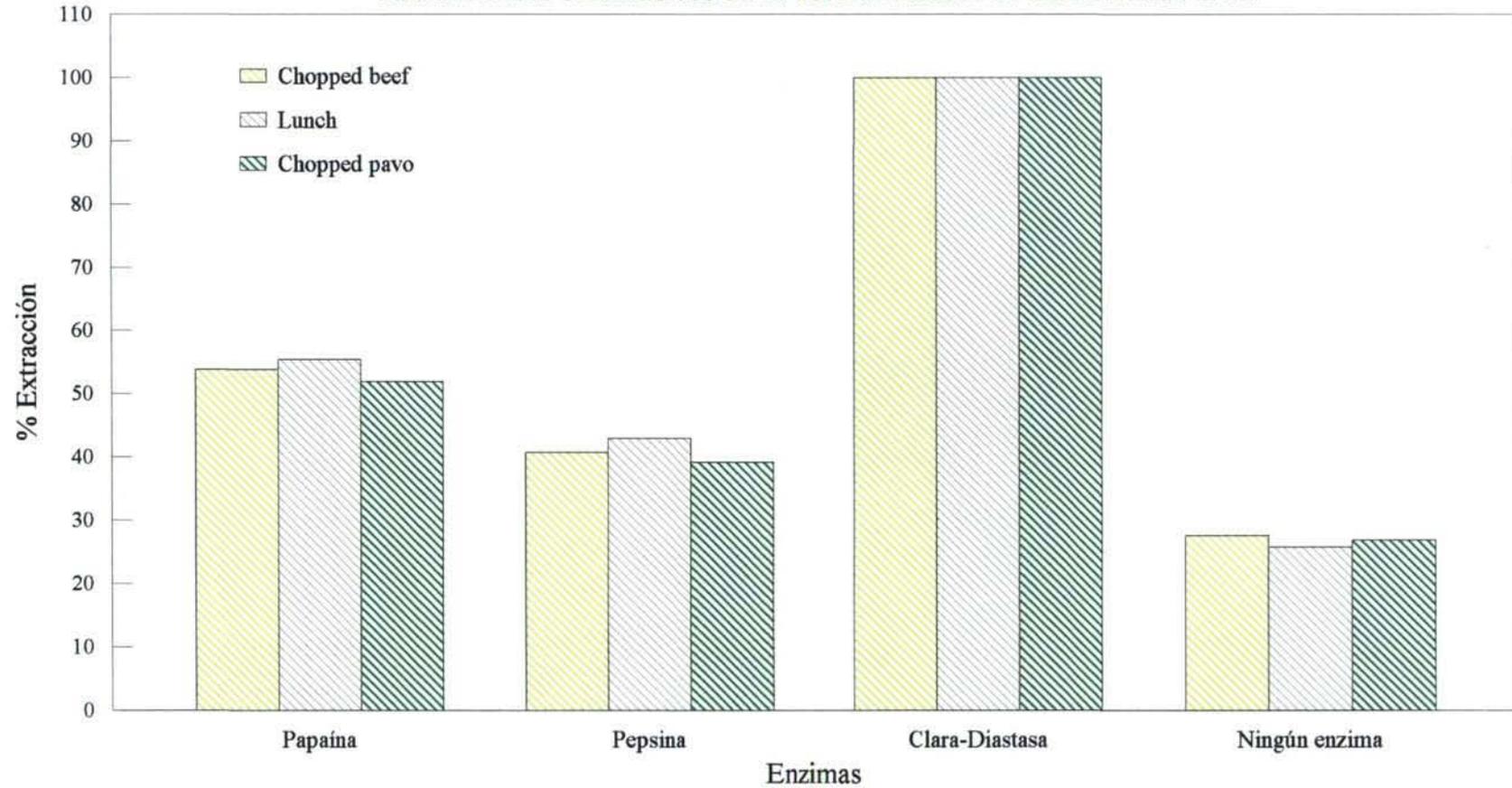


Fig. 41. Diagrama correspondiente al % de extracción de riboflavina para los tratamientos enzimáticos aplicados a varios productos

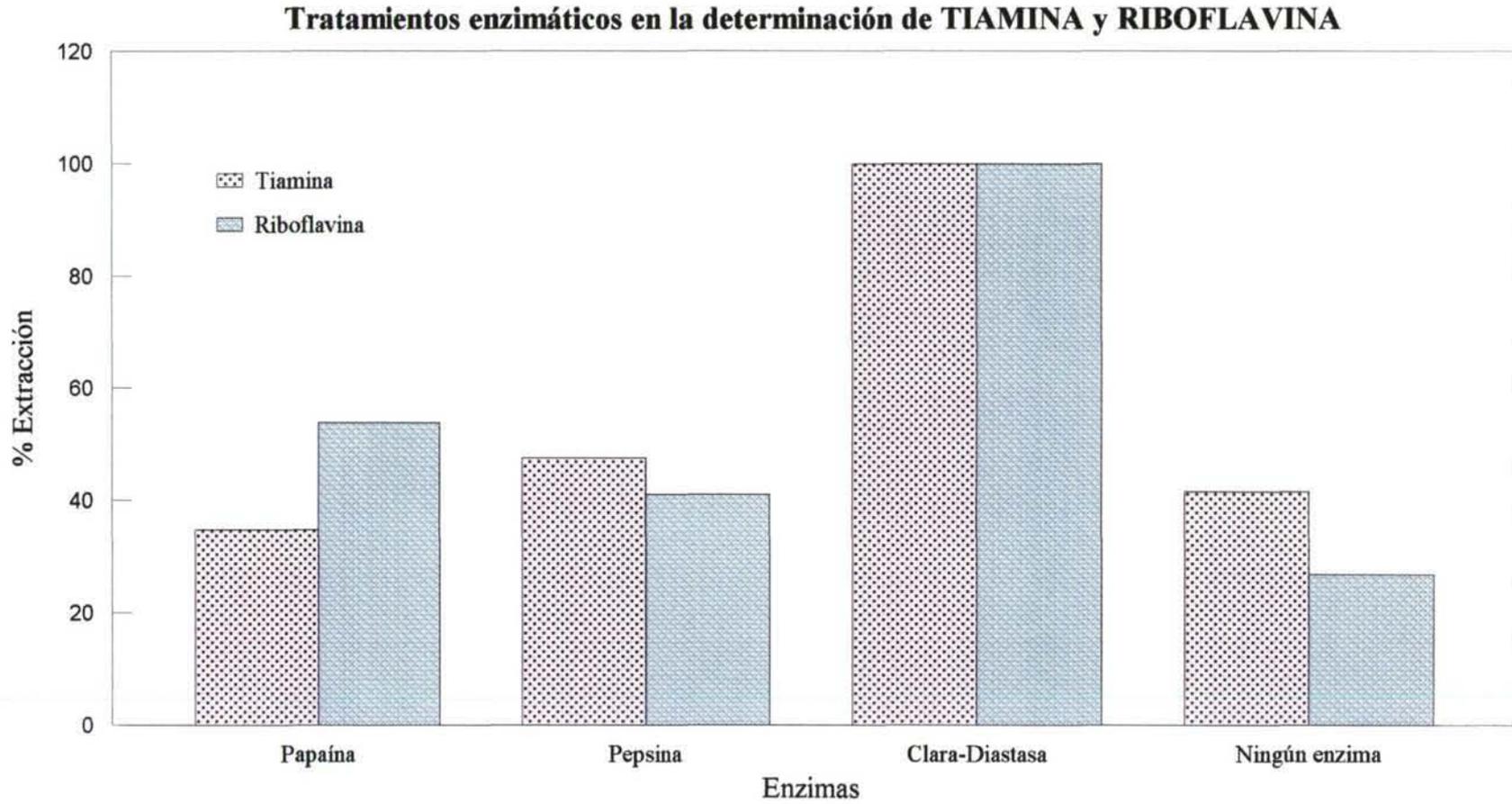


Fig. 42. Diagrama correspondiente al % de extracción media de tiamina y riboflavina para los diferentes tratamientos enzimáticos aplicados

#### **6.A.1.2.3. Estudio sobre el efecto del proceso de oxidación en la extracción de riboflavina a partir de productos cárnicos cocidos**

Se han efectuado diversas pruebas para la determinación de riboflavina en el extracto obtenido después de la hidrólisis ácida y enzimática. El método oficial de la AOAC, 1990 (Ref. 970.65) mide la fluorescencia emitida por la riboflavina en un fluorímetro después de oxidar la materia orgánica presente en el extracto con permanganato potásico al 4% en medio ácido con ácido acético glacial y eliminar los restos del agente oxidante con agua oxigenada al 3%.

Buscando la optimización del método se han realizado determinaciones analíticas con dos productos diferentes (mortadela siciliana y chopped vitaminado) inyectándolos en el sistema cromatográfico con y sin la anterior etapa de oxidación.

La tabla 47 presenta los datos obtenidos en dicho estudio. Los resultados si no hay tratamiento por oxidación son  $7,5 \pm 0,1\%$  superiores, lo que indica la influencia negativa que este proceso ejerce sobre la vitamina B<sub>2</sub>. Como se detalló en el apartado 3.B.1.2. el permanganato potásico tiene una acción destructiva sobre la riboflavina, que es menos intensa si el pH del medio es aproximadamente 4,5.

TABLA 47. Efecto del proceso de oxidación en la determinación de RIBOFLAVINA

Muestra	Proceso Oxidación <sup>b</sup>		Variación (%)
	SI (mg/100 g) <sup>a</sup>	NO (mg/100 g) <sup>a</sup>	
Mortadela siciliana	0,109 ± 0,003	0,118 ± 0,005	7,6
Chopped vitaminado	0,615 ± 0,023	0,664 ± 0,027	7,4

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=10) ± SD por duplicado

<sup>b</sup> Proceso oxidación de la AOAC, 1990 (Ref. 970.65)

#### 6.A.1.2.4. Determinación de los parámetros analíticos

##### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de chopped pork y los resultados se presentan en la tabla 48.

TABLA 48. Determinación de RIBOFLAVINA: Precisión

Muestra	n	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	CV (%)
Chopped pork <sup>a</sup>	1	0,157 ± 0,002	1,3
Chopped pork <sup>b</sup>	10	0,156 ± 0,004	2,6

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

EXACTITUD

Los resultados de exactitud para riboflavina se detallan en la tabla 49.

TABLA 49. Determinación de RIBOFLAVINA: Exactitud

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad presente (mg/100 g)</b>	<b>Cantidad adicionada (mg/100 g)</b>	<b>Cantidad hallada (mg/100 g)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
Chopped pork <sup>a</sup>				
	-		0,156	
	-		0,160	
	-		0,154	
	-		0,156	
	-		0,158	
	-		0,160	
$\bar{x} \pm SD$			0,157 ± 0,002	
	0,157	0,100	0,253	96,0
	0,157	0,100	0,254	97,0
	0,157	0,100	0,254	97,0
$\bar{x} \pm SD$			0,253 ± 0,003	
	0,157	0,200	0,350	96,5
	0,157	0,200	0,351	97,0
	0,157	0,200	0,352	97,5
$\bar{x} \pm SD$			0,351 ± 0,001	96,8 ± 0,5

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

Se ha obtenido una alta recuperación para la riboflavina, oscilando entre 96,0-97,5% con un valor medio de 96,8%. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 0,5%.

#### 6.A.1.2.5. Sistema de calibración y ensayo

La tabla 50 contiene los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de riboflavina detalladas en 5.B.2.1.2.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.1.2.4.

TABLA 50. Datos de calibración para RIBOFLAVINA

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
4,037	10	18,07 $\pm$ 0,518
4,032	20	36,13 $\pm$ 0,448
4,039	40	73,07 $\pm$ 0,764
4,043	80	136,41 $\pm$ 1,188
4,035	100	178,70 $\pm$ 2,124

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 43. Es una línea recta en el margen de trabajo de 10-100  $\mu\text{g}$  y cubre en el alimento un rango de 0,100-1,000 (mg/100 g). El coeficiente de variación para la pendiente es 12,9%, un valor alto como en el caso de la tiamina, por lo que es conveniente preparar la

curva de calibración en el momento de análisis. El límite de detección corresponde a 0,010 (mg/100 g).

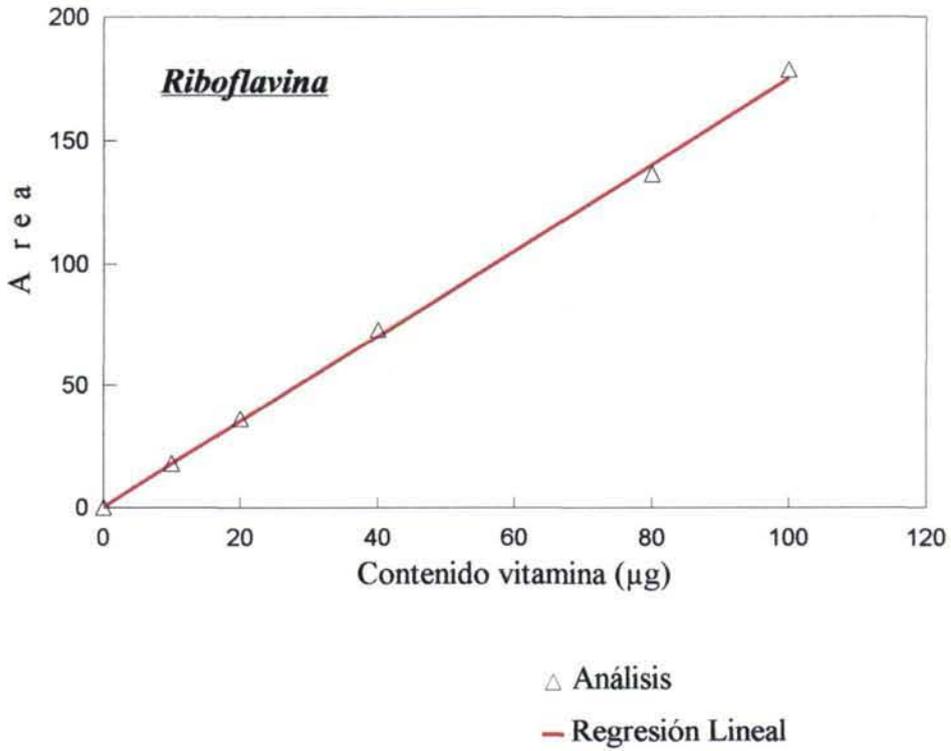


Fig. 43. Curva de calibración para RIBOFLAVINA

El resultado de la regresión se expone en la tabla 51.

TABLA 51. Regresión lineal RIBOFLAVINA = 0,656 + 1,754 x

**RESULTADO REGRESION RIBOFLAVINA**

Constante	0,656
Coefficiente X	1,754
Coef. correlación lineal (r)	0,9993

#### **6.A.1.2.6. Cromatogramas de riboflavina en productos cárnicos cocidos**

Puesto a punto el método para la determinación de vitamina B<sub>2</sub>, se aplica a los productos estudiados, obteniendo los cromatogramas de las figuras (44-49). En las condiciones cromatográficas fijadas se logra una buena separación de riboflavina. Las interferencias no afectan a la señal de interés, la cuál presenta una buena simetría y definición. El pico se ha identificado mediante el tiempo de retención, que presenta un coeficiente de variación de 0,2%, lo que indica una alta reproducibilidad.

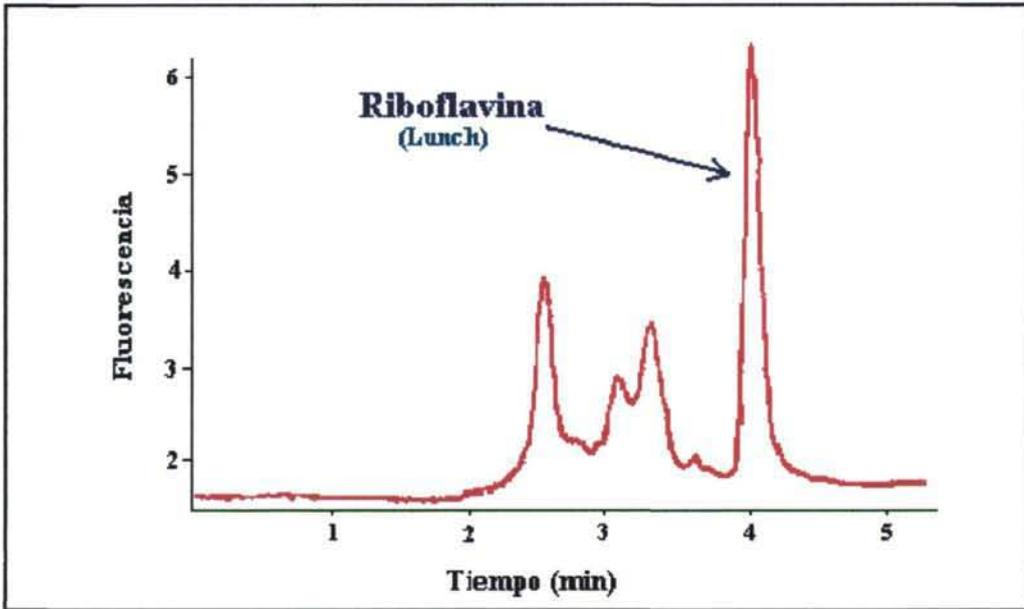


Fig. 44. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Lunch (0,187 mg/100 g; 4,042 min)

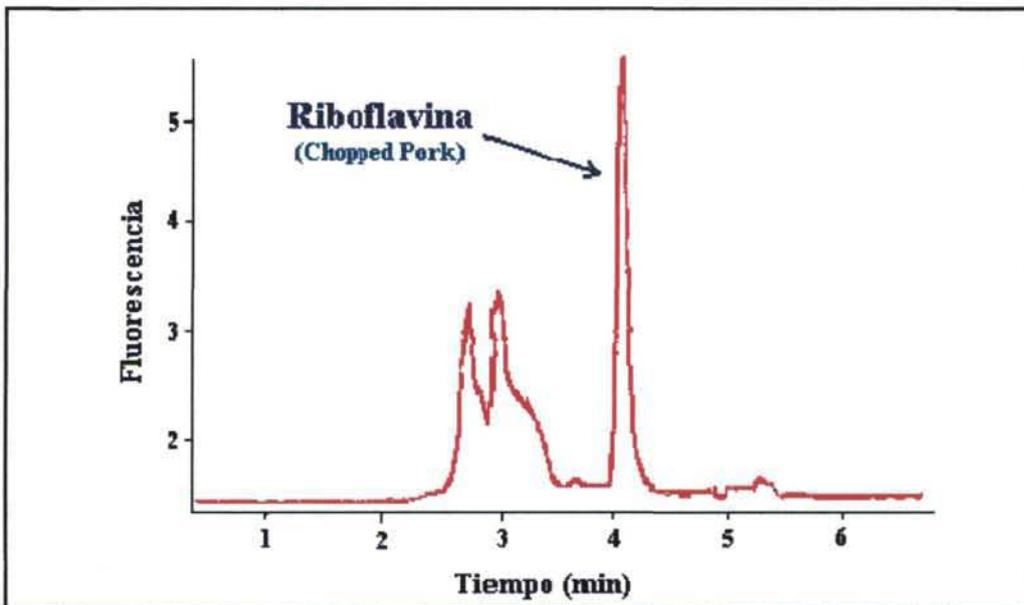


Fig. 45. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped pork (0,148 mg/100 g; 4,054 min)

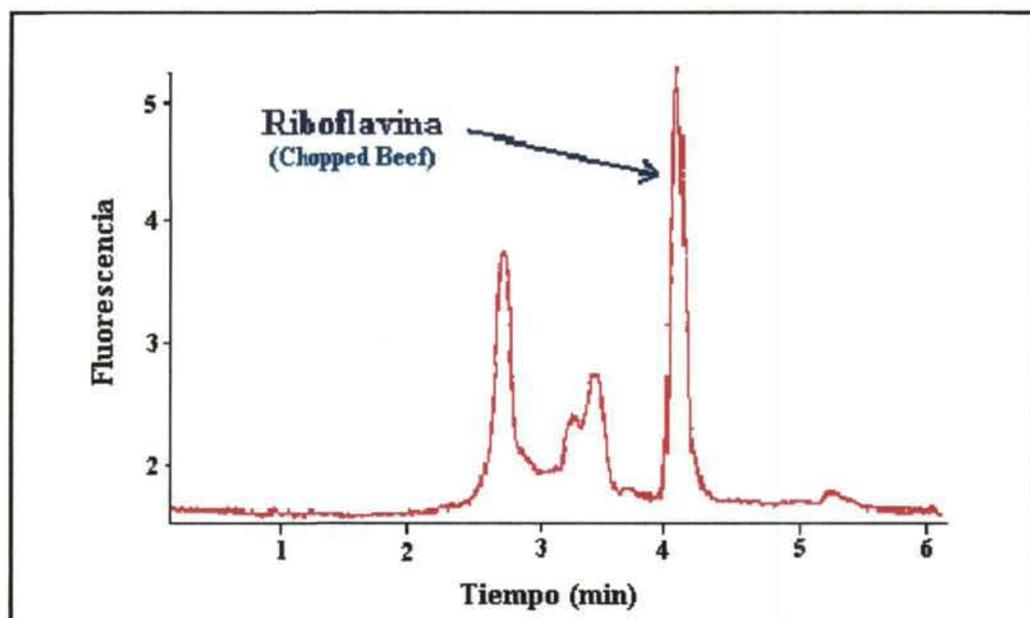


Fig. 46. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped beef (0,152 mg/100 g; 4,039 min)

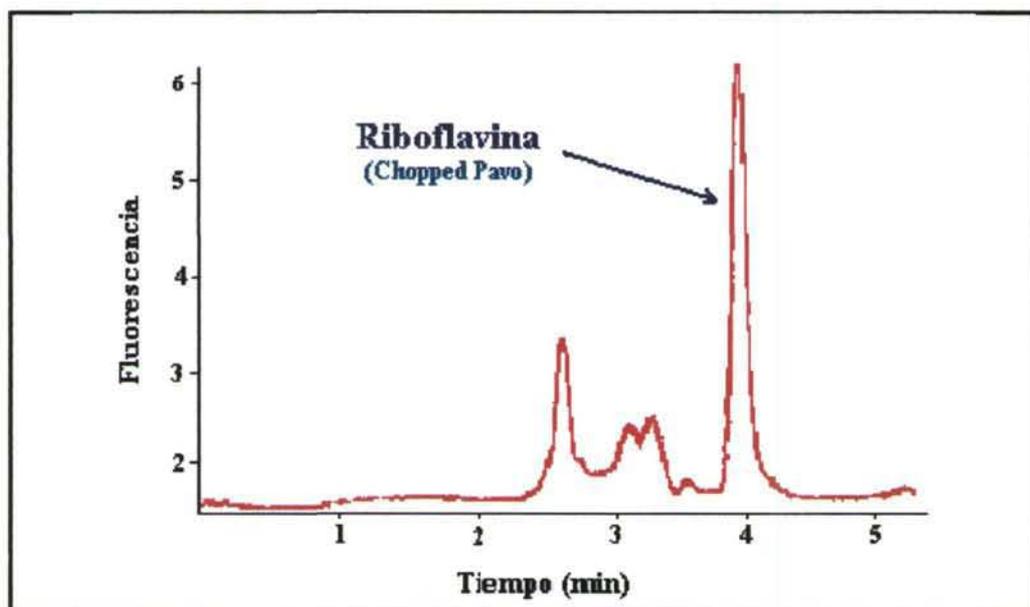


Fig. 47. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped pavo (0,173 mg/100 g; 4,032 min)

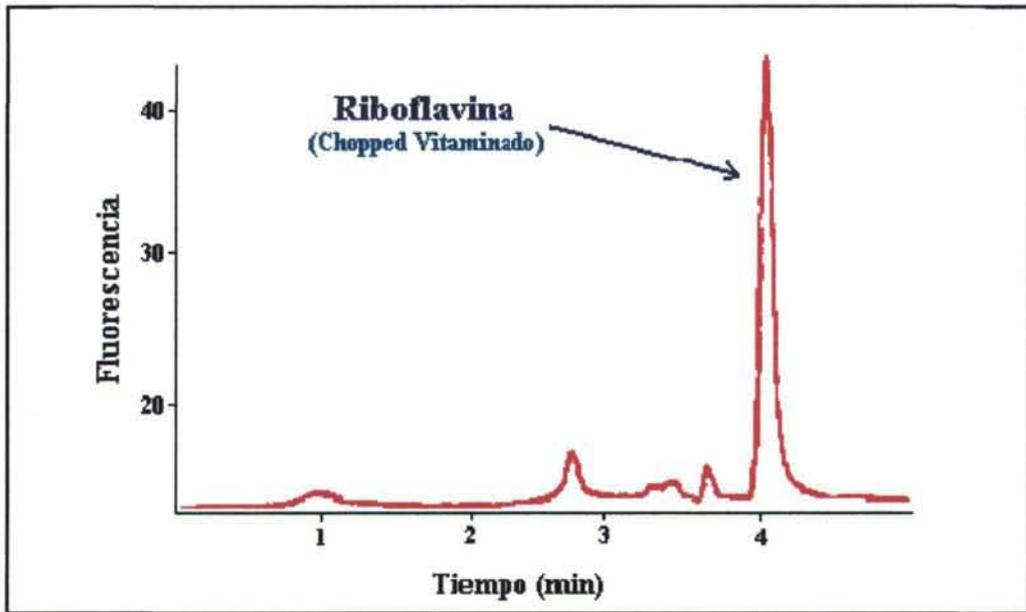


Fig. 48. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Chopped vitaminado (0,637 mg/100g; 4,036 min)

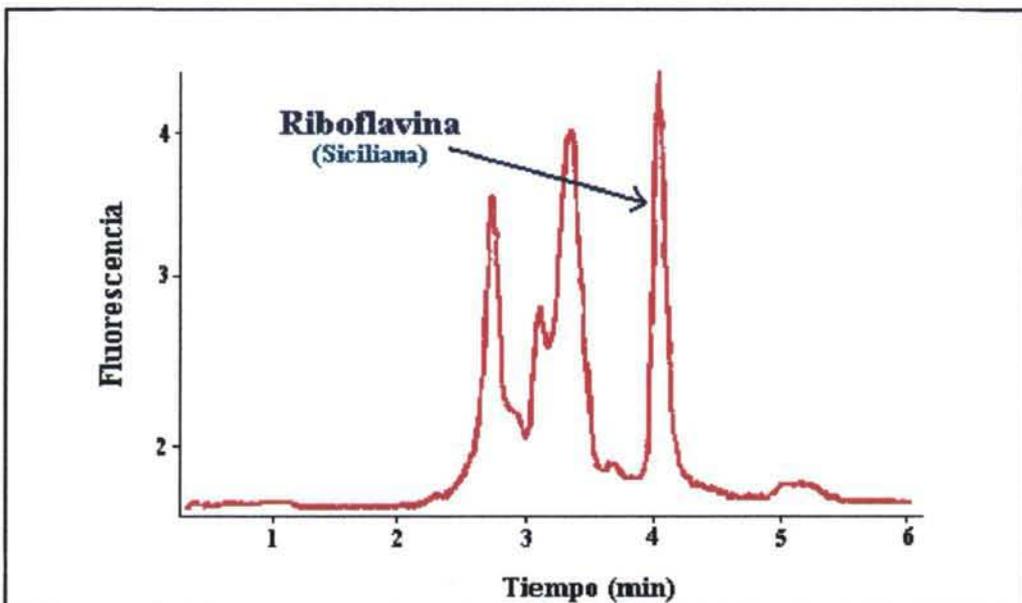


Fig. 49. Cromatograma de RIBOFLAVINA en Mortadela siciliana (0,116 mg/100 g; 4,046 min)

### 6.A.1.3. NIACINA

#### 6.A.1.3.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de ácido nicotínico y de nicotinamida

Revisada la bibliografía se observa que la separación cromatográfica más utilizada para el ácido nicotínico y la nicotinamida es mediante fase inversa de pares iónicos, habiéndose observado que sin la utilización del reactivo de intercambio iónico, ambas vitaminas eluyen demasiado rápidamente como para separarse entre sí.

Se ha elegido como columna un cartucho Spherisorb ODS-2 (5  $\mu\text{m}$ , 25 x 0,4 cm DI) anteriormente empleado para la determinación de ácido nicotínico en muestras de café (Trugo *et al.*, 1985). Presenta un relleno de micropartículas de sílice esféricas, totalmente porosas con un bajo nivel de silanoles residuales y ha dado un buen resultado en la determinación de riboflavina con un método cromatográfico similar. A continuación, se ha seleccionado un contraión adecuado. Varios autores (Toma & Tabekhia, 1979; Skurray, 1981; Sakai *et al.*, 1985; Takatsuki *et al.*, 1987; Gigliotti & Daghetta, 1993) han empleado sales del ácido sulfónico, eligiéndose para el estudio el ácido 1-heptanosulfónico que se ha adicionado a la fase acuosa a una concentración de 5 mM (Skurray, 1981).

Dada la naturaleza anfótera de la niacina, la simetría y el tiempo de retención para la señal cromatográfica de la vitamina son extremadamente sensibles al pH de la fase móvil (McKee *et al.*, 1982) y a la temperatura de la columna. Considerando esta notación se ha buscado la composición óptima de la fase móvil. Se han ensayado mezclas de acetonitrilo-agua (40:60 v/v) en eluciones isocráticas con valores de pH para la fase acuosa que contiene al reactivo par-iónico de 3,3 (Acido ortofosfórico 85%), 5,0 (Tampón fosfato 5 mM) y 7,0 (Tampón fosfato 5 mM), aplicando el ensayo a un patrón puro de ácido nicotínico y de nicotinamida de 100  $\mu\text{g}$ . Los valores de pH utilizados varían entre autores (tablas 20-22), Takatsuki *et al.*, (1987) emplearon pH 3,5 cuando la fase acuosa contenía heptanosulfónico para la determinación de nicotinamida y pH

7,5 si contenía iones de tetrabutylamonio para la determinación de ácido nicotínico.

Observando los cromatogramas que se han obtenido en seis inyecciones efectuadas para cada caso ensayado, la mejor separación para el ácido nicotínico y la nicotinamida en un único análisis, se ha logrado usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-reactivo de par-iónico 5 mM a pH 3,3, sin la necesidad de emplear diferentes condiciones cromatográficas según se trate de un vitámero u otro. La proporción de acetonitrilo en esta mezcla se ha reducido a (25:75 v/v), aumentando de esta manera los tiempos de retención en 0,4 min para cada vitamina. Se ha operado con una velocidad de flujo de 0,650 ml/min a una temperatura de 35 °C. Se ha apreciado en el estudio que la reducción en el valor de pH implica un aumento en los tiempos de retención y una mejor simetría de las señales. A pesar de ello, el tiempo de retención en estas condiciones para el ácido nicotínico ha sido de 2,969 min y para la nicotinamida ha sido de 3,510 min, tiempos relativamente cortos, pero que permiten la separación de ambas vitaminas. Otros autores han obtenido buenos resultados trabajando también en condiciones ácidas a pH 2,6 (Kitada *et al.*, 1982; Fujita *et al.*, 1983), a pH 3,0 (Hamano *et al.*, 1988), a pH 2,5 (Fontaine & Hörr, 1993) y a pH 2,2 (Gigliotti & Daghetta, 1993), observándose que mediante métodos de extracción y de análisis diferentes entre sí, han obtenido buenos resultados aplicados a cada caso concreto.

El ácido nicotínico y la nicotinamida tienen absorción ultravioleta, encontrándose mediante los espectros de las respectivas vitaminas que los máximos corresponden en las condiciones de operación a una longitud de onda de 261 nm.

El método cromatográfico se ha aplicado al patrón obteniendo el cromatograma de la figura 50, con señales bien definidas.

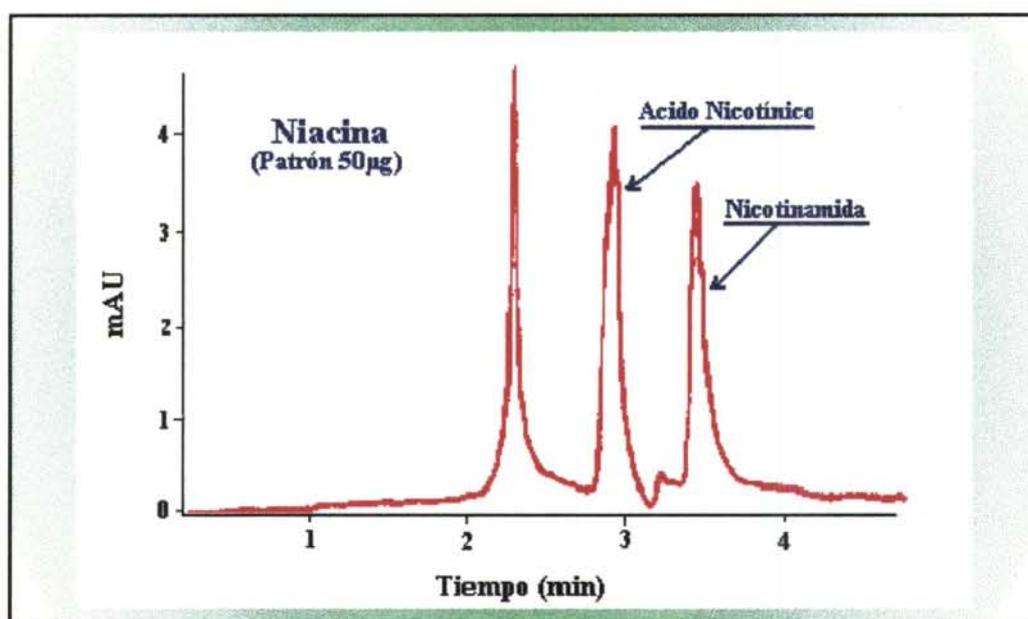


Fig. 50. Cromatograma de NIACINA en Patrón (Acido Nicotínico: 50 µg, 2,972 min; Nicotinamida: 50 µg, 3,515 min)

### 6.A.1.3.2. Estudio para la optimización de la extracción de niacina a partir de productos cárnicos cocidos

Revisadas las referencias bibliográficas se ha intentado buscar un método para la extracción de niacina eficaz y sencillo. A diferencia del tratamiento de digestión ácida y enzimática llevado a cabo por autores como Toma & Tabekhia (1979), Skurray (1981) y Vidal-Valverde & Reche (1991), se ha ensayado un procedimiento analítico más simple y más rápido mediante extracción acuosa acompañada de precipitación de las proteínas con hidróxido de zinc (Takatsuki *et al.*, 1987), habiéndose aumentado la concentración de agente precipitante para asegurar mejor purificación de los extractos.

El tratamiento acuoso se ha investigado en frío (temperatura ambiente) y en caliente (10 min a 90 °C), es decir, de forma previa al enrase y a la centrifugación de las muestras, éstas se han colocado en un baño de agua termostático 10 min a 90 °C, enfriándose a continuación y siguiendo el mismo proceso que el usado en la extracción en frío. Las determinaciones se han llevado a cabo con dos patrones puros de ácido nicotínico y de nicotinamida (50 y 100 µg).

La tabla 52 presenta los datos obtenidos después del estudio realizado. Como se observa, no hay diferencia significativa entre el tratamiento en frío y en caliente, por lo tanto se ha decidido operar a temperatura ambiente, reduciendo tiempo en el desarrollo del procedimiento analítico. Esta extracción y la purificación mediante la precipitación de proteínas son etapas sencillas que permiten obtener una solución clara para ser inyectada en el sistema cromatográfico. El límite de detección conseguido por Takatsuki *et al.*, (1987) fue de 1,000 mg/100 g, en este estudio se ha mejorado la sensibilidad del análisis a 0,200 mg/100 g.

TABLA 52. Extracción acuosa en la determinación de NIACINA

Muestra	Extracción acuosa	
	FRIO <sup>a</sup> $\bar{x}^c (n=10) \pm SD$	CALIENTE <sup>b</sup> $\bar{x}^c (n=10) \pm SD$
Acido Nicotínico 50 $\mu\text{g}$	25,30 $\pm$ 0,372	24,15 $\pm$ 0,386
Acido Nicotínico 100 $\mu\text{g}$	49,28 $\pm$ 0,674	48,57 $\pm$ 0,527
Nicotinamida 50 $\mu\text{g}$	21,80 $\pm$ 0,367	22,15 $\pm$ 0,264
Nicotinamida 100 $\mu\text{g}$	44,12 $\pm$ 0,455	44,97 $\pm$ 0,396

<sup>a</sup> Tratamiento a temperatura ambiente

<sup>b</sup> Tratamiento durante 10 min a 90 °C

<sup>c</sup> Los datos representan las áreas cromatográficas obtenidas en el análisis por duplicado de las muestras

### 6.A.1.3.3. Determinación de los parámetros analíticos

#### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de chopped de pavo y los resultados se presentan en las tablas 53 y 54.

TABLA 53. Determinación de ACIDO NICOTINICO: Precisión

<b>Muestra</b>	<b>n</b>	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	<b>CV</b> (%)
Chopped pavo <sup>a</sup>	1	1,251 ± 0,006	0,5
Chopped pavo <sup>b</sup>	10	1,287 ± 0,030	2,3

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

TABLA 54. Determinación de NICOTINAMIDA: Precisión

<b>Muestra</b>	<b>n</b>	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	<b>CV</b> (%)
Chopped pavo <sup>a</sup>	1	2,505 ± 0,024	1,0
Chopped pavo <sup>b</sup>	10	2,496 ± 0,112	4,5

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

### EXACTITUD

Los resultados de exactitud para ácido nicotínico y nicotinamida se detallan en las tablas 55 y 56.

TABLA 55. Determinación de ACIDO NICOTINICO: Exactitud

Muestra	Cantidad presente (mg/100 g)	Cantidad adicionada (mg/100 g)	Cantidad hallada (mg/100 g)	Recuperación (%)
Chopped pavo <sup>a</sup>				
	-		1,247	
	-		1,254	
	-		1,258	
	-		1,245	
	-		1,256	
	-		1,243	
$\bar{x} \pm SD$			1,251 $\pm$ 0,006	
	1,251	0,500	1,653	94,4
	1,251	0,500	1,631	93,1
	1,251	0,500	1,644	93,9
$\bar{x} \pm SD$			1,643 $\pm$ 0,011	
	1,251	1,000	2,106	93,6
	1,251	1,000	2,094	93,0
	1,251	1,000	2,130	94,6
$\bar{x} \pm SD$			2,110 $\pm$ 0,018	93,8 $\pm$ 0,7

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para el ácido nicotínico varía entre 93,0-94,6% con un valor medio de 93,8%. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 0,6%.

TABLA 56. Determinación de NICOTINAMIDA: Exactitud

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad presente</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad adicionada</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad hallada</b> (mg/100 g)	<b>Recuperación</b> (%)
Chopped pavo <sup>a</sup>				
	-		2,476	
	-		2,520	
	-		2,540	
	-		2,480	
	-		2,501	
	-		2,511	
$\bar{x} \pm SD$			2,505 $\pm$ 0,024	
	2,505	1,500	3,890	92,3
	2,505	1,500	3,894	92,6
	2,505	1,500	3,906	93,4
$\bar{x} \pm SD$			3,897 $\pm$ 0,008	
	2,505	2,500	4,884	95,2
	2,505	2,500	4,862	94,3
	2,505	2,500	4,857	94,1
$\bar{x} \pm SD$			4,868 $\pm$ 0,014	93,7 $\pm$ 1,1

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para la nicotinamida varía entre 92,3-95,2% con un valor medio de 93,7%. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 0,8%.

**6.A.1.3.4. Sistema de calibración y ensayo**

Las tablas 57 y 58 contienen los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de ácido nicotínico y nicotinamida detalladas en 5.B.2.1.3.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.1.3.4.

TABLA 57. Datos de calibración para ACIDO NICOTINICO

<b>Tiempo de retención</b> (min)	<b>Contenido vitamina</b> ( $\mu\text{g}$ )	<b>Area cromatográfica</b> $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
2,976	20	10,07 $\pm$ 0,276
2,972	50	25,98 $\pm$ 0,443
2,969	100	50,49 $\pm$ 0,742
2,957	200	105,69 $\pm$ 1,060
2,957	300	160,23 $\pm$ 1,678

TABLA 58. Datos de calibración para NICOTINAMIDA

<b>Tiempo de retención</b> (min)	<b>Contenido vitamina</b> ( $\mu\text{g}$ )	<b>Area cromatográfica</b> $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
3,515	20	8,74 $\pm$ 0,438
3,515	50	22,00 $\pm$ 0,428
3,510	100	43,94 $\pm$ 0,339
3,503	200	92,92 $\pm$ 0,746
3,496	300	143,42 $\pm$ 0,638

Las curvas de calibración obtenidas se presentan en las figuras 51 y 52. Son líneas rectas en el margen de trabajo de 20-300  $\mu\text{g}$  y cubren en el alimento un rango de 1,000-15,000 (mg/100 g) respectivamente. Los coeficientes de variación para las pendientes son 3,6% para el ácido nicotínico y 7,7% para la nicotinamida. Aunque los valores son mejores que para otras vitaminas, conviene trabajar siempre con curvas recién preparadas. El límite de detección corresponde a 0,200 (mg/100 g).

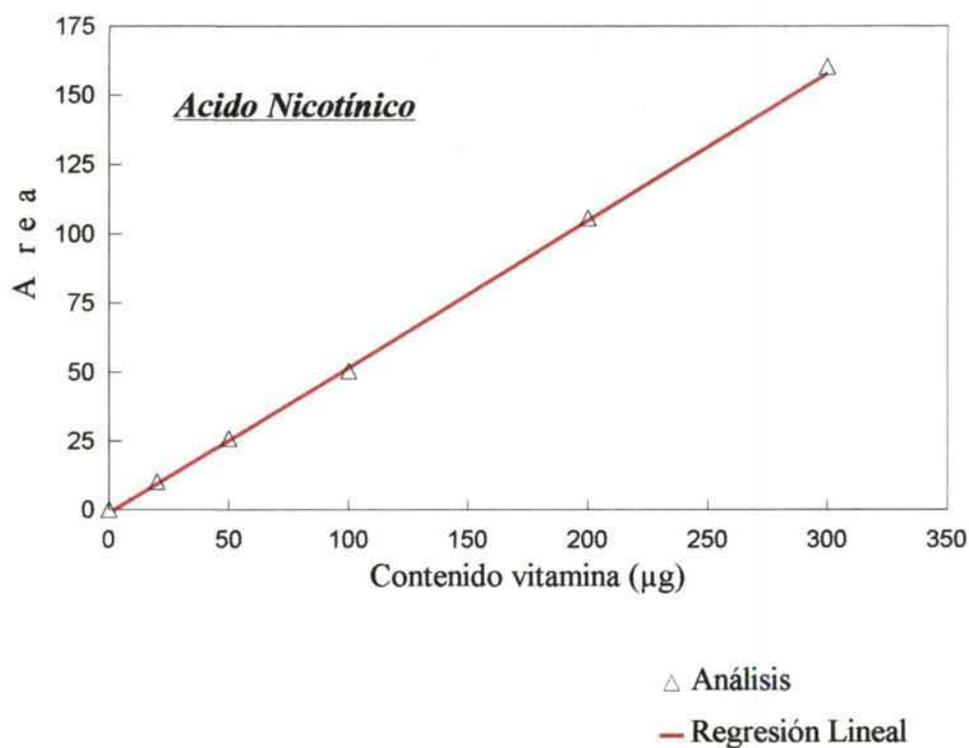


Fig. 51. Curva de calibración para ACIDO NICOTINICO

El resultado de la regresión se expone en la tabla 59.

TABLA 59. Regresión lineal ACIDO NICOTINICO = - 0,955 + 0,535 x

### RESULTADO REGRESION ACIDO NICOTINICO

Constante	- 0,955
Coefficiente X	0,535
Coef. correlación lineal (r)	0,9998

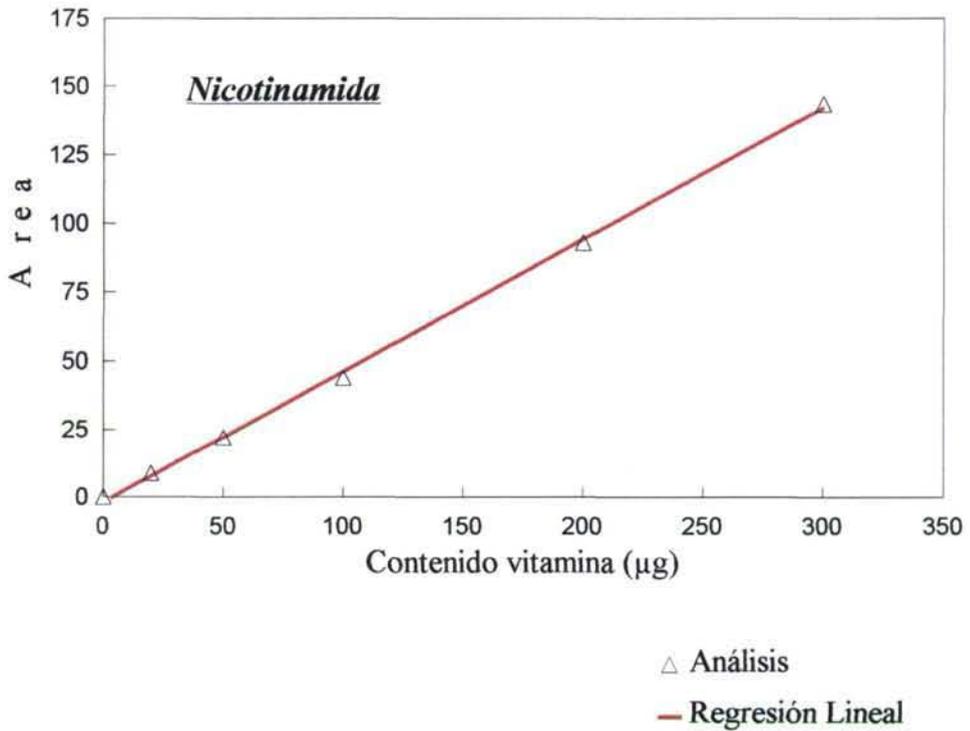


Fig. 52. Curva de calibración para NICOTINAMIDA

El resultado de la regresión se expone en la tabla 60.

TABLA 60. Regresión lineal NICOTINAMIDA = - 1,547 + 0,478 x

### RESULTADO REGRESION NICOTINAMIDA

Constante	-1,547
Coefficiente X	0,478
Coef. correlación lineal (r)	0,9996

#### **6.A.1.3.5. Cromatogramas de niacina en productos cárnicos cocidos**

La aplicación del método a los productos cárnicos cocidos, permite obtener los cromatogramas de las figuras (53-58). El problema asociado a la separación de ácido nicotínico y de nicotinamida es la presencia de interferencias con una fuerte absorción ultravioleta siendo las señales de éstas más intensas que las correspondientes a la vitamina, aunque no afectan a los picos objeto del estudio. La baja sensibilidad del detector de matriz de fotodiodos dificulta la medida de pequeñas concentraciones de niacina, siendo el límite de detección de 0,200 mg/100 g. La identificación de las señales se ha basado en los tiempos de retención, siendo los coeficientes de variación para el ácido nicotínico y la nicotinamida, 0,13 y 1,4% respectivamente.

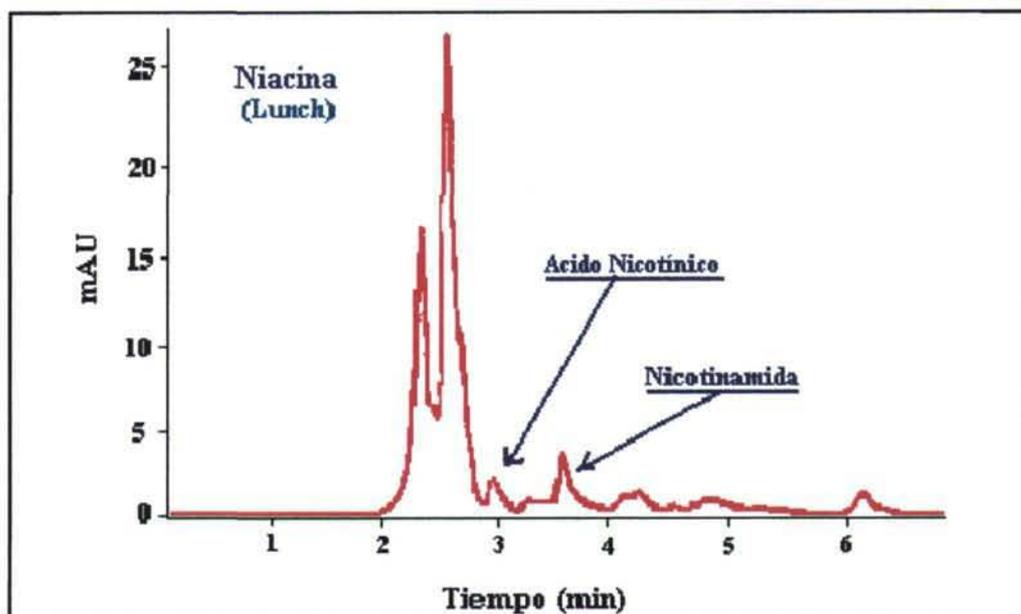


Fig. 53. Cromatograma de NIACINA en Lunch (Acido Nicotínico: 1,090 mg/100 g, 2,972 min; Nicotinamida: 2,439 mg/100 g, 3,560 min)

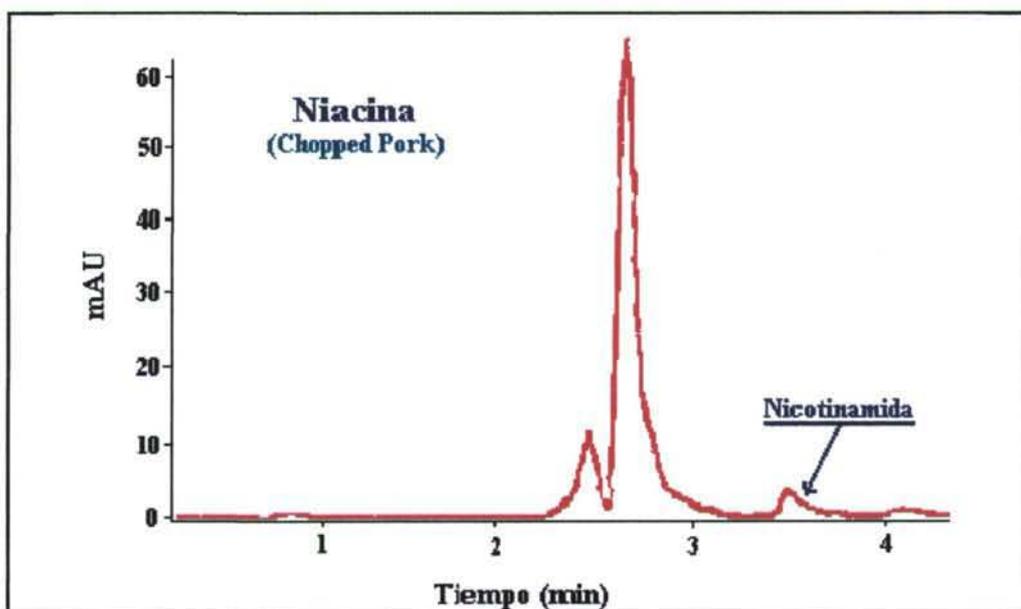


Fig. 54. Cromatograma de NIACINA en Chopped pork (Nicotinamida: 2,857 mg /100 g, 3,422 min)

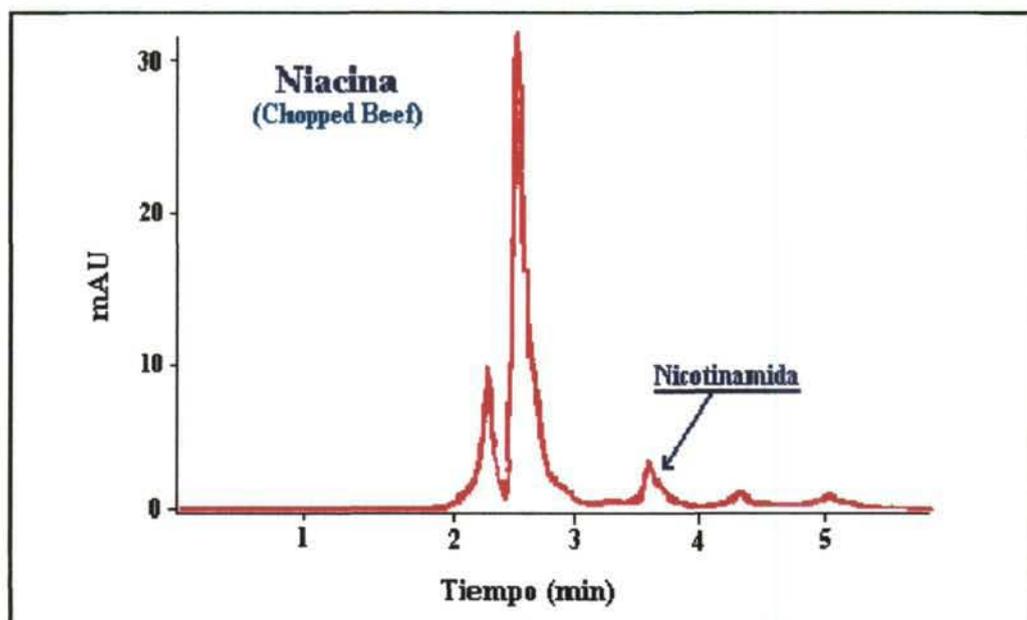


Fig. 55. Cromatograma de NIACINA en Chopped beef (Nicotinamida: 2,807 mg /100 g; 3,564 min)

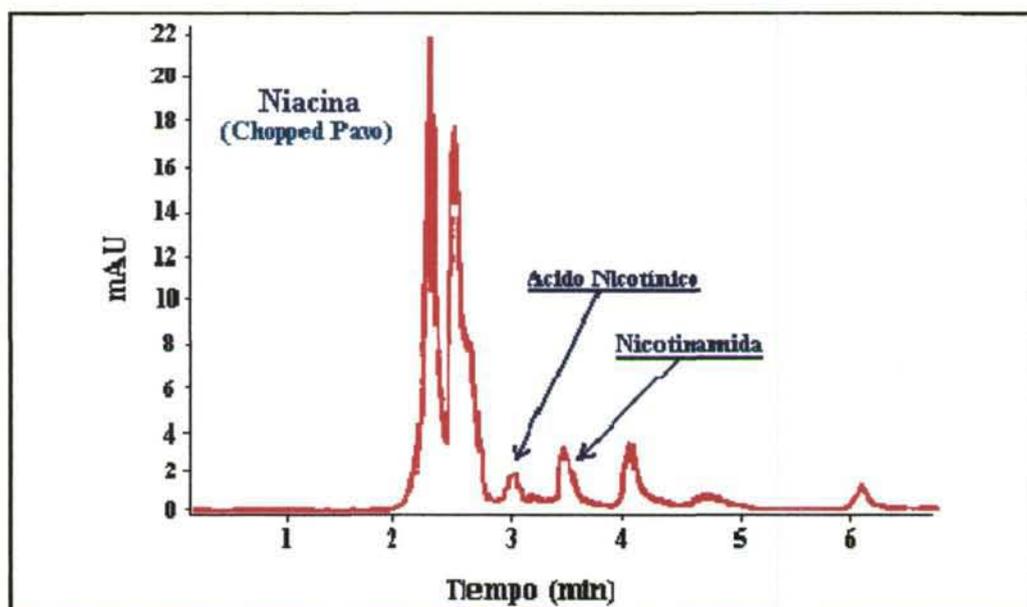


Fig. 56. Cromatograma de NIACINA en Chopped pavo (Acido Nicotínico: 1,247 mg /100 g, 2,973 min; Nicotinamida: 2,416 mg/100 g, 3,536 min)

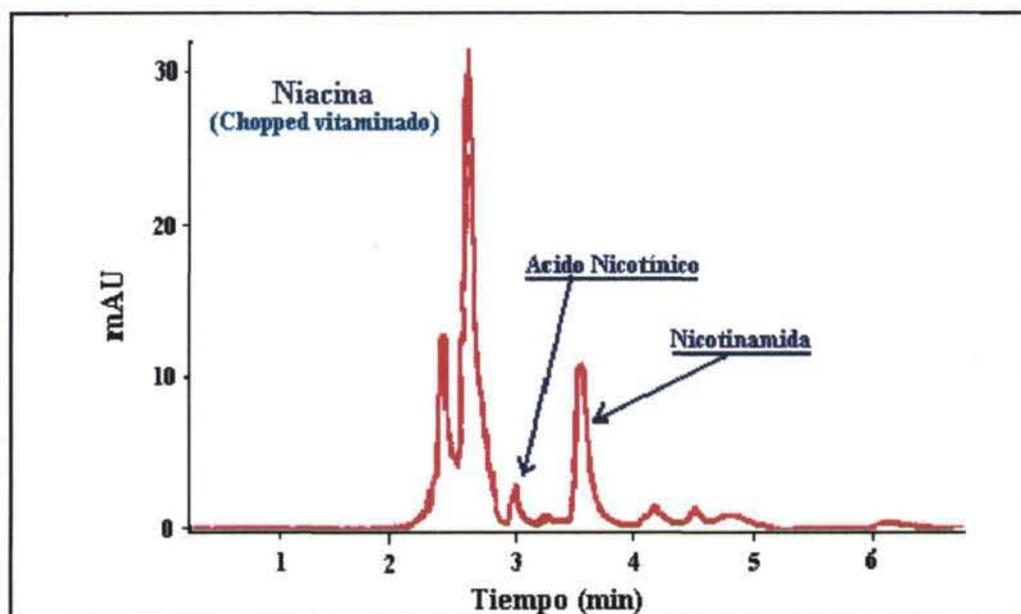


Fig. 57. Cromatograma de NIACINA en Chopped vitaminado (Acido Nicotínico: 1,524 mg/100 g, 2,964 min; Nicotinamida: 8,513 mg/100 g, 3,556 min)

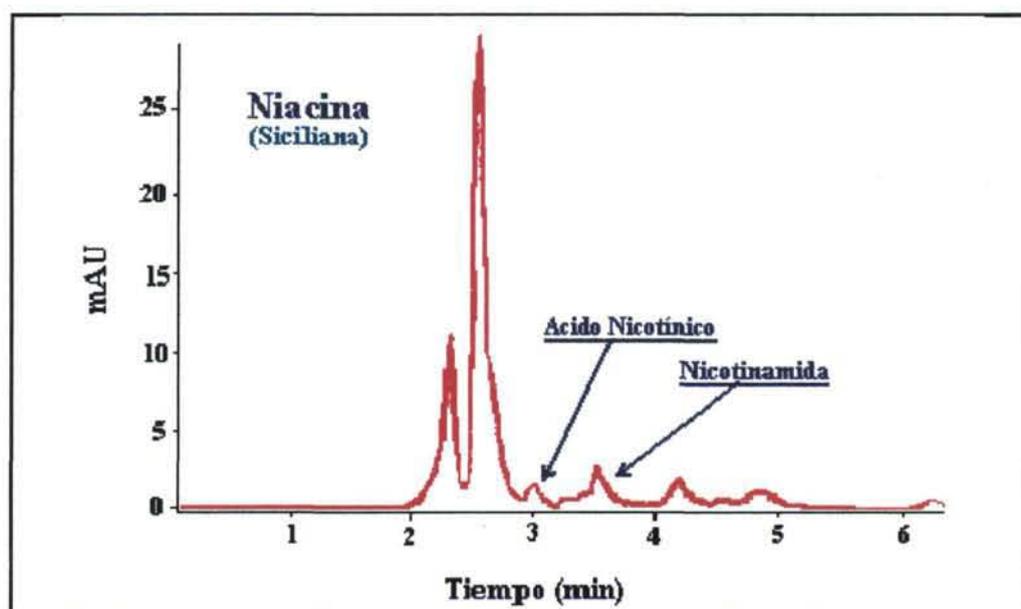


Fig. 58. Cromatograma de NIACINA en Mortadela siciliana (Acido Nicotínico: 0,869 mg/100 g, 2,965 min; Nicotinamida: 2,111 mg/100 g, 3,547 min)

#### 6.A.1.4. VITAMINA B<sub>6</sub>

##### 6.A.1.4.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de vitamina B<sub>6</sub>

El objetivo ha sido preparar un método seguro, rápido y sensible capaz de separar y cuantificar cinco vitámeros de la vitamina B<sub>6</sub> (PM, PMP, PL, PLP y PN). Revisadas las referencias bibliográficas se observa que varios autores no separan las formas fosforiladas (tablas 23-25). Dada la naturaleza iónica de estos compuestos, algunos trabajos recomiendan como modo cromatográfico más adecuado para la separación de todos ellos la cromatografía por intercambio iónico, con la desventaja del largo tiempo de elución que se necesita. Sin embargo, también se han estudiado separaciones en fase inversa con y sin reactivos de pares iónicos. En este caso el ensayo se ha iniciado con un método cromatográfico en fase inversa sin pares iónicos (Lim *et al.*, 1980; Gregory *et al.*, 1981; Ang *et al.*, 1988).

Se ha seleccionado una columna Hypersil BDS C<sub>18</sub> (5 µm, 10 x 0,46 cm DI), eligiéndose este relleno de sílice de base desactivada por tratarse de una fase estacionaria ligada homogéneamente con mínima posibilidad de interacciones soluto-silanol que causan colas en los picos. A continuación se ha determinado la composición óptima de la fase móvil. Se inicia el estudio con mezclas de acetonitrilo-tampón fosfato (20:80 v/v) en eluciones isocráticas trabajando a diferentes concentraciones del tampón (30, 50 y 70 mM) para un valor de pH de 3,2. Se ha decidido este pH porque todos los vitámeros son relativamente estables en soluciones ácidas (Cunningham & Snell, 1945). El estudio se ha aplicado a los patrones puros de PM (100 µg), PMP (100 µg), PL (100 µg), PLP (500 µg) y PN (100 µg), inicialmente uno a uno y luego en una mezcla con dicha concentración.

Observando los cromatogramas obtenidos en seis inyecciones efectuadas para cada uno de los casos estudiados, el principal problema es el corto tiempo de elución de los compuestos, unido al solapamiento de las señales cromatográficas. En la medida que la concentración de tampón aumenta de 30 a 70 mM el tiempo

de retención se incrementa en 0,2 min. En consecuencia, se ha decidido modificar la proporción de tampón fosfato en la fase móvil de 80 a 95% y operar con la concentración de tampón intermedia, 50 mM. En estas nuevas condiciones el solapamiento de los picos y los tiempos de salida de los mismos han mejorado, siendo las señales de PM y PMP las peor resueltas, por lo que se ha continuado estudiando la composición de acetonitrilo y de tampón en la fase móvil.

Finalmente, la mejor separación para los vitámeros de vitamina B<sub>6</sub> estudiados en fase inversa sin necesidad de empleo de reactivo par-iónico se ha obtenido usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-tampón fosfato 50 mM a pH 3,2 en una proporción de (1:99 v/v), operando con una velocidad de flujo de 0,800 ml/min a una temperatura de 35 °C. Los tiempos de retención en estas condiciones para los vitámeros han sido de 1,410 min (PMP), 1,527 min (PM), 2,605 min (PL), 3,238 min (PLP) y 3,552 min (PN). Lim *et al.*, (1980) y Gregory *et al.*, (1981) en productos lácteos principalmente así como Ang *et al.*, (1988) en carne de pollo, trabajando con fases móviles parecidas han obtenido también buenos resultados pero las fases estacionarias empleadas así como las condiciones de detección han sido diferentes entre sí.

La detección se ha realizado por fluorescencia, encontrándose que los máximos corresponden en las condiciones de operación a una longitud de onda de excitación de 290 nm y una longitud de onda de emisión de 395 nm (Ang *et al.*, 1988).

El método se ha aplicado a los patrones obteniendo los cromatogramas de las figuras (59-64). Las condiciones cromatográficas permiten la separación individual y global de éstos mediante señales bien definidas y simétricas. Se ha considerado que la resolución en la mezcla de patrones es satisfactoria, considerando que no se ha usado un reactivo de par-iónico.

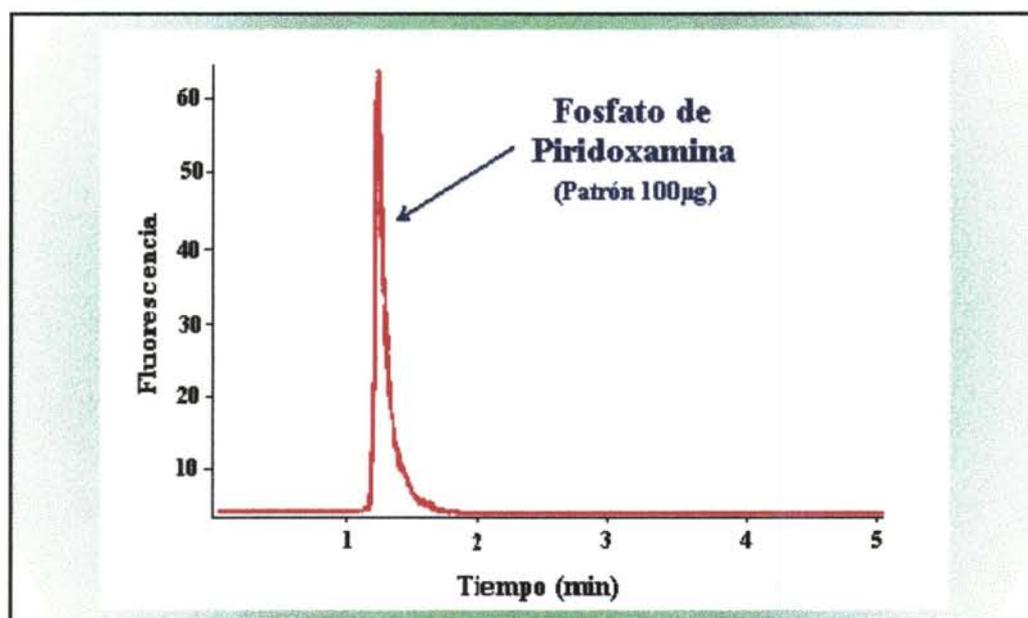


Fig. 59. Cromatograma del vitámero PMP en Patrón (100 µg; 1,356 min)

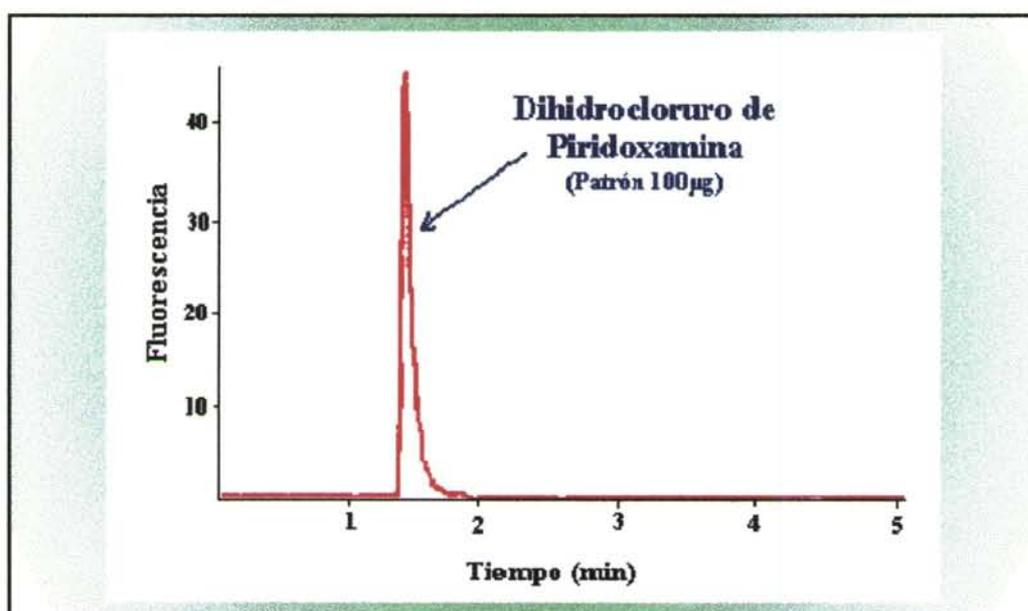


Fig. 60. Cromatograma del vitámero PM en Patrón (100 µg; 1,503 min)

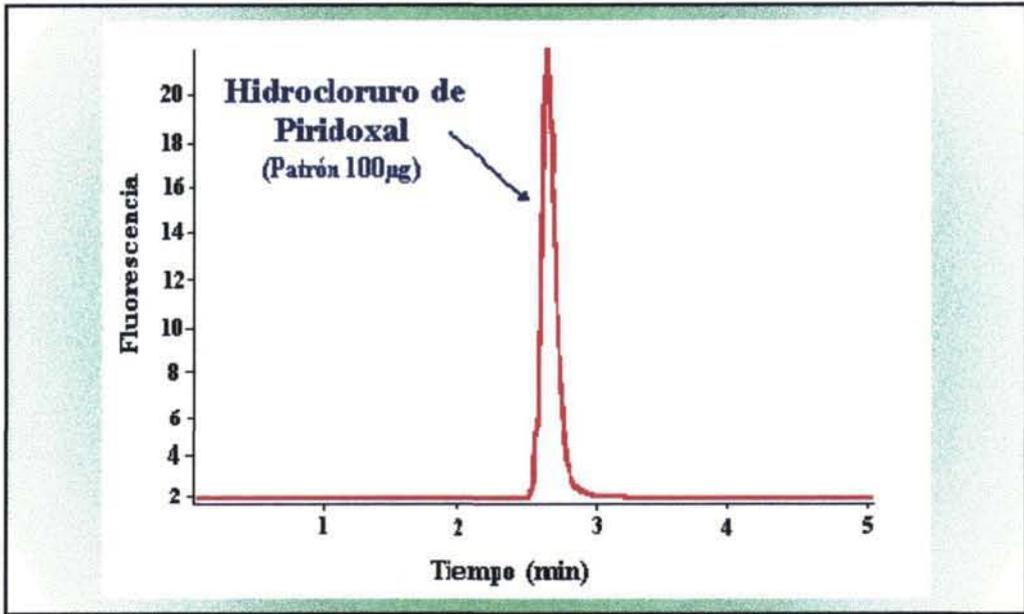


Fig. 61. Cromatograma del vitámero PL en Patrón (100 µg; 2,683 min)

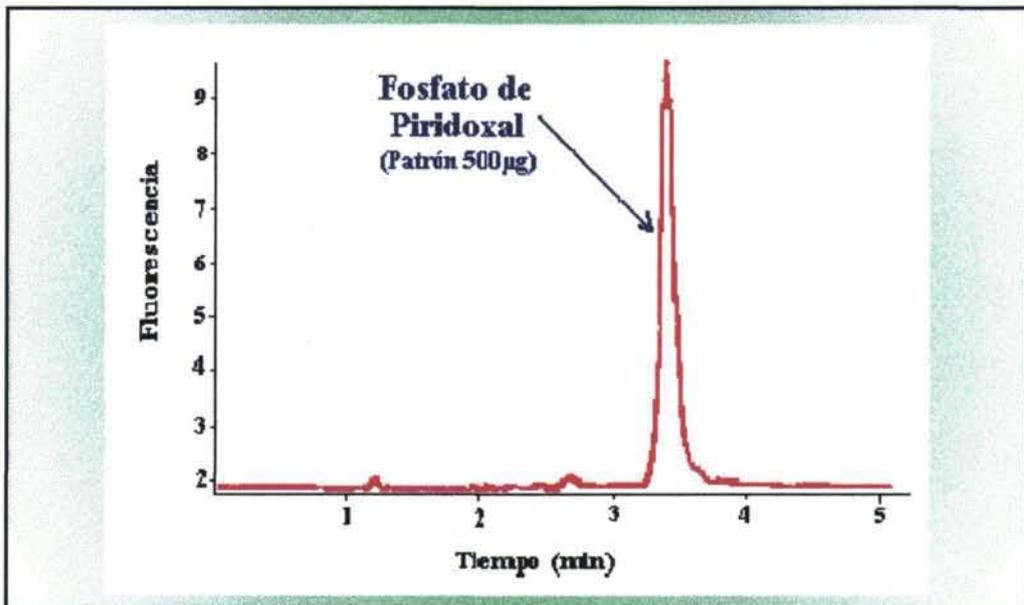


Fig. 62. Cromatograma del vitámero PLP en Patrón (500 µg; 3,368 min)

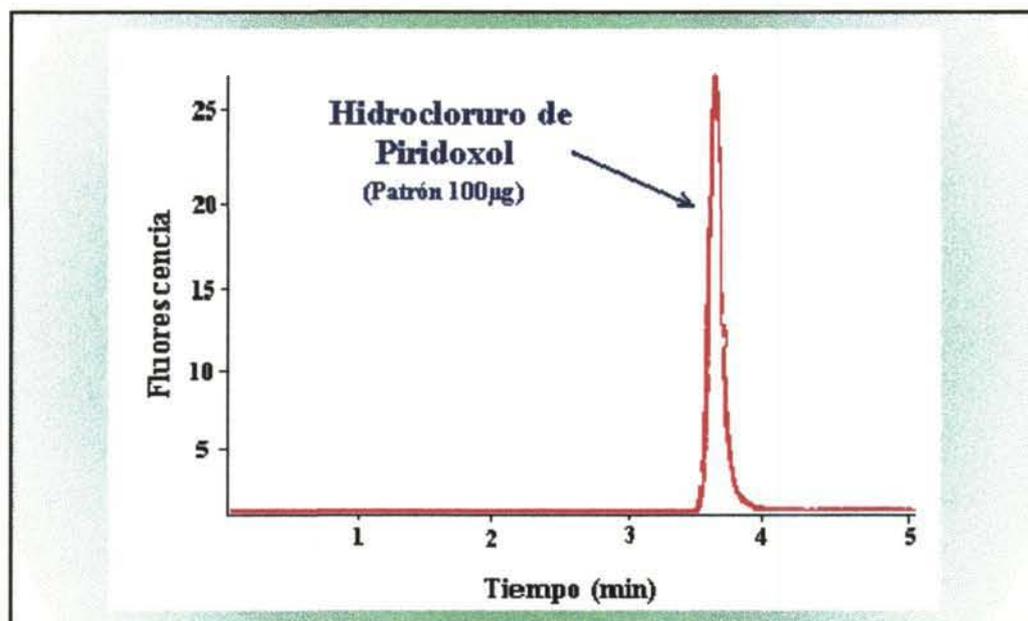


Fig. 63. Cromatograma del vitámero PN en Patrón (100 µg; 3,723 min)

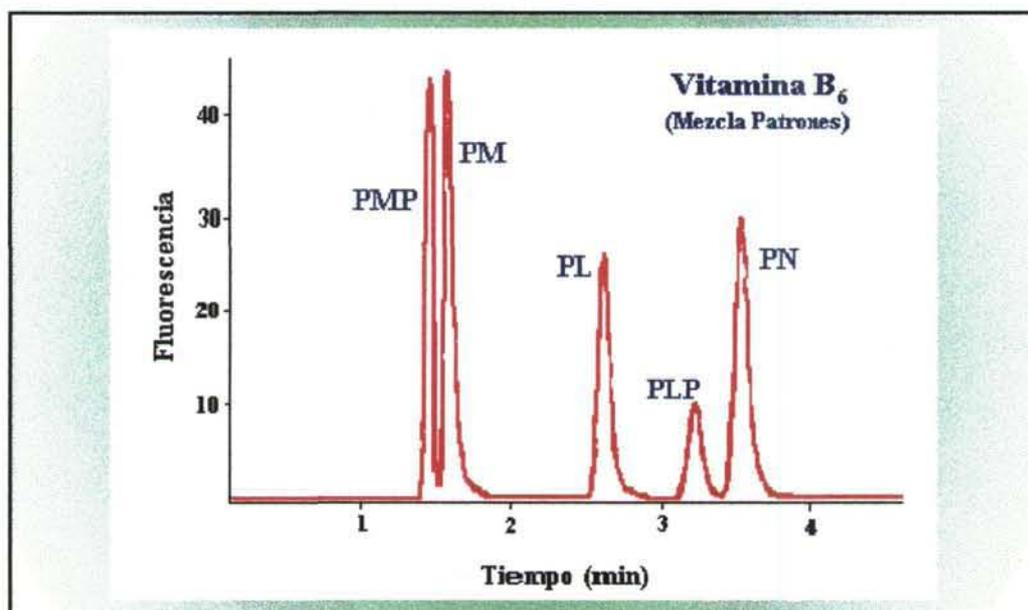


Fig. 64. Cromatograma de varios vitámeros en mezcla de Patrones (PMP: 100 µg, 1,410 min; PM: 100 µg, 1,527 min; PL: 100 µg, 2,605 min; PLP: 500 µg, 3,238 min; PN: 100 µg, 3,552 min)

#### 6.A.1.4.2. Estudio para la optimización del agente de extracción para la vitamina B<sub>6</sub> a partir de productos cárnicos cocidos

El proceso de extracción de vitamina B<sub>6</sub> en alimentos implica la obtención de una serie de vitámeros que se hallan en bajas concentraciones en matrices complejas, bien en forma libre o enlazadas a proteínas, aminoácidos, azúcares y fosfatos. Tanto las moléculas libres como las formas fosforiladas tienen la misma actividad vitamínica (Driskell, 1984).

Se han usado diversos agentes desnaturalizantes de proteínas para la extracción de estas moléculas, entre ellos ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico o ácido metafosfórico. Estos ácidos no destruyen las formas fosforiladas de la vitamina, mientras que ácidos más fuertes como clorhídrico, sulfúrico sí lo hacen. El método de extracción debe permitir la solubilización efectiva de cada una de las formas de vitamina.

Buscando las condiciones óptimas se han elegido dos de éstos agentes extractantes, el ácido metafosfórico (Ang *et al.*, 1988, en carne de pollo) y el ácido tricloroacético (Macrae *et al.*, 1984 y Schoonhoven *et al.*, 1994, en alimentos varios), ensayándose ambos al 5% (p/v) de concentración, en dos productos diferentes (mortadela siciliana y chopped vitaminado) y en una mezcla de patrones como referencia.

La tabla 61 presenta los datos del estudio. Ambos agentes extractantes tienen un comportamiento similar en cuanto a la cantidad que permiten recuperar, pero se ha observado que cuando se emplea ácido tricloroacético se produce un desdoblamiento de la señal PMP en dos picos cromatográficos, lo que no ocurre utilizando ácido metafosfórico. El ácido tricloroacético retiene las moléculas algo más de tiempo en la columna, eluyendo el último componente (PN) a 4,403 min. Por ello, se ha decidido la utilización de ácido metafosfórico que permite obtener mejores cromatogramas sin desdoblamiento de las señales. Ang *et al.*, han obtenido buenos resultados usando este ácido como agente de extracción, sin

embargo la separación cromatográfica de los compuestos les ha requerido más tiempo y las señales tienen peor simetría.

TABLA 61. Efecto del agente extractante en la determinación de VITAMINA B<sub>6</sub>

Muestra	Extracción ácida	
	METAFOSFORICO (mg/100 g) <sup>a</sup>	TRICLOROACETICO (mg/100 g) <sup>a</sup>
Chopped beef	0,216 ± 0,008	0,208 ± 0,007
Mortadela siciliana	0,130 ± 0,007	0,136 ± 0,009

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=6) ± SD por duplicado

#### 6.A.1.4.3. Determinación de los parámetros analíticos

##### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de chopped beef y los resultados se presentan en la tabla 62.

TABLA 62. Determinación de VITAMINA B<sub>6</sub> (PMP): Precisión

<b>Muestra</b>	<b>n</b>	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	<b>CV</b> (%)
Chopped beef <sup>a</sup>	1	0,213 ± 0,001	0,5
Chopped beef <sup>b</sup>	10	0,208 ± 0,009	4,3

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante varios meses

### EXACTITUD

Los resultados de exactitud para vitamina B<sub>6</sub> (PMP) se detallan en la tabla 63.

TABLA 63. Determinación de VITAMINA B<sub>6</sub> (PMP): Exactitud

Muestra	Cantidad presente (mg/100 g)	Cantidad adicionada (mg/100 g)	Cantidad hallada (mg/100 g)	Recuperación (%)
Chopped beef <sup>a</sup>				
	-		0,212	
	-		0,211	
	-		0,213	
	-		0,213	
	-		0,214	
	-		0,214	
$\bar{x} \pm SD$			0,213 ± 0,001	
	0,213	0,100	0,307	94,0
	0,213	0,100	0,308	95,0
	0,213	0,100	0,305	92,0
$\bar{x} \pm SD$			0,307 ± 0,002	93,7 ± 1,5
	0,213	0,200	0,408	97,5
	0,213	0,200	0,413	100,0
	0,213	0,200	0,410	98,5
$\bar{x} \pm SD$			0,410 ± 0,003	98,7 ± 1,3

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para la vitamina B<sub>6</sub> (PMP) varía considerablemente entre 92,0-100,0%, observándose que a mayor concentración de vitamina la recuperación es

más alta. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 1,6%.

#### 6.A.1.4.4. Sistema de calibración y ensayo

Las tablas (64-68) contienen los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de vitámeros B<sub>6</sub> detalladas en 5.B.2.1.4.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.1.4.4.

TABLA 64. Datos de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAMINA (PMP)

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
1,337	10	29,43 $\pm$ 0,599
1,344	20	61,28 $\pm$ 0,989
1,355	40	117,27 $\pm$ 1,239
1,350	50	139,15 $\pm$ 1,608
1,356	100	281,66 $\pm$ 2,976

TABLA 65. Datos de calibración para DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA (PM)

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
1,493	10	22,97 $\pm$ 0,744
1,494	20	47,25 $\pm$ 1,006
1,504	40	96,92 $\pm$ 0,953
1,496	50	110,58 $\pm$ 2,126
1,503	100	234,09 $\pm$ 1,691

TABLA 66. Datos de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL (PL)

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
2,668	10	13,88 $\pm$ 0,578
2,680	20	25,84 $\pm$ 1,075
2,674	40	53,66 $\pm$ 1,993
2,667	50	71,63 $\pm$ 0,810
2,683	100	138,89 $\pm$ 1,149

TABLA 67. Datos de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP)

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
3,352	100	12,15 $\pm$ 0,435
3,367	200	23,32 $\pm$ 0,800
3,353	300	38,43 $\pm$ 0,624
3,358	400	49,37 $\pm$ 1,259
3,368	500	68,18 $\pm$ 1,847

TABLA 68. Datos de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL (PN)

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
3,720	20	34,93 $\pm$ 0,509
3,715	30	54,09 $\pm$ 0,999
3,726	50	91,59 $\pm$ 0,816
3,716	60	106,62 $\pm$ 0,554
3,723	100	180,01 $\pm$ 2,127

Las curvas de calibración obtenidas se presentan en las figuras (65-69). Son líneas rectas en los márgenes de trabajo de 10-100  $\mu\text{g}$  para (PL, PM y PMP), de 100-500  $\mu\text{g}$  para (PLP) y de 20-100  $\mu\text{g}$  para (PN) y cubren en el alimento un rango de 0,100-1,000 (mg/100 g) para (PL, PM y PMP), de 1,000-5,000 (mg/100 g) para (PLP) y de 0,200-1,000 (mg/100 g) para (PN). Los coeficientes de variación para las pendientes son 8,5% para (PL), 8,9% para (PM), 12,6% para (PMP), 8,7% para (PLP) y 10,5% para (PN), por lo que también es conveniente trabajar con curvas patrón preparadas a diario. El límite de detección corresponde a 0,020 (mg/100 g) para (PL y PM), a 0,017 (mg/100 g) para (PMP), a 0,500 (mg/100 g) para (PLP) y 0,033 (mg/100 g) para (PN).

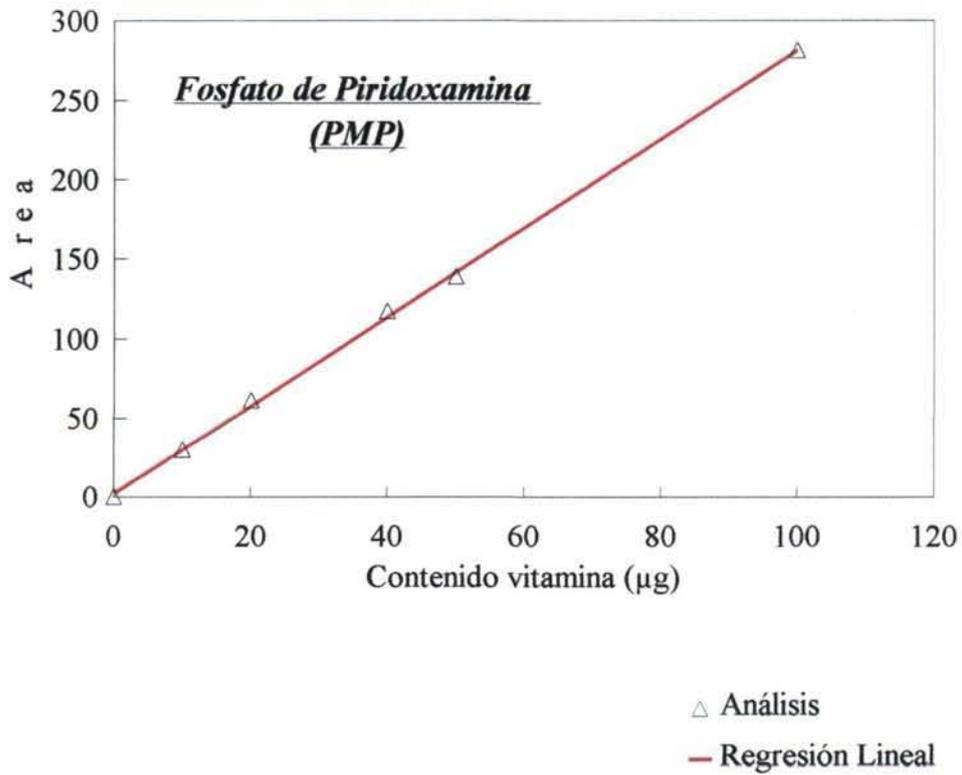


Fig. 65. Curva de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAMINA

El resultado de la regresión se expone en la tabla 69.

TABLA 69. Regresión lineal (PMP) = 2,214 + 2,798 x

#### RESULTADO REGRESION PMP

Constante	2,214
Coefficiente X	2,798
Coef. correlación lineal (r)	0,9997

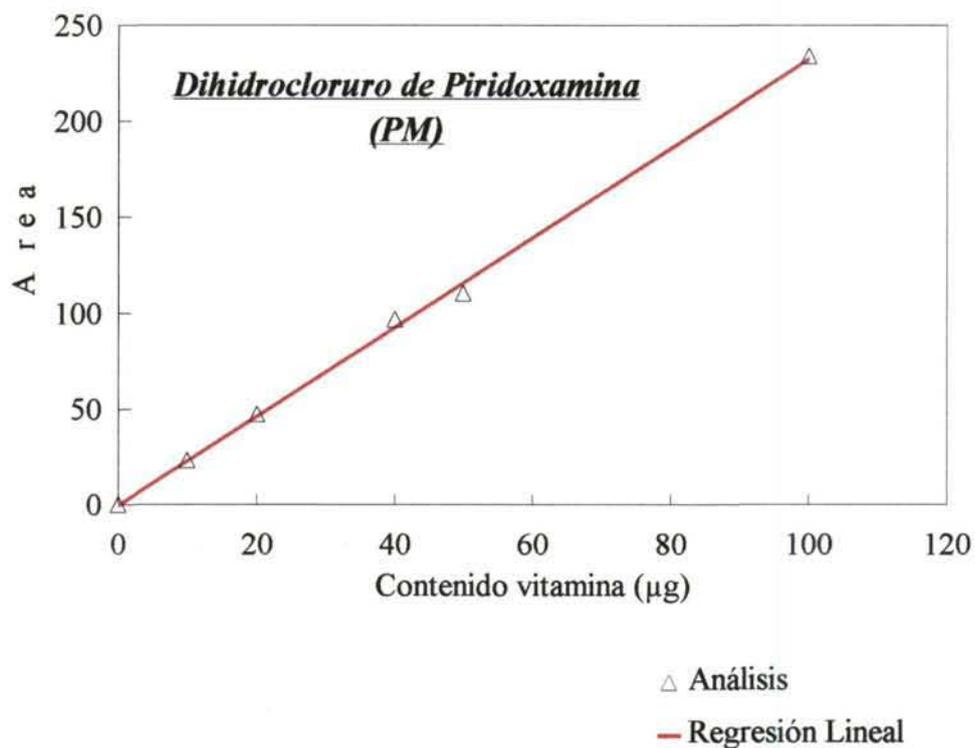


Fig. 66. Curva de calibración para DIHIDROCLORURO DE PIRIDOXAMINA

El resultado de la regresión se expone en la tabla 70.

TABLA 70. Regresión lineal (PM) = - 0,134 + 2,330 x

### RESULTADO REGRESION PM

Constante	- 0,134
Coefficiente X	2,330
Coef. correlación lineal (r)	0,9993

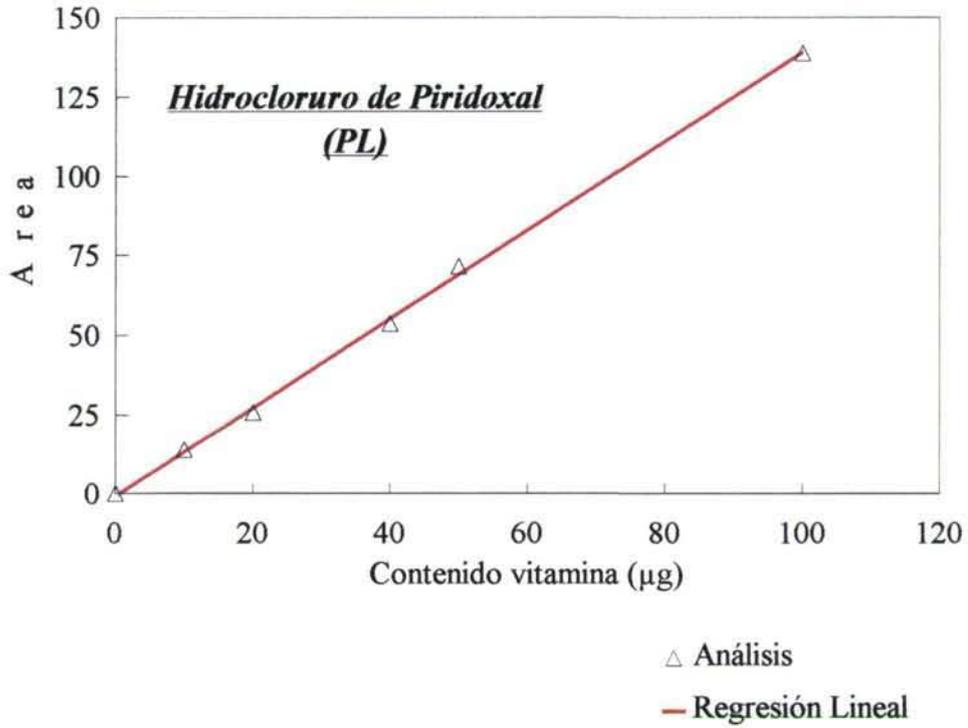


Fig. 67. Curva de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXAL

El resultado de la regresión se expone en la tabla 71.

TABLA 71. Regresión lineal (PL) = - 0,587 + 1,397 x

### RESULTADO REGRESION PL

Constante	- 0,587
Coefficiente X	1,397
Coef. correlación lineal (r)	0,9996

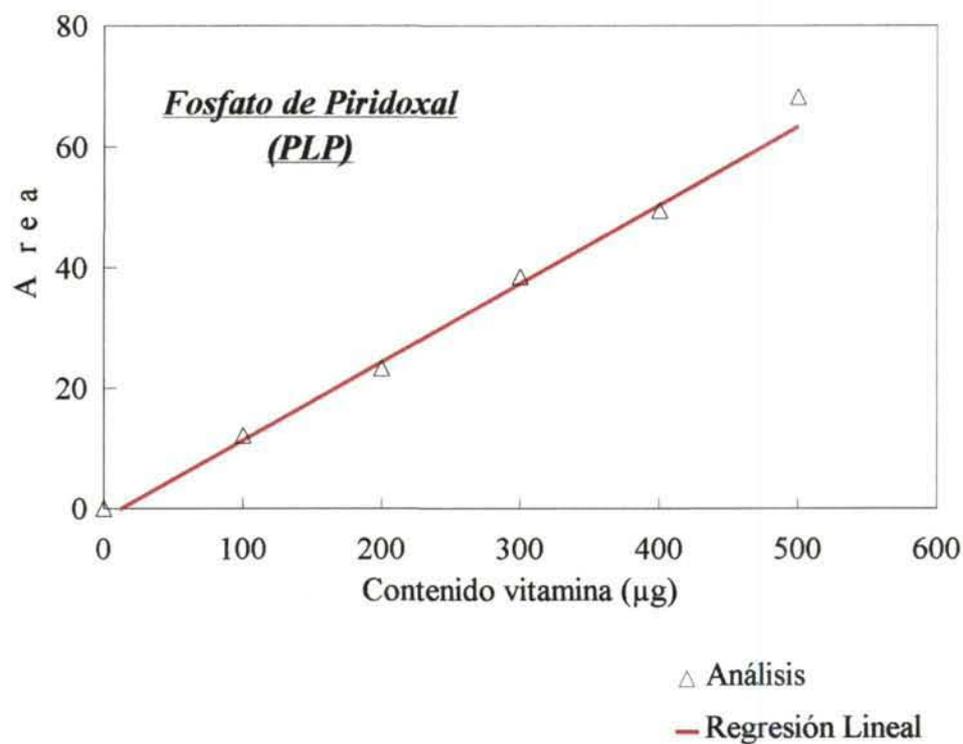


Fig. 68. Curva de calibración para FOSFATO DE PIRIDOXAL

El resultado de la regresión se expone en la tabla 72.

TABLA 72. Regresión lineal (PLP) = - 1,500 + 0,134 x

### RESULTADO REGRESION PLP

Constante	- 1,500
Coefficiente X	0,134
Coef. correlación lineal (r)	0,9967

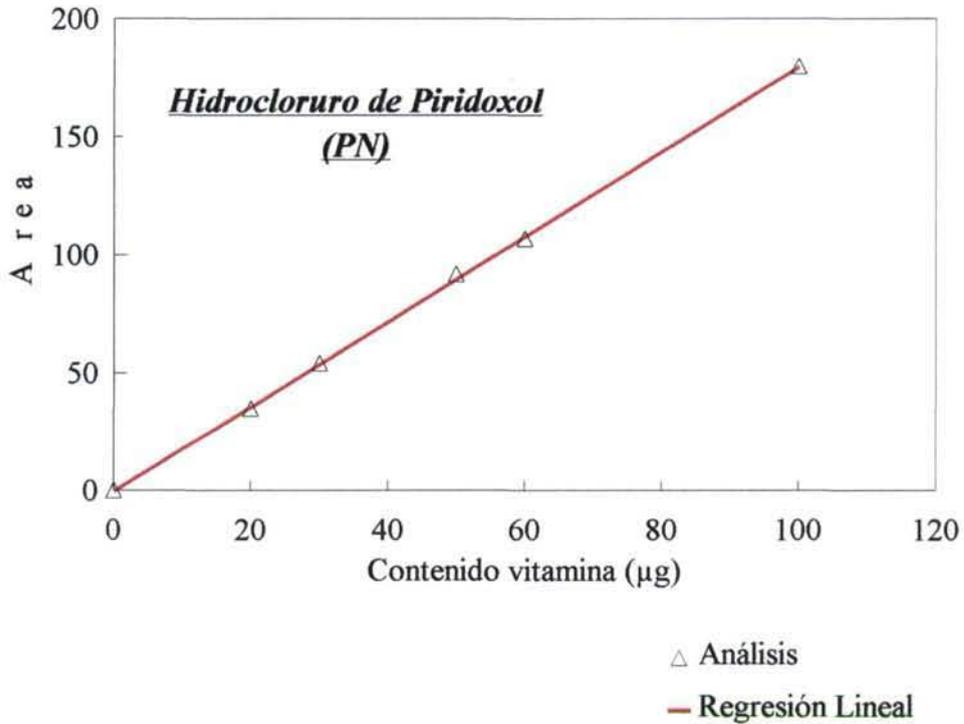


Fig. 69. Curva de calibración para HIDROCLORURO DE PIRIDOXOL

El resultado de la regresión se expone en la tabla 73.

TABLA 73. Regresión lineal (PN) = - 0,211 + 1,802 x

**RESULTADO REGRESION PN**

Constante	- 0,211
Coefficiente X	1,802
Coef. correlación lineal (r)	0,9998

#### **6.A.1.4.5. Cromatogramas de vitamina B<sub>6</sub> en productos cárnicos cocidos**

La aplicación del método a las muestras objeto del estudio permite obtener los cromatogramas de las figuras (70-75). Los cromatogramas de las muestras cárnicas presentan un único pico correspondiente al vitámero PMP, excepto en el chopped vitaminado que por tratarse de un producto enriquecido vitamínicamente presenta además la señal correspondiente al vitámero PN, uno de los más estables. Son picos bien definidos y libres de interferencias, cuya identificación se ha basado en el tiempo de retención, siendo los coeficientes de variación de 0,4% respectivamente.

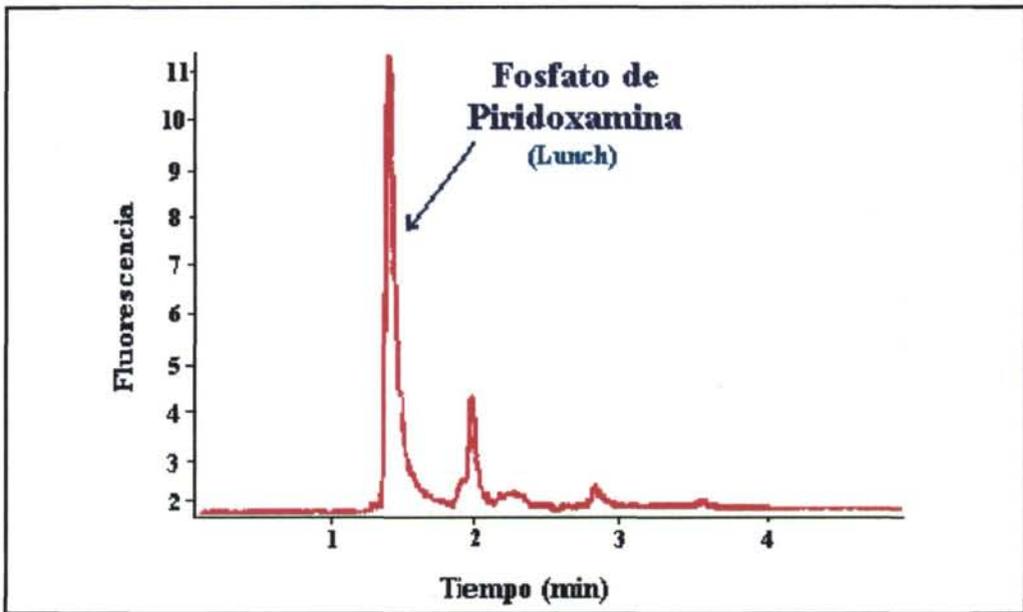


Fig. 70. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Lunch (PMP: 0,157 mg/100 g, 1,353 min)

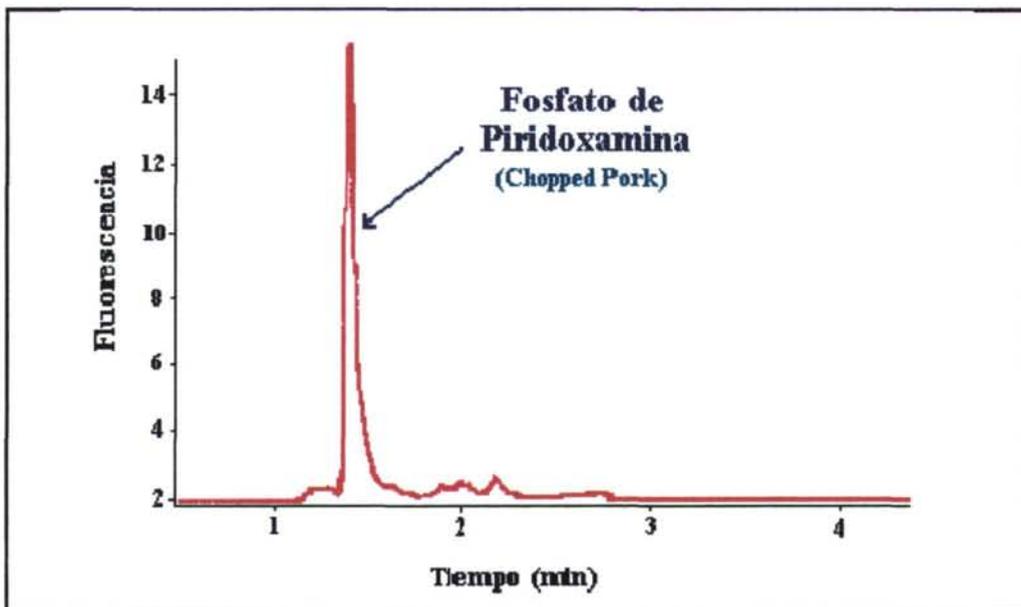


Fig. 71. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Chopped pork (PMP: 0,205 mg/100 g, 1,350 min)

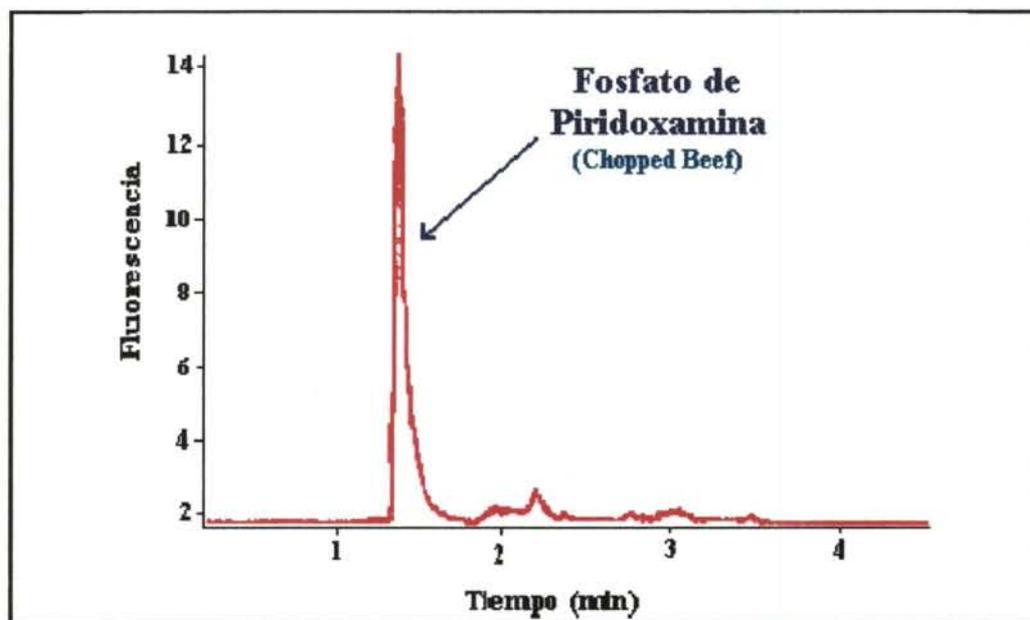


Fig. 72. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Chopped beef (PMP: 0,193 mg/100 g, 1,353 min)

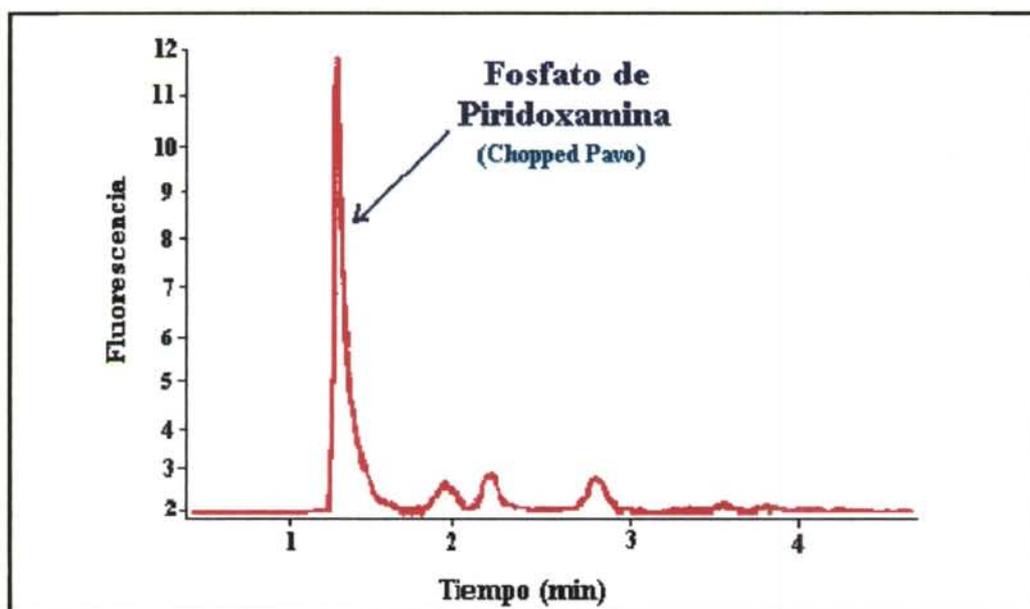


Fig. 73. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Chopped pavo (PMP: 0,164 mg/100 g, 1,360 min)

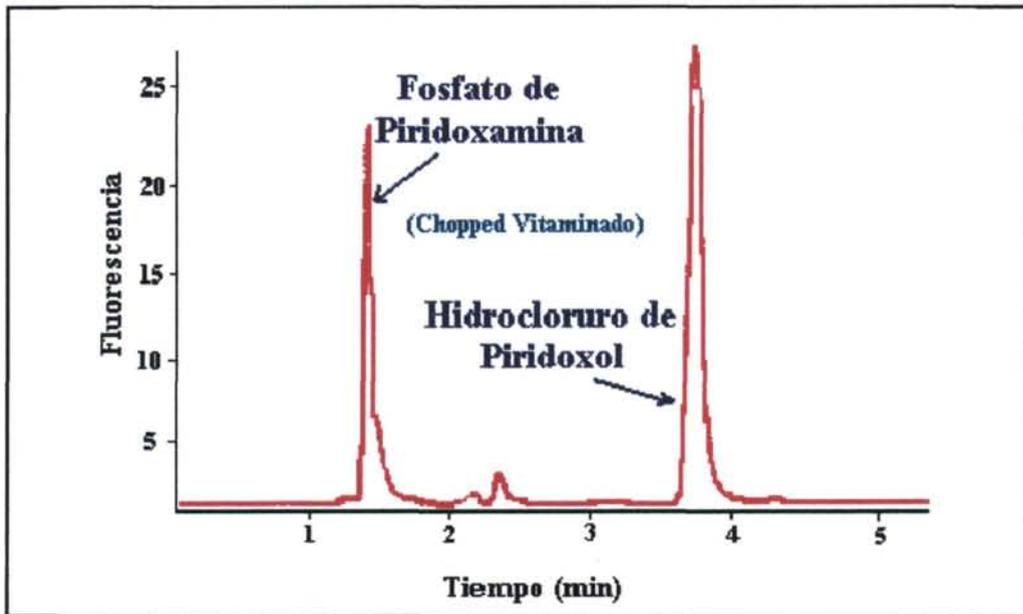


Fig. 74. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Chopped vitaminado (PMP: 0,194 mg /100 g, 1,363 min; PN: 0,651 mg/100 g, 3,744 min)

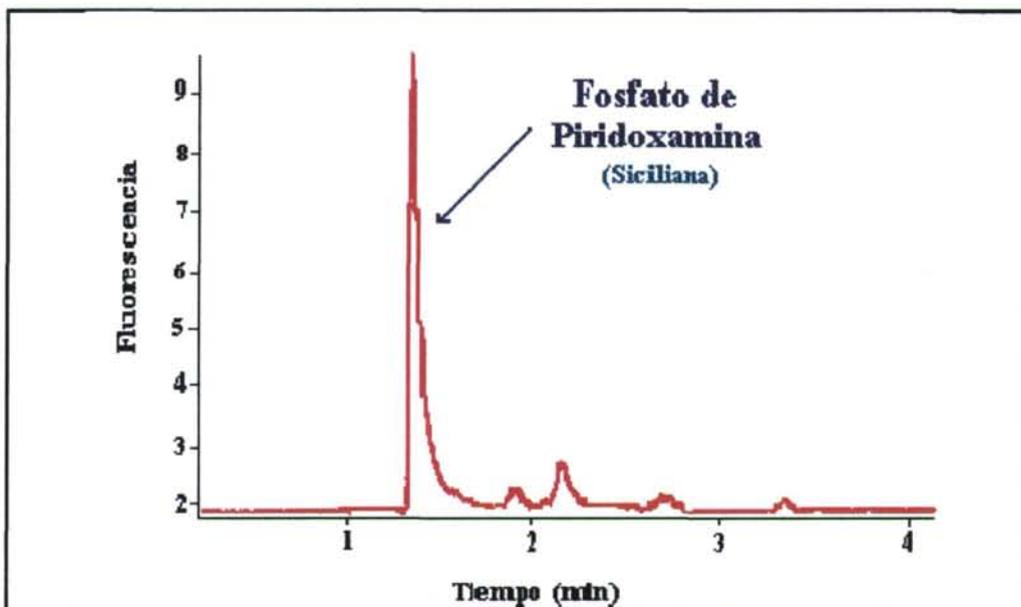


Fig. 75. Cromatograma de VITAMINA B<sub>6</sub> en Mortadela siciliana (PMP: 0,127 mg /100 g, 1,357 min)

## **6.A.1.5. VITAMINA C**

### **6.A.1.5.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de ácido L-ascórbico**

En el apartado de antecedentes bibliográficos (4.A.5.), se detallan los diferentes mecanismos de cromatografía líquida que se han utilizado en el análisis de ácido ascórbico y de otros vitámeros. En este estudio el objetivo es buscar la separación cromatográfica óptima para el ácido L-ascórbico en productos cárnicos cocidos, por lo que se ha ensayado un método de separación en fase inversa sobre una fase estacionaria de tipo polar (Dennison *et al.*, 1981; Morawski, 1984), evitando de esta forma la necesidad de empleo de los reactivos de par-iónico usados en la cromatografía en fase inversa sobre fases apolares (columnas C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) (tablas 26-30); puesto que en este caso dada la naturaleza polar del ácido ascórbico tendrían que ser usados para mejorar la retención sobre la columna.

Se ha seleccionado como columna un cartucho Spherisorb NH<sub>2</sub> (5 µm, 25 x 0,4 cm DI), que se caracteriza por tener enlazados grupos amino sobre la superficie de las micropartículas de sílice. Después, se ha estudiado la composición óptima de la fase móvil. En este proceso de separación basta la adición de un tampón adecuado a la fase móvil para lograr buenos resultados. Se ensayan mezclas de acetonitrilo-tampón fosfato (60:40 v/v) en eluciones isocráticas operando a diferentes concentraciones de tampón (10, 20 y 50 mM) para un valor de pH de 3,6. Esta condición ácida reduce el riesgo de degradación oxidativa del ácido ascórbico. El ensayo se ha aplicado a un patrón puro de ácido ascórbico de 75 µg.

Observando los cromatogramas que se han obtenido en seis inyecciones efectuadas para cada uno de los casos estudiados, en la medida que la concentración de tampón aumenta desde 10 a 50 mM, el tiempo de retención disminuye en 2,4 min. En vista de los resultados obtenidos, se ha decidido emplear la concentración de 20 mM para el tampón fosfato, que permite obtener

una señal simétrica para el patrón estudiado con un tiempo de retención de 3,433 min.

Por ello, para la separación y cuantificación del ácido L-ascórbico se ha utilizado como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-tampón fosfato 20 mM a pH 3,6 en una proporción de (60:40 v/v), operando con una velocidad de flujo de 1,000 ml/min.

El ácido L-ascórbico tiene fuerte absorción ultravioleta, encontrándose mediante el espectro de la vitamina que el máximo corresponde en las condiciones ácidas de operación a una longitud de onda de 248 nm, variando dicha longitud con el valor de pH.

Cuando la cromatografía en fase inversa se realiza sobre una columna en fase amino, la variable temperatura afecta fuertemente la retención (Gilpin & Sisco, 1980). Se han ensayado las condiciones óptimas de operación a tres temperaturas (35, 40 y 60 °C), observándose que a 35 °C el pico cromatográfico obtenido para el ácido ascórbico presenta buena resolución a un tiempo de 3,433 min, al ir aumentando la temperatura el tiempo de retención disminuye, de modo que a 60 °C el tiempo de retención es 2,764 min. Dada la inestabilidad del ácido L-ascórbico al calor, se ha preferido trabajar a una temperatura de 35 °C.

Se ha apreciado que el deterioro de esta columna es notable después de 100 inyecciones afectando a la resolución de la vitamina, lo que no ocurre en las columnas en fase apolar (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) con ese mismo número de análisis. Puede deberse a la pérdida de algún grupo amino, probablemente debido a la formación de bases de Schiff (Woidich *et al.*, 1978).

El método cromatográfico se ha aplicado al patrón obteniendo el cromatograma de la figura 76. El ácido L-ascórbico eluye como un pico simétrico y bien definido.

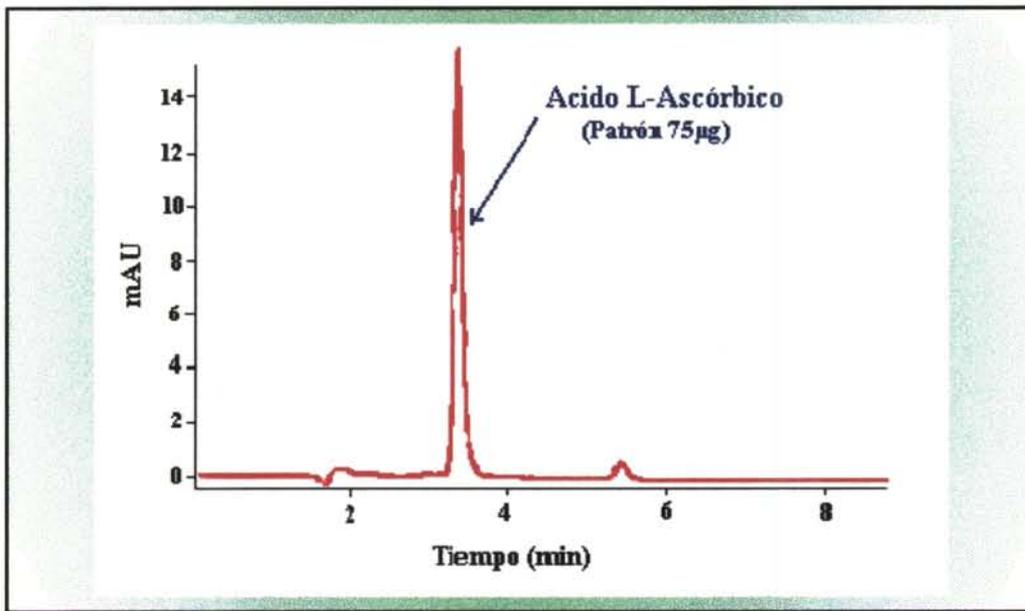


Fig. 76. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Patrón (75 µg; 3,433 min)

#### 6.A.1.5.2. Estudio para la optimización del agente de extracción para el ácido L-ascórbico a partir de productos cárnicos cocidos

La rápida descomposición del ácido ascórbico en soluciones acuosas en presencia de la luz y el aire, ha sido objeto de muchas investigaciones, encontrándose que la reacción de oxidación hasta ácido dehidroascórbico se acelera por variables como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, así como por la presencia de álcalis e iones metálicos pesados,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (DeLeenheer *et al.*, 1992). Intentando inhibir este proceso se ha buscado un método de extracción para el ácido ascórbico en condiciones ácidas que asegure su máxima estabilidad.

Las muestras analizadas tienen naturaleza proteica, por lo que la extracción debe implicar la precipitación de las proteínas para eliminar interferentes, facilitando la clarificación del extracto. El ácido metafosfórico fue recomendado como el agente de extracción más apropiado (Ponting, 1943), ya que al inactivar el efecto catalítico de la ácido ascórbico oxidasa y del cobre, retarda la oxidación del ácido ascórbico. Para la optimización del método se han seleccionado dos agentes extractantes, el ácido metafosfórico (tablas 26-30) y el ácido tricloroacético (Carr *et al.*, 1983; Speek *et al.*, 1984) que también precipita las proteínas y tiene la ventaja de ser más estable que el  $\text{HPO}_3$ . Se han ensayado ambos al 5% (p/v) de concentración, en dos productos distintos (lunch y chopped vitaminado).

Se recomienda en ambos casos la adición de una pequeña cantidad de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agente quelante muy efectivo para cationes divalentes (Archer *et al.*, 1980). El reactivo quela, el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  en soluciones ácidas, quedando eliminados de las reacciones catalíticas de oxidación-reducción.

La tabla 74 presenta los datos del estudio. Como se observa, ambos agentes extractantes presentan un comportamiento similar, sin embargo los cromatogramas con menos impurezas se obtienen empleando ácido

metafosfórico, por lo que se ha decidido su utilización, lo que asegura mayor vida útil para la columna cromatográfica.

TABLA 74. Efecto del agente extractante en la determinación de ACIDO L-ASCORBICO

Muestra	Extracción ácida	
	METAFOFORICO (mg/100 g) <sup>a</sup>	TRICLOROACETICO (mg/100 g) <sup>a</sup>
Lunch	22,643 ± 1,093	21,503 ± 1,050
Chopped vitaminado	48,546 ± 1,635	49,754 ± 1,822

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=6) ± SD por duplicado

### 6.A.1.5.3. Determinación de los parámetros analíticos

#### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de mortadela siciliana y los resultados se presentan en la tabla 75.

TABLA 75. Determinación de ACIDO L-ASCORBICO: Precisión

<b>Muestra</b>	<b>n</b>	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	<b>CV</b> (%)
Mortadela siciliana <sup>a</sup>	1	25,851 ± 0,303	1,2
Mortadela siciliana <sup>b</sup>	10	25,463 ± 0,974	3,8

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

### EXACTITUD

Los resultados de exactitud para el ácido L-ascórbico se detallan en la tabla 76.

TABLA 76. Determinación de ACIDO L-ASCORBICO: Exactitud

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad presente</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad adicionada</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad hallada</b> (mg/100 g)	<b>Recuperación</b> (%)
Mortadela siciliana <sup>a</sup>	-		25,997	
	-		25,474	
	-		26,271	
	-		25,589	
	-		25,732	
	-		26,044	
	$\bar{x} \pm SD$			25,851 $\pm$ 0,303
	25,851	13,300	38,123	92,3
	25,851	13,300	38,012	91,4
	25,851	13,300	38,096	92,1
$\bar{x} \pm SD$			38,077 $\pm$ 0,058	91,9 $\pm$ 0,5
	25,851	25,000	49,324	93,9
	25,851	25,000	49,539	94,8
	25,851	25,000	49,908	96,2
$\bar{x} \pm SD$			49,590 $\pm$ 0,295	95,0 $\pm$ 1,2

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para el ácido L-ascórbico varía entre 91,4-96,2%, siendo el porcentaje más alto a concentraciones mayores de vitamina. La reproducibilidad

de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 1,0%.

#### 6.A.1.5.4. Sistema de calibración y ensayo

La tabla 77 contiene los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de ácido L-ascórbico detalladas en 5.B.2.1.5.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.1.5.4.

TABLA 77. Datos de calibración para ACIDO L-ASCORBICO

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu\text{g}$ )	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
3,465	50	71,38 $\pm$ 0,764
3,433	75	103,22 $\pm$ 2,764
3,443	100	149,71 $\pm$ 2,781
3,420	150	210,96 $\pm$ 2,077
3,404	200	296,94 $\pm$ 4,888

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 77. Es una línea recta en el margen de trabajo de 50-200  $\mu\text{g}$  y cubre en el alimento un rango de 16,000-67,000 (mg/100 g). El coeficiente de variación para la pendiente es 4,5%. El límite de detección corresponde a 1,600 (mg/100 g).

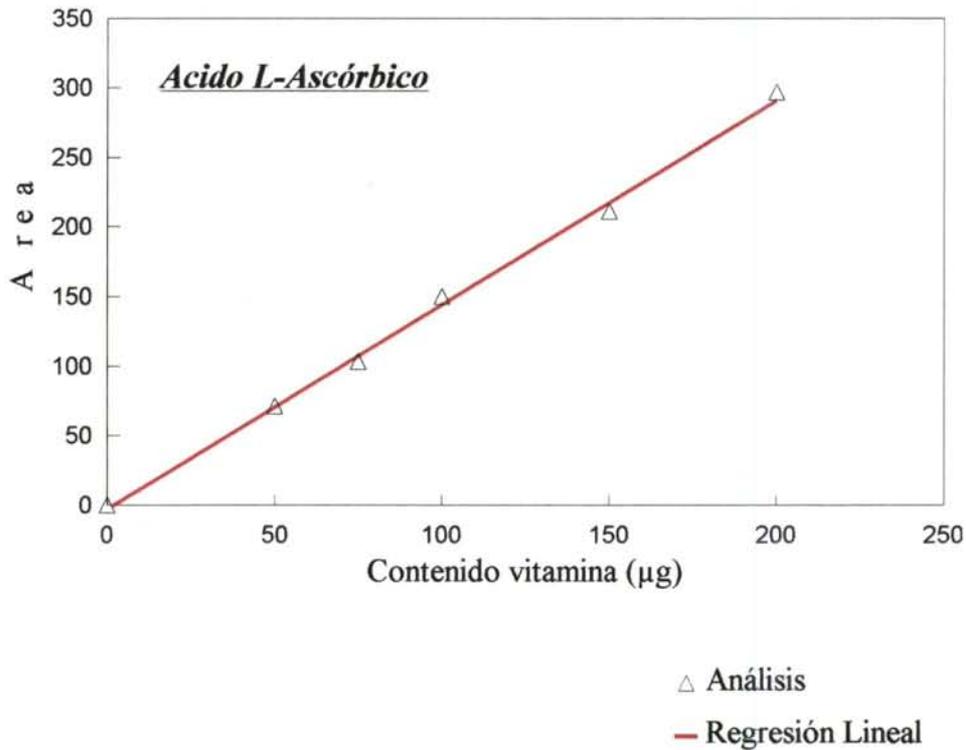


Fig. 77. Curva de calibración para ACIDO L-ASCORBICO

El resultado de la regresión se expone en la tabla 78.

TABLA 78. Regresión lineal ACIDO L-ASCORBICO = - 2,343 + 1,472 x

**RESULTADO REGRESION ACIDO L-ASCORBICO**

Constante	- 2,343
Coficiente X	1,472
Coef. correlación lineal (r)	0,9988

#### **6.A.1.5.5. Cromatogramas de ácido L-ascórbico en productos cárnicos cocidos**

La aplicación del método a los productos cárnicos cocidos permite obtener los cromatogramas de las figuras (78-83). En las muestras cárnicas varios interferentes acompañan a la señal de AA, no afectando a la resolución y la definición de ésta. Se ha observado que el tiempo de retención para el AA es poco reproducible, con un coeficiente de variación de 4,4% a lo largo del curso de un día. En consecuencia, la identificación del pico hasta ahora basada en el tiempo de retención se ha confirmado mediante el correspondiente espectro de la señal. Como se ha comentado anteriormente en este tipo de cromatografía la temperatura y la polaridad del disolvente afectan significativamente al tiempo de retención.

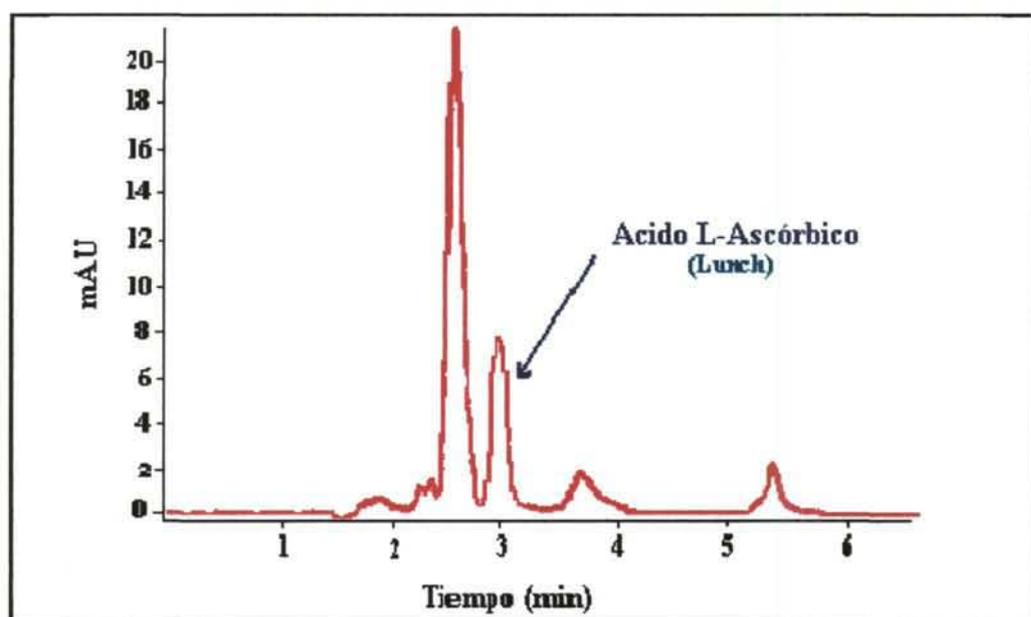


Fig. 78. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Lunch (21,053 mg/100 g; 3,031 min)

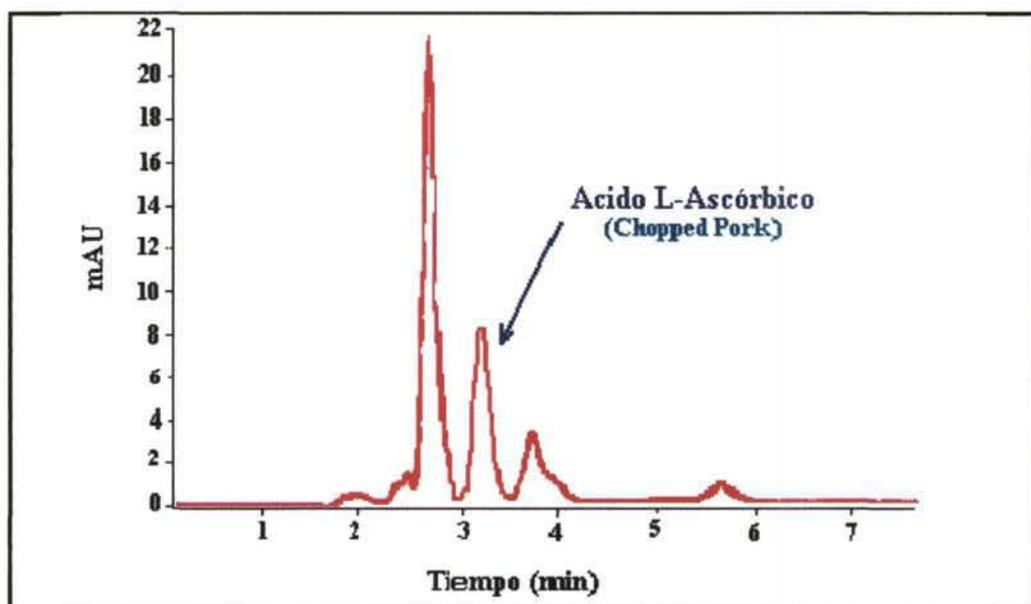


Fig. 79. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped pork (24,656 mg/100 g; 3,217 min)

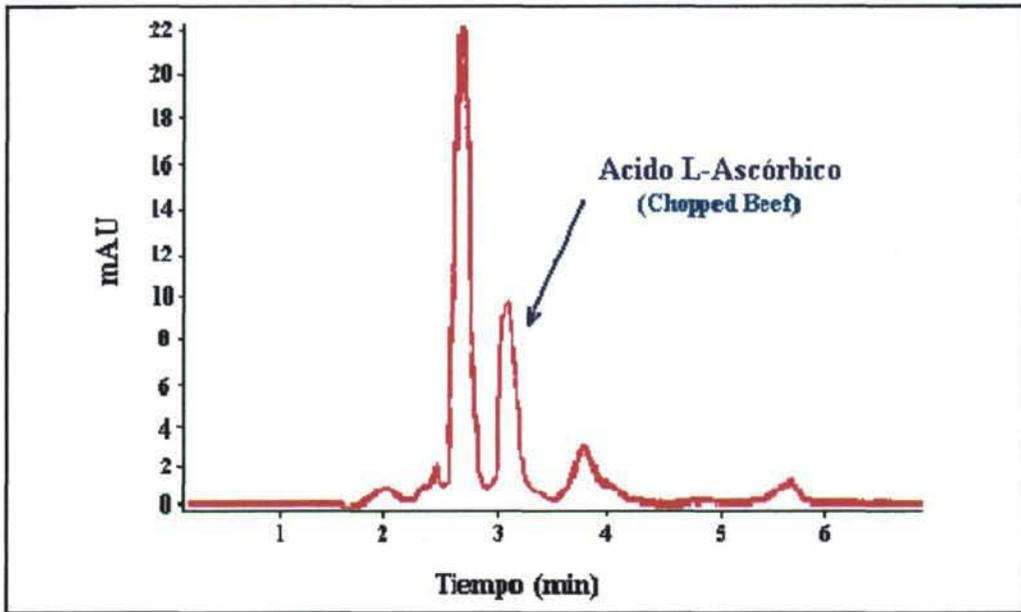


Fig. 80. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped beef (24,615 mg/100 g; 3,121 min)

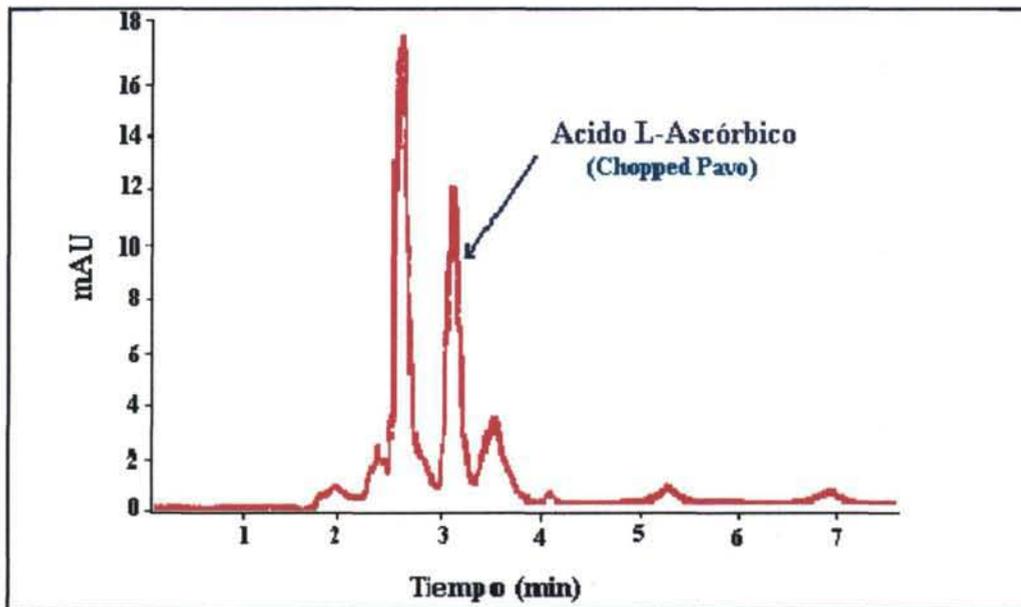


Fig. 81. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped pavo (23,136 mg/100 g; 3,204 min)

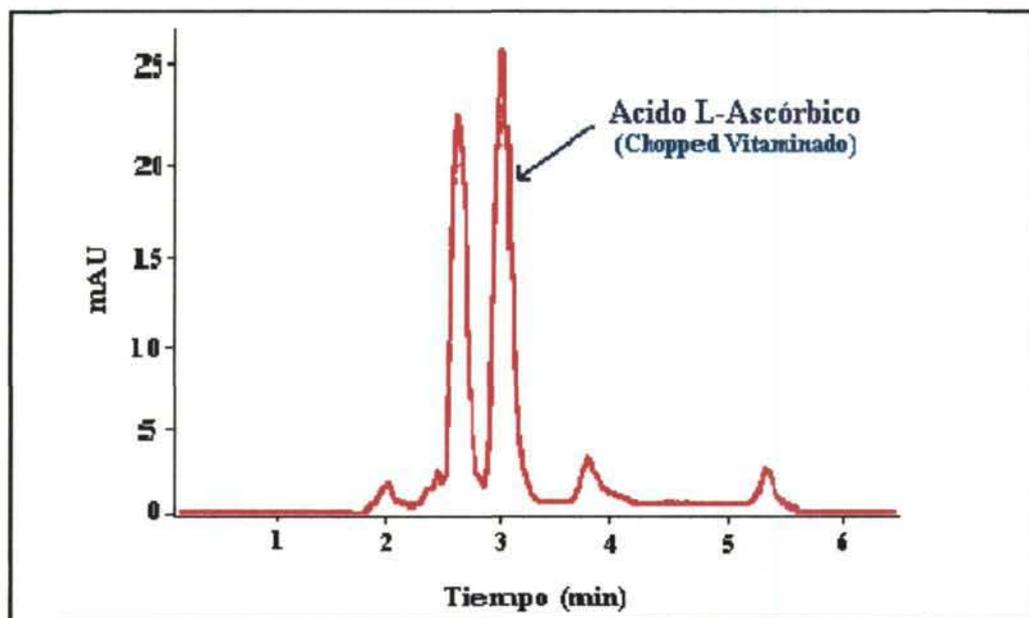


Fig. 82. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Chopped vitaminado (50,612 mg/100 g; 3,050 min)

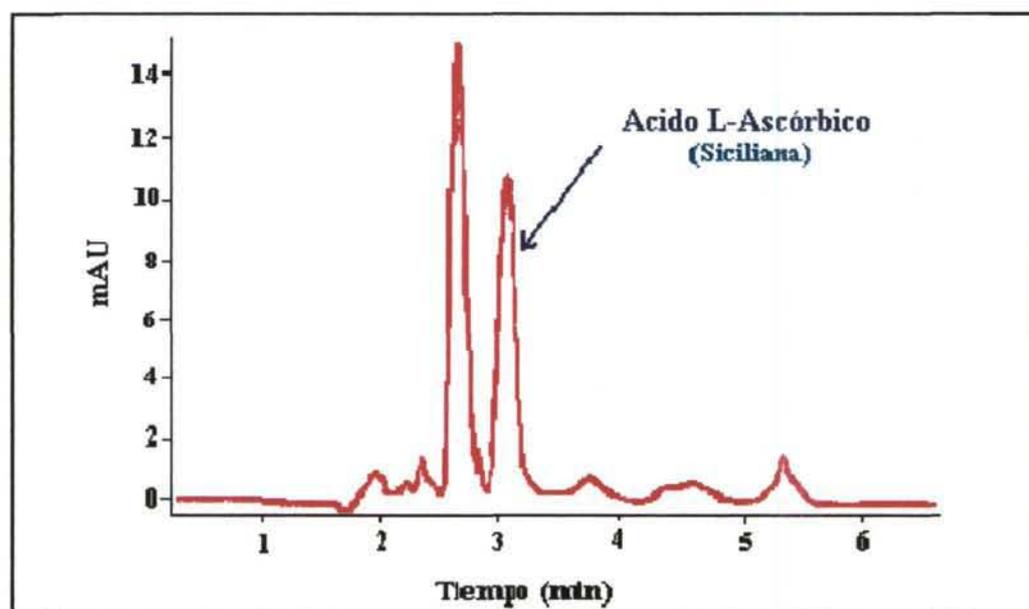


Fig. 83. Cromatograma de ACIDO L-ASCORBICO en Mortadela siciliana (24,847mg/100 g; 3,083 min)

## 6.A.2. VITAMINAS LIPOSOLUBLES

### 6.A.2.1. VITAMINAS A y E

#### 6.A.2.1.1. Estudio para la optimización de la separación cromatográfica de todo-*trans*-retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol

Se pretende optimizar la separación cromatográfica de las dos formas biológicamente más activas de estas vitaminas, el todo-*trans*-retinol y el DL- $\alpha$ -tocoferol. Revisadas las referencias bibliográficas se observa la utilización de la cromatografía de adsorción, muy adecuada en la separación de isómeros *cis/trans*, y la cromatografía de partición bien en fase normal o en fase inversa habiéndose aplicado a productos variados y diferentes a los de este estudio. En este caso el ensayo se ha iniciado con un método cromatográfico en fase inversa .

Se ha seleccionado como columna un cartucho Spherisorb ODS-2 (5  $\mu\text{m}$ , 15 x 0,4 cm DI), determinando después la composición óptima de la fase móvil. Dada la naturaleza lipofílica de estos compuestos se ha eliminado el agua en la fase móvil, para evitar el posible deterioro de la señal. Se inicia el ensayo trabajando con una fase móvil de acetonitrilo (100 v/v) en eluciones isocráticas, aplicándolo a una mezcla de acetato de todo-*trans*-retinol y acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol de 14 y 200  $\mu\text{g}$  respectivamente, que ha sido sometida previamente al proceso de saponificación y de extracción detallado en 5.B.2.2.1.4.

Observando los cromatogramas que se han obtenido en seis inyecciones efectuadas, el principal inconveniente es el tiempo de retención, que para el todo-*trans*-retinol es de 3,359 min, mientras que para el DL- $\alpha$ -tocoferol es de 10,774 min, trabajando a una temperatura de 40 °C.

Este problema de retención de lípidos en cromatografía en fase inversa fue solventado por Parris (1978) adicionando un disolvente de polaridad más baja (diclorometano o tetrahydrofurano) al disolvente (acetonitrilo). De esta forma los

compuestos lipofílicos eluyen antes y además al trabajar con una menor viscosidad de la fase móvil se opera con presiones más bajas, aumentando la vida útil de la columna.

Por lo tanto, se modifica la composición de la fase móvil, estudiándose la mezcla de acetonitrilo-tetrahidrofurano en una proporción inicial de (70:30 v/v). Los tiempos de retención han experimentado un importante cambio, pasando a ser 1,216 min para el todo-*trans*-retinol y 2,814 min para el DL- $\alpha$ -tocoferol. Se buscan unas condiciones que permitan una elución con tiempos de retención intermedios, ensayándose la mezcla anterior en una proporción de (90:10 v/v).

Se consigue una buena separación para ambas vitaminas usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-tetrahidrofurano en una proporción de (90:10 v/v), operando con una velocidad de flujo de 0,800 ml/min a una temperatura de 35 °C. El tiempo de retención en estas condiciones para el todo-*trans*-retinol ha sido de 2,320 min y para el DL- $\alpha$ -tocoferol ha sido de 5,473 min.

Aunque la vitamina A y la vitamina E tienen fluorescencia nativa, ambas no se han cuantificado mediante este tipo de detección. Aprovechando la absorción ultravioleta, se ha encontrado mediante el espectro que el máximo para el todo-*trans*-retinol corresponde en las condiciones de operación a una longitud de onda de 325 nm. La detección para el DL- $\alpha$ -tocoferol se ha realizado por fluorescencia, siendo la longitud de onda de excitación 292 nm y la longitud de onda de emisión 330 nm.

El método se ha aplicado a los patrones obteniendo los cromatogramas de las figuras 84 y 85.

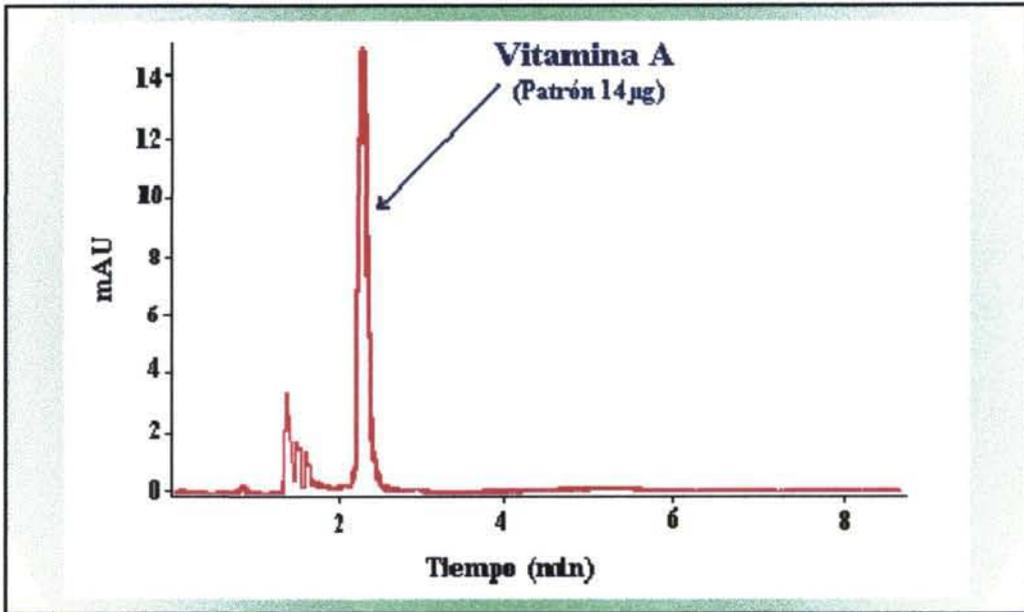


Fig. 84. Cromatograma de TODO-*TRANS*-RETINOL en Patron (14 µg; 2,320 min)

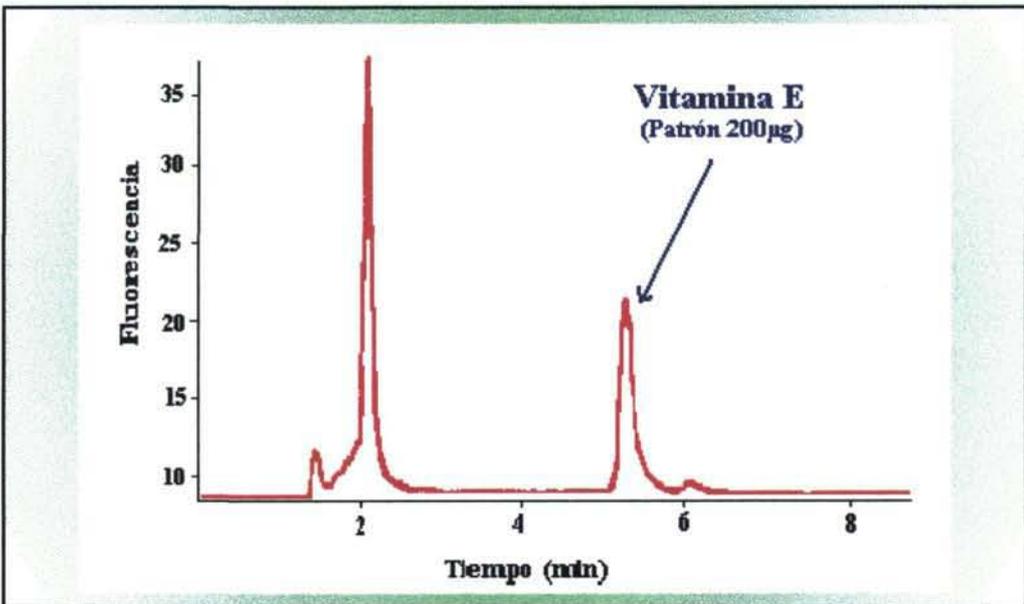


Fig. 85. Cromatograma de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en Patron (200 µg; 5,473 min)

#### **6.A.2.1.2. Estudio para la optimización de la extracción de acetato de todo-*trans*-retinol y acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol a partir de productos cárnicos cocidos**

El procedimiento analítico para estas vitaminas liposolubles implica la liberación de las mismas de la forma combinada en que pueden existir en la matriz que constituye la muestra. Muchos autores (tablas 31-33) han usado la hidrólisis alcalina (saponificación) como modo de digestión en diferentes matrices, siendo otra alternativa menos económica la hidrólisis enzimática. Este último tratamiento afecta a las uniones tipo éster liberando los ácidos grasos y los alcoholes respectivos. La saponificación de forma general en todos los estudios publicados se realiza mediante reflujo de la muestra con potasa etanólica en la presencia de un antioxidante y trabajando en una atmósfera libre de oxígeno. La cantidad de solución de potasa requerida depende del contenido de grasa de la muestra. Normalmente se usan 5 ml de solución acuosa de KOH al 60% (p/v) y 15 ml de etanol por cada gramo de grasa, incrementando la cantidad de KOH/etanol si los glóbulos grasos todavía permanecen después del período de saponificación (Reynolds, 1984). Cuando esta etapa ha concluido, la solución resultante se enfría y la materia insaponificable se extrae con un disolvente orgánico.

Se ha experimentado la saponificación en atmósfera de nitrógeno mediante reflujo en baño María a 45 °C durante 20 y 30 minutos y a temperatura ambiente sin reflujo durante toda la noche, con varias concentraciones para la solución acuosa de KOH (5 ml 60%, 10 ml 10N, 10 ml 13N y 10 ml 15N) y con 15 ml de etanol, en presencia de pirogalol como antioxidante (DeVries *et al.*, 1979). Estos autores compararon la eficacia del ácido ascórbico y del pirogalol como antioxidantes en la determinación analítica de vitamina A, encontrando que en la presencia de pirogalol las pérdidas por isomerización eran inferiores.

La tabla 79 detalla los datos obtenidos para la concentración óptima de saponificación después de los diferentes ensayos realizados. La concentración de potasa es superior a la recomendada, siendo de 10 ml de solución acuosa de KOH

13 N, porque se ha observado que con soluciones más diluídas, los glóbulos grasos no se destruyen completamente durante la etapa de saponificación. Los resultados son mejores cuando se trabaja a reflujo en un baño María a 45 °C durante 20 min que si se opera a temperatura ambiente durante toda la noche. Respecto a la extracción de la materia insaponificable, el disolvente n-hexano ha sido mejor que el éter dietílico por ser menos volátil con la ventaja de que no extrae los jabones por lo que hay menos interferentes en la determinación por HPLC. Ha sido muy utilizado por los investigadores (tablas 31-33), sin embargo, con n-hexano, el número mínimo de extracciones que se necesitan depende de la cantidad de ácidos grasos que hay, lo que no es fácil de predecir (Thompson, 1986).

El método de extracción así preparado responde adecuadamente en las muestras empleadas, siendo las concentraciones específicas para las matrices que se usan en este estudio.

TABLA 79. Efecto del proceso de saponificación en la determinación de TODO-*TRANS*-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

Muestra	Saponificación <sup>a</sup>	Todo- <i>trans</i> -retinol $\bar{x}^b (n=10) \pm SD$	DL- $\alpha$ -tocoferol $\bar{x}^b (n=10) \pm SD$
Acetato de todo- <i>trans</i> -retinol 14 $\mu$ g y Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol 200 $\mu$ g	Reflujo (45 °C, 20 min)	102,25 $\pm$ 2,043	160,43 $\pm$ 3,236
	Reflujo (45 °C, 30 min)	100,65 $\pm$ 1,964	158,86 $\pm$ 2,967
	Sin reflujo (T <sup>a</sup> ambiente, toda noche)	80,27 $\pm$ 1,620	133,43 $\pm$ 2,364

<sup>a</sup> Saponificación (10 ml solución acuosa KOH 13N y 15 ml etanol)

<sup>b</sup> Los datos representan las áreas cromatográficas obtenidas en el análisis por duplicado de las muestras

## 6.A.2.2. VITAMINA A

### 6.A.2.2.1. Determinación de los parámetros analíticos

#### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de chopped vitaminado y los resultados se presentan en la tabla 80.

TABLA 80. Determinación de TODO-*TRANS*-RETINOL: Precisión

Muestra	n	$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )	CV (%)
Chopped vitaminado <sup>a</sup>	1	99,300 $\pm$ 1,033	1,0
Chopped vitaminado <sup>b</sup>	10	103,640 $\pm$ 3,522	3,4

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

#### EXACTITUD

Los resultados de exactitud para todo-*trans*-retinol se detallan en la tabla 81.

TABLA 81. Determinación de TODO-*TRANS*-RETINOL: Exactitud

Muestra	Cantidad presente ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Cantidad hallada ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Recuperación (%)
Chopped vitaminado <sup>a</sup>	-		101,000	
	-		98,000	
	-		99,000	
	-		99,000	
	-		100,000	
	-		99,000	
	$\bar{x} \pm \text{SD}$			99,300 $\pm$ 1,033
	99,300	44,000	140,000	92,5
	99,300	44,000	139,000	90,2
	99,300	44,000	140,000	92,5
$\bar{x} \pm \text{SD}$			139,670 $\pm$ 0,577	91,7 $\pm$ 1,3
	99,300	88,000	182,000	94,0
	99,300	88,000	183,000	95,1
	99,300	88,000	181,000	92,8
$\bar{x} \pm \text{SD}$			182,000 $\pm$ 1,000	94,0 $\pm$ 1,2

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para el todo-*trans*-retinol varía entre 90,2-95,1%. La reproducibilidad de la exactitud se ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 1,1%.

**6.A.2.2.2. Sistema de calibración y ensayo**

La tabla 82 contiene los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de vitamina A detalladas en 5.B.2.2.1.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.2.1.4.

TABLA 82. Datos de calibración para ACETATO DE TODO-*TRANS*-RETINOL

<b>Tiempo de retención</b> (min)	<b>Contenido vitamina</b> ( $\mu\text{g}$ )	<b>Area cromatográfica</b> $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
2,317	3,5	24,01 $\pm$ 0,866
2,319	7	54,43 $\pm$ 1,393
2,320	14	101,50 $\pm$ 2,221
2,318	17,5	139,38 $\pm$ 1,474
2,321	21	153,87 $\pm$ 2,180

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 86. Es una línea recta en el margen de trabajo de 3,5-21  $\mu\text{g}$  y cubre en el alimento un rango de 50,000-300,000 ( $\mu\text{g}/100$  g). El coeficiente de variación para la pendiente es 8,5%. El límite de detección corresponde a 9,900 ( $\mu\text{g}/100$  g).

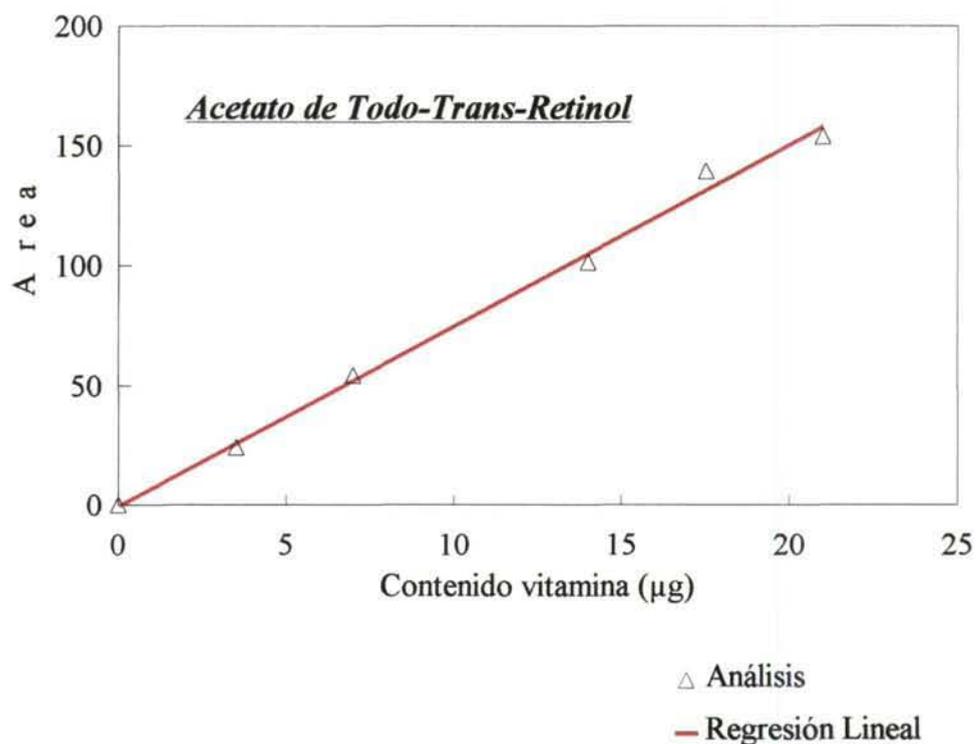


Fig. 86. Curva de calibración para ACETATO DE TODO-*TRANS*-RETINOL

El resultado de la regresión se expone en la tabla 83.

TABLA 83. Regresión lineal ACETATO DE TODO-*TRANS*-RETINOL

$$= - 0,359 + 7,545 x$$

### RESULTADO REGRESION ACETATO DE TODO-*TRANS*-RETINOL

Constante	- 0,359
Coefficiente X	7,545
Coef. correlación lineal (r)	0,9975

### 6.A.2.3. VITAMINA E

#### 6.A.2.3.1. Determinación de los parámetros analíticos

##### PRECISION

El estudio se ha ensayado con la muestra de chopped vitaminado y los resultados se presentan en la tabla 84.

TABLA 84. Determinación de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL: Precisión

Muestra	n	$\bar{x} \pm SD$ (mg/100 g)	CV (%)
Chopped vitaminado <sup>a</sup>	1	2,137 $\pm$ 0,024	1,1
Chopped vitaminado <sup>b</sup>	10	2,165 $\pm$ 0,057	2,6

<sup>a</sup> Análisis de seis réplicas de una única muestra durante un día

<sup>b</sup> Análisis por duplicado de diez muestras diferentes durante tres meses

##### EXACTITUD

Los resultados de exactitud para DL- $\alpha$ -Tocoferol se detallan en la tabla 85.

TABLA 85. Determinación de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL: Exactitud

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad presente</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad adicionada</b> (mg/100 g)	<b>Cantidad hallada</b> (mg/100 g)	<b>Recuperación</b> (%)
Chopped vitaminado <sup>a</sup>				
	-		2,164	
	-		2,104	
	-		2,117	
	-		2,148	
	-		2,129	
	-		2,160	
$\bar{x} \pm SD$			2,137 $\pm$ 0,024	
	2,137	0,520	2,493	93,8
	2,137	0,520	2,475	93,1
	2,137	0,520	2,440	91,8
$\bar{x} \pm SD$			2,469 $\pm$ 0,027	92,9 $\pm$ 1,0
	2,137	1,040	3,003	94,5
	2,137	1,040	2,975	93,6
	2,137	1,040	3,013	94,8
$\bar{x} \pm SD$			2,997 $\pm$ 0,020	94,3 $\pm$ 0,6

<sup>a</sup> Análisis de doce réplicas de una única muestra durante un día

La recuperación para el DL- $\alpha$ -tocoferol oscila entre 91,8-94,8% siendo la variación menor a altas concentraciones. La reproducibilidad de la exactitud se

ha estudiado durante cinco días sucesivos, obteniendo un coeficiente de variación de 0,7%.

#### 6.A.2.3.2. Sistema de calibración y ensayo

La tabla 86 contiene los datos de calibración obtenidos para las concentraciones de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol detalladas en 5.B.2.2.2.3. siguiendo el procedimiento analítico descrito en 5.B.2.2.2.4.

TABLA 86. Datos de calibración para ACETATO DE DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

Tiempo de retención (min)	Contenido vitamina ( $\mu$ g)	Area cromatográfica $\bar{x}$ (n=6) $\pm$ SD
-	0	0,00 $\pm$ 0,000
5,483	50	37,52 $\pm$ 0,651
5,485	100	83,50 $\pm$ 0,709
5,476	150	108,22 $\pm$ 1,961
5,473	200	163,30 $\pm$ 3,028
5,484	250	205,47 $\pm$ 3,189

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 87. Es una línea recta en el margen de trabajo de 50-250  $\mu$ g y cubre en el alimento un rango de 0,700-3,600 (mg/100 g). El coeficiente de variación para la pendiente es 7,6%. El límite de detección corresponde a 0,130 (mg/100 g).

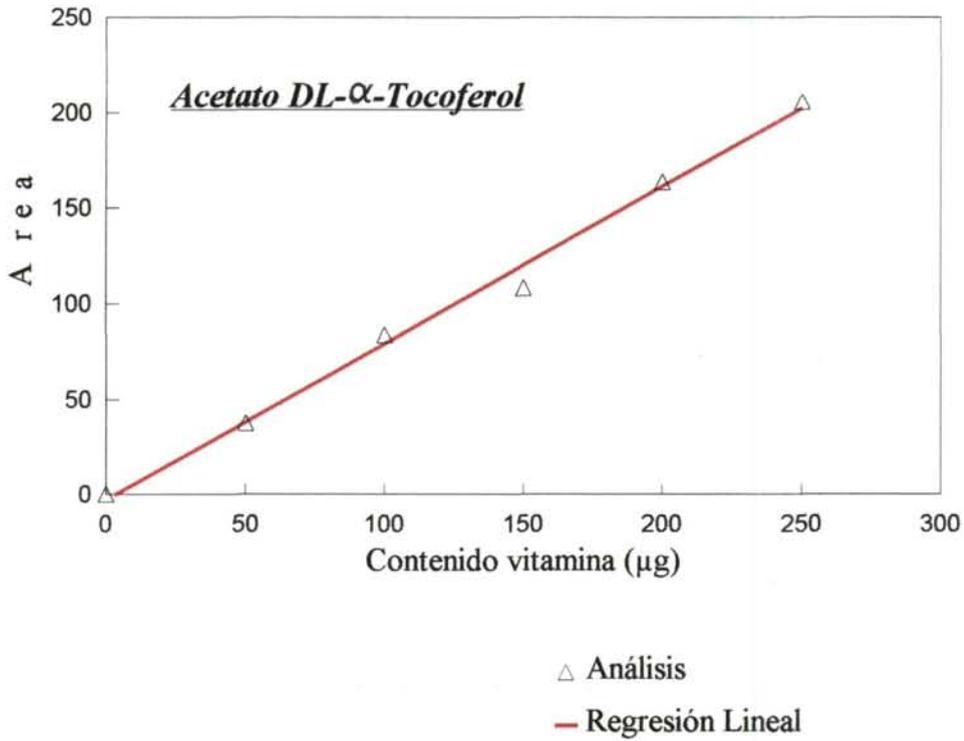


Fig. 87. Curva de calibración para ACETATO DE DL-α-TOCOFEROL

El resultado de la regresión se expone en la tabla 87.

TABLA 87. Regresión lineal ACETATO DE DL-α-TOCOFEROL

$$= - 2,432 + 0,817 x$$

### RESULTADO REGRESION ACETATO DE DL-α-TOCOFEROL

Constante	- 2,432
Coefficiente X	0,817
Coef. correlación lineal (r)	0,9968

#### **6.A.2.3.3. Cromatogramas de todo-*trans*-retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol en productos cárnicos cocidos**

Se ha aplicado el método en los productos objeto de estudio obteniendo los cromatogramas de las figuras 88 y 89. No se han detectado estas vitaminas en los productos estudiados excepto en el chopped vitaminado que ha sido enriquecido vitamínicamente. Las señales cromatográficas en este caso son bien definidas, simétricas y libres de interferencias. La identificación se ha basado en el tiempo de retención, siendo los coeficientes de variación 0,5% para el todo-*trans*-retinol y 0,4% para el DL- $\alpha$ -tocoferol.

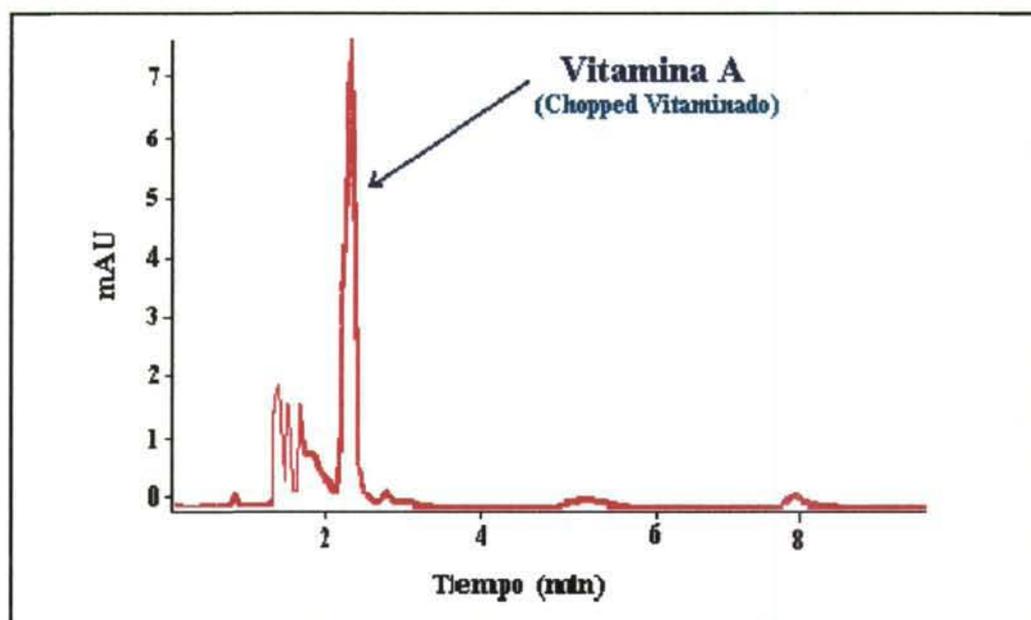


Fig. 88. Cromatograma de TODO-*TRANS*-RETINOL en Chopped vitaminado (99,000 $\mu$ g/100 g; 2,336 min)

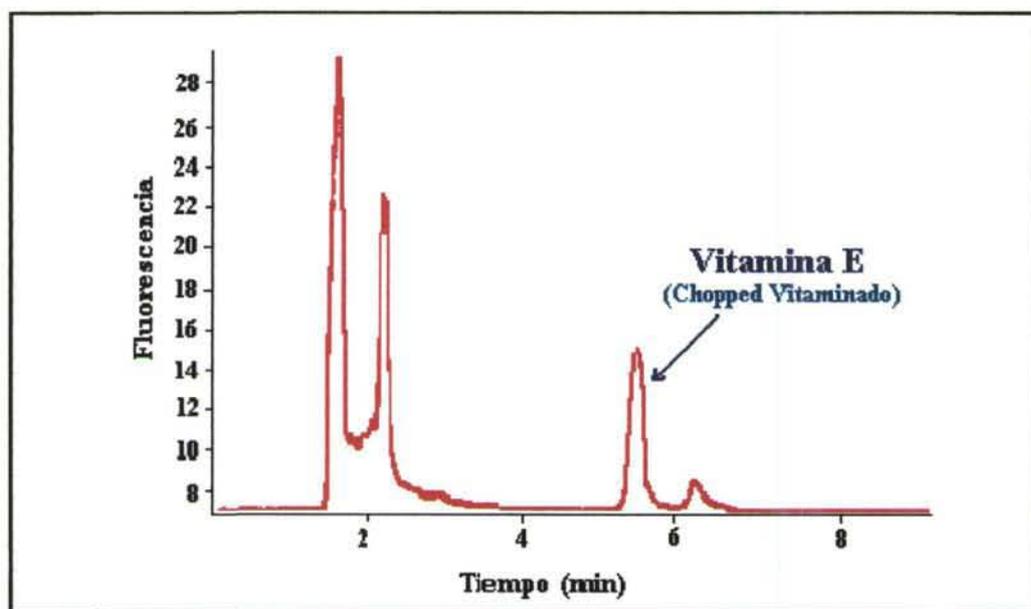


Fig. 89. Cromatograma de DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en Chopped vitaminado (2,146 mg /100 g; 5,503 min)

**6.B. CONTENIDO DE VITAMINAS EN  
PRODUCTOS CARNICOS COCIDOS**

El estudio de los productos cárnicos cocidos, se ha hecho en dos fases del proceso de elaboración: antes de ser tratados por el calor (fase de amasado) y después de ser tratados por el calor (producto acabado). Como ya se ha indicado los alimentos estudiados han sido: lunch, chopped pork, chopped beef, chopped de pavo, chopped vitaminado y mortadela siciliana. El producto amasado y acabado proceden de un mismo lote de fabricación. Para cada producto se han obtenido valores promedio de veinte muestras analizadas por duplicado durante un período de cuatro meses. El cálculo del contenido de las diversas vitaminas presentes en las muestras se detalla en el apartado de determinaciones analíticas (5.B.2.).

#### **6.B.1. Contenido de vitaminas en productos cárnicos cocidos antes de ser tratados por el calor**

Los datos sobre el contenido de vitaminas en los diversos productos ensayados durante la fase de amasado se han recogido en las tablas (88-95). La concentración de **tiamina** varía entre 0,145-0,525 mg/100 g de unos productos a otros, dependiendo de las materias primas que los integran. Destaca por su alto contenido el lunch (0,525 mg/100 g), incluso más que el chopped vitaminado (0,425 mg/100 g, enriquecido vitamínicamente) y por su bajo contenido el chopped de pavo (0,040 mg/100 g). La reproducibilidad de resultados durante el período de trabajo se ha considerado adecuada, dadas las bajas concentraciones (mg/100 g) que se manejan y teniendo en cuenta que el contenido vitamínico de estas muestras depende de la composición de los tejidos animales que componen la materia prima, experimentando variaciones según la especie animal y la alimentación recibida.

La diferencia en el contenido de **riboflavina** entre los productos sin enriquecimiento vitamínico es relativamente grande, variando entre 0,118-0,193 mg/100 g. Son concentraciones bajas, si se comparan con las del chopped vitaminado (0,694 mg/100 g).

Respecto a la **niacina**, los niveles encontrados en los productos sin tratamiento vitamínico varían entre 2,655-3,808 mg/100 g, siendo la forma predominante la nicotinamida (1,974-2,888 mg/100 g). La concentración de ácido nicotínico es baja (0,915-1,428), no detectándose en el chopped pork y el chopped beef por estar en el límite de detección. El chopped vitaminado se ha enriquecido con nicotinamida (8,722 mg/100 g). El coeficiente de variación de los resultados es adecuado para las concentraciones de trabajo, considerando los cambios de composición que pueden tener los tejidos animales.

La **vitamina B<sub>6</sub>** se halla en estos productos en forma de fosfato de piridoxamina (PMP), uno de los principales vitámeros en la carne (Vanderslice *et al.*, 1984). Las cantidades encontradas son bajas (0,131-0,214 mg/100 g), con pequeña variación de un producto a otro. El chopped vitaminado se ha suplementado con piridoxina (PN), la forma más estable, alcanzando una concentración de 0,862 mg/100 g entre los dos vitámeros (PMP y PN). La reproducibilidad es buena considerando las concentraciones en las que se trabaja.

La cantidad de **ácido L-ascórbico** es alta (22,456-25,868 mg/100 g) y presenta poca oscilación en los varios productos analizados. Sin embargo, hay que considerar que la materia prima que los compone carece de vitamina C, por lo tanto esa concentración procede del ascorbato de sodio usado como antioxidante en la elaboración de los mismos. El chopped vitaminado contiene mayor proporción (52,302 mg/100 g). La reproducibilidad de los resultados ha sido satisfactoria dependiendo en este caso de la mayor o menor homogeneidad entre las muestras en el proceso de elaboración, no influyendo la composición de los tejidos que integran la materia prima.

Las **vitaminas liposolubles (todo-*trans*-retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol)** no se hallan en los productos cárnicos estudiados, solamente aparecen en el chopped vitaminado por haber sido tratado con un suplemento vitamínico en su elaboración. Se le han adicionado estas vitaminas en forma de sal (acetato de todo-*trans*-retinol y acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol), pero después del proceso de saponificación se convierten en las formas alcohólicas (todo-*trans*-retinol y DL-

$\alpha$ -tocoferol) con contenidos de 107,550 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y 2,308 ( $\text{mg}/100\text{ g}$ ) respectivamente.

Todos los datos numéricos que se detallan representan valores promedios.

TABLA 88. Valores de TIAMINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	TIAMINA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	0,520	0,162	0,146	0,039	0,401	0,139
2	0,543	0,169	0,153	0,044	0,415	0,144
3	0,468	0,180	0,159	0,039	0,426	0,139
4	0,557	0,189	0,173	0,032	0,415	0,143
5	0,560	0,195	0,169	0,035	0,437	0,156
6	0,569	0,185	0,164	0,042	0,473	0,148
7	0,587	0,184	0,167	0,048	0,419	0,156
8	0,521	0,164	0,163	0,043	0,393	0,159
9	0,526	0,179	0,156	0,038	0,435	0,142
10	0,510	0,185	0,167	0,037	0,393	0,145
11	0,518	0,184	0,168	0,043	0,385	0,143
12	0,494	0,191	0,162	0,044	0,425	0,149
13	0,482	0,168	0,151	0,039	0,431	0,140
14	0,495	0,175	0,156	0,037	0,508	0,138
15	0,540	0,163	0,153	0,039	0,374	0,143
16	0,553	0,161	0,151	0,043	0,453	0,144
17	0,514	0,186	0,145	0,044	0,483	0,149
18	0,494	0,181	0,154	0,043	0,434	0,142
19	0,510	0,172	0,147	0,040	0,411	0,138
20	0,529	0,169	0,160	0,038	0,394	0,145
$\bar{x} \pm SD$	0,525 $\pm$ 0,031	0,177 $\pm$ 0,010	0,158 $\pm$ 0,008	0,040 $\pm$ 0,004	0,425 $\pm$ 0,034	0,145 $\pm$ 0,006
CV(%)	5,9	5,6	5,1	10,0	8,0	4,1

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 89. Valores de RIBOFLAVINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	RIBOFLAVINA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	0,192	0,164	0,159	0,194	0,739	0,119
2	0,191	0,159	0,161	0,190	0,745	0,121
3	0,192	0,162	0,153	0,184	0,712	0,119
4	0,187	0,161	0,157	0,176	0,716	0,117
5	0,177	0,157	0,152	0,179	0,694	0,120
6	0,201	0,150	0,160	0,181	0,659	0,115
7	0,202	0,153	0,163	0,177	0,653	0,107
8	0,204	0,146	0,152	0,177	0,613	0,113
9	0,196	0,149	0,147	0,169	0,677	0,114
10	0,185	0,154	0,151	0,161	0,676	0,113
11	0,186	0,149	0,149	0,165	0,678	0,112
12	0,203	0,155	0,146	0,174	0,673	0,115
13	0,204	0,153	0,145	0,171	0,686	0,113
14	0,207	0,152	0,163	0,173	0,716	0,109
15	0,189	0,156	0,154	0,179	0,720	0,107
16	0,210	0,155	0,155	0,175	0,706	0,128
17	0,184	0,149	0,153	0,179	0,683	0,129
18	0,193	0,162	0,149	0,180	0,696	0,131
19	0,183	0,157	0,154	0,183	0,715	0,127
20	0,174	0,163	0,159	0,181	0,724	0,128
$\bar{x} \pm SD$	0,193 $\pm$ 0,010	0,155 $\pm$ 0,005	0,154 $\pm$ 0,005	0,177 $\pm$ 0,008	0,694 $\pm$ 0,032	0,118 $\pm$ 0,007
CV(%)	5,2	3,2	3,2	4,5	4,6	5,9

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 90. Valores de NICOTINAMIDA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	NICOTINAMIDA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	2,397	2,950	2,583	2,439	8,492	2,149
2	2,526	2,893	2,628	2,519	8,496	2,107
3	2,469	2,879	2,638	2,483	8,665	2,048
4	2,473	2,865	2,569	2,426	8,546	2,075
5	2,285	2,713	2,834	2,533	8,273	1,787
6	2,229	2,761	3,034	2,581	8,099	1,826
7	2,348	2,739	3,054	2,555	8,202	1,809
8	2,298	2,783	2,836	2,591	8,263	1,842
9	2,339	2,764	3,095	2,516	9,496	1,902
10	2,417	2,783	2,982	2,750	9,204	1,927
11	2,316	2,452	3,049	2,476	9,168	1,946
12	2,366	2,493	2,913	2,623	8,887	1,899
13	1,925	2,295	2,819	2,489	9,721	2,172
14	1,921	2,364	2,782	2,325	9,644	2,224
15	1,872	2,206	2,894	2,407	9,537	2,149
16	2,268	2,252	2,858	2,498	9,596	2,117
17	2,357	2,557	3,094	2,564	7,991	1,866
18	2,368	2,872	3,189	2,749	8,329	1,934
19	2,424	2,680	2,907	2,808	7,798	1,838
20	2,434	2,789	2,992	2,328	8,034	1,856
$\bar{x} \pm SD$	2,302 $\pm$ 0,186	2,655 $\pm$ 0,232	2,888 $\pm$ 0,180	2,533 $\pm$ 0,129	8,722 $\pm$ 0,631	1,974 $\pm$ 0,141
CV(%)	8,1	8,7	6,2	5,1	7,2	7,1

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 91. Valores de ACIDO NICOTINICO en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	ACIDO NICOTINICO					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	1,069	ND	ND	1,327	1,530	1,003
2	1,120	ND	ND	1,273	1,393	0,973
3	1,029	ND	ND	1,204	1,484	0,874
4	0,996	ND	0,238	1,254	1,527	0,890
5	1,127	0,209	ND	1,314	1,304	0,903
6	1,072	ND	ND	1,290	1,277	0,921
7	1,090	0,226	ND	1,319	1,419	0,906
8	1,120	0,243	0,214	1,282	1,333	0,894
9	1,132	ND	ND	1,184	1,418	0,891
10	1,070	ND	ND	1,216	1,521	0,930
11	1,002	0,236	0,203	1,230	1,506	0,917
12	0,973	0,201	ND	1,315	1,324	0,920
13	1,124	ND	ND	1,330	1,458	0,876
14	1,065	ND	ND	1,283	1,537	0,904
15	1,108	ND	ND	1,334	1,442	0,893
16	0,993	ND	ND	1,270	1,395	0,902
17	0,984	ND	0,201	1,314	1,380	0,892
18	1,022	ND	ND	1,235	1,474	0,930
19	1,127	ND	ND	1,273	1,508	0,936
20	1,096	ND	ND	1,262	1,334	0,945
$\bar{x} \pm SD$	1,066 ± 0,055			1,275 ± 0,044	1,428 ± 0,083	0,915 ± 0,032
CV(%)	5,2			3,5	5,8	3,5

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 92. Valores de NIACINA en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	Nicotinamida (mg/100 g) <sup>a</sup>	Acido Nicotínico (mg/100 g) <sup>a</sup>	NIACINA (mg/100 g) <sup>b</sup>
Lunch	2,302	1,066	3,368
Chopped pork	2,655	ND	2,655
Chopped beef	2,888	ND	2,888
Chopped pavo	2,533	1,275	3,808
Chopped vitaminado	8,722	1,428	10,150
Mortadela siciliana	1,974	0,915	2,889

<sup>a</sup> Los datos representan la  $\bar{x}$  (n=20)

<sup>b</sup> Los datos son la suma de los valores medios de nicotinamida y ácido nicotínico

TABLA 93. Valores de VITAMINA B<sub>6</sub> en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	VITAMINA B <sub>6</sub>					
	Lunch <sup>a</sup>	Chopped pork <sup>a</sup>	Chopped beef <sup>a</sup>	Chopped pavo <sup>a</sup>	Chopped vitaminado <sup>b</sup>	Mortadela siciliana <sup>a</sup>
1	0,159	0,193	0,213	0,178	0,894	0,130
2	0,157	0,203	0,206	0,176	0,903	0,128
3	0,158	0,206	0,203	0,182	0,914	0,130
4	0,156	0,194	0,211	0,171	0,890	0,127
5	0,154	0,190	0,207	0,174	0,908	0,132
6	0,158	0,192	0,208	0,170	0,856	0,128
7	0,159	0,185	0,216	0,167	0,884	0,133
8	0,164	0,182	0,224	0,164	0,868	0,134
9	0,156	0,184	0,227	0,166	0,849	0,129
10	0,156	0,195	0,216	0,165	0,827	0,128
11	0,165	0,177	0,231	0,169	0,817	0,132
12	0,178	0,186	0,229	0,168	0,803	0,132
13	0,167	0,190	0,232	0,174	0,844	0,134
14	0,174	0,197	0,234	0,170	0,865	0,134
15	0,178	0,208	0,219	0,173	0,864	0,134
16	0,175	0,205	0,205	0,175	0,840	0,135
17	0,166	0,204	0,201	0,179	0,855	0,125
18	0,161	0,206	0,204	0,170	0,857	0,128
19	0,163	0,201	0,201	0,167	0,849	0,132
20	0,160	0,197	0,194	0,166	0,850	0,130
$\bar{x} \pm SD$	0,163 ± 0,008	0,195 ± 0,009	0,214 ± 0,012	0,171 ± 0,005	0,862 ± 0,030	0,131 ± 0,003
CV(%)	4,9	4,6	5,6	2,9	3,5	2,3

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

<sup>a</sup> Valores de PMP / <sup>b</sup> Suma de valores de PMP y PN

TABLA 94. Valores de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	ACIDO L-ASCORBICO					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	21,840	26,730	28,450	23,740	55,820	26,420
2	22,430	25,640	28,964	23,620	56,114	26,893
3	23,374	25,925	27,420	23,750	53,920	26,473
4	22,967	25,639	26,356	23,995	53,026	27,600
5	23,079	26,180	26,480	23,109	54,960	26,412
6	22,760	24,520	26,069	23,620	53,984	26,980
7	22,090	23,728	25,420	25,143	54,880	26,874
8	21,325	24,920	25,530	25,814	50,860	26,712
9	20,830	24,875	24,026	25,269	49,920	26,529
10	21,370	25,760	23,774	24,415	50,752	26,600
11	20,654	25,353	24,520	25,869	51,327	26,425
12	21,010	24,780	22,850	24,240	50,653	26,737
13	23,800	23,790	25,693	24,260	52,940	25,983
14	23,004	23,986	25,040	25,694	53,997	24,709
15	22,877	25,720	25,628	23,600	49,130	23,893
16	21,024	25,910	25,780	24,504	50,723	24,122
17	22,753	24,646	25,994	22,359	50,180	23,880
18	24,232	25,883	26,103	22,860	48,627	23,758
19	23,670	23,982	25,967	22,996	52,613	24,920
20	24,023	23,650	26,142	23,120	51,618	25,437
$\bar{x} \pm SD$	22,456 $\pm$ 1,125	25,081 $\pm$ 0,922	25,810 $\pm$ 1,436	24,099 $\pm$ 1,028	52,302 $\pm$ 2,234	25,868 $\pm$ 1,210
CV(%)	5,0	3,7	5,6	4,3	4,3	4,7

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 95. Valores de TODO-*TRANS*-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en productos cárnicos antes de ser tratados por el calor (amasado)

Muestras	TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL	DL- $\alpha$ -TOCOFEROL
	Chopped vitaminado ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Chopped vitaminado ( $\text{mg}/100\text{ g}$ )
1	106	2,304
2	105	2,263
3	109	2,352
4	107	2,294
5	106	2,223
6	110	2,320
7	109	2,385
8	111	2,433
9	110	2,224
10	109	2,250
11	111	2,459
12	112	2,292
13	109	2,414
14	105	2,243
15	107	2,114
16	109	2,335
17	104	2,268
18	105	2,345
19	103	2,217
20	104	2,428
$\bar{x} \pm \text{SD}$	107,550 $\pm$ 2,685	2,308 $\pm$ 0,088
CV(%)	2,5	3,8

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras

### **6.B.2. Contenido de vitaminas en productos cárnicos cocidos después de ser tratados por el calor**

Los datos sobre el contenido de vitaminas en los productos analizados después del proceso de fabricación se han recogido en las tablas (96-103) y los valores promedios se han representado mediante diagramas de anillo en las figuras (90-94) y diagrama de barras en la figura 95. Las cantidades diarias recomendadas para la población española (tabla 6) sugieren una ingesta mínima de 1 mg/día para la **vitamina B<sub>1</sub>**. Basándose en ello, todos los productos excepto el chopped de pavo (3,9% CDR) aportan cantidades significativas de vitamina (14,1-50,8% CDR), siendo estas concentraciones suministradas por 100 gramos de cada uno de dichos productos alimenticios. Las diferencias entre unos y otros son importantes, destacando el lunch por su alto porcentaje en tiamina.

Respecto a la **vitamina B<sub>2</sub>** se ha recomendado en adultos sanos un mínimo de 1,2 mg/día. La mortadela siciliana suministra un 9,7% CDR, sin embargo el resto de productos aportan entre 12,6-15,9% CDR. El contenido de todos ellos es bastante inferior al que representa el chopped vitaminado (56,9% CDR).

Las recomendaciones medias en adultos para la **niacina** son aproximadamente 16 mg/día. Todos los productos estudiados suministran una buena proporción de vitamina (16,6-23,7% CDR), siendo el chopped de pavo el de más alto contenido vitamínico. El chopped vitaminado representa un 63,2% CDR.

Para la **vitamina B<sub>6</sub>** se recomiendan 1,8 mg/día como valor medio en adultos. Todos los productos excepto el chopped vitaminado (47,3% CDR) aportan bajos niveles de vitamina (7,2-11,7% CDR), siendo la mortadela siciliana y el chopped beef los que representan menor y mayor porcentaje respectivamente, aunque la diferencia entre ellos no es significativa.

La dosis diaria recomendada para la **vitamina C** en adultos es de 60 mg independientemente de si son hombres o mujeres. Los productos que se han ensayado carecen de esta vitamina por su propia naturaleza, sin embargo gracias

a los aditivos añadidos en su elaboración todos ellos aportan importantes dosis (35,9-41,5% CDR) al individuo que los consume, representando un 84% CDR el chopped vitaminado.

Para la **vitamina A** se ha recomendado una dosis diaria media de 900 RE o  $\mu\text{g}$ . El chopped vitaminado suministra un 11,4% CDR en forma de todo-*trans*-retinol.

Respecto a la **vitamina E** la cantidad media que se sugiere es de 12 mg/día, aportando el chopped vitaminado un 18,2% CDR en forma de DL- $\alpha$ -tocoferol.

La tabla 104 presenta los porcentajes de vitaminas con respecto a las cantidades diarias recomendadas aportadas por los productos estudiados.

TABLA 96. Valores de TIAMINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	TIAMINA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	0,512	0,156	0,142	0,039	0,385	0,138
2	0,526	0,165	0,147	0,043	0,401	0,141
3	0,451	0,175	0,154	0,038	0,413	0,136
4	0,549	0,184	0,167	0,032	0,400	0,139
5	0,543	0,189	0,163	0,034	0,421	0,153
6	0,551	0,179	0,158	0,041	0,457	0,144
7	0,569	0,180	0,164	0,047	0,394	0,151
8	0,503	0,161	0,158	0,044	0,379	0,154
9	0,508	0,172	0,152	0,036	0,421	0,137
10	0,494	0,181	0,162	0,037	0,381	0,141
11	0,499	0,176	0,164	0,040	0,374	0,139
12	0,476	0,184	0,155	0,042	0,412	0,145
13	0,460	0,164	0,145	0,039	0,417	0,136
14	0,479	0,167	0,152	0,036	0,493	0,135
15	0,521	0,158	0,147	0,038	0,359	0,139
16	0,534	0,154	0,149	0,042	0,437	0,141
17	0,497	0,183	0,141	0,043	0,465	0,145
18	0,475	0,174	0,151	0,041	0,421	0,137
19	0,492	0,165	0,143	0,039	0,395	0,134
20	0,513	0,163	0,154	0,036	0,379	0,141
$\bar{x} \pm SD$	0,508 $\pm$ 0,032	0,172 $\pm$ 0,010	0,153 $\pm$ 0,008	0,039 $\pm$ 0,004	0,410 $\pm$ 0,033	0,141 $\pm$ 0,006
CV(%)	6,3	5,8	5,2	10,3	8,0	4,3

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 97. Valores de RIBOFLAVINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	RIBOFLAVINA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	0,188	0,159	0,152	0,191	0,723	0,116
2	0,187	0,155	0,155	0,186	0,737	0,118
3	0,187	0,157	0,149	0,182	0,699	0,115
4	0,182	0,157	0,152	0,179	0,710	0,116
5	0,173	0,152	0,149	0,179	0,684	0,120
6	0,206	0,148	0,163	0,179	0,648	0,116
7	0,199	0,150	0,162	0,174	0,637	0,106
8	0,203	0,143	0,148	0,176	0,606	0,111
9	0,193	0,151	0,140	0,168	0,664	0,107
10	0,180	0,158	0,144	0,158	0,664	0,116
11	0,186	0,147	0,145	0,162	0,663	0,108
12	0,200	0,153	0,142	0,173	0,665	0,112
13	0,205	0,149	0,144	0,171	0,672	0,114
14	0,203	0,149	0,163	0,172	0,710	0,106
15	0,187	0,153	0,152	0,178	0,705	0,105
16	0,207	0,154	0,157	0,173	0,693	0,125
17	0,180	0,147	0,155	0,176	0,690	0,127
18	0,191	0,157	0,147	0,177	0,684	0,126
19	0,180	0,160	0,157	0,179	0,703	0,124
20	0,175	0,158	0,153	0,176	0,712	0,122
$\bar{x} \pm SD$	0,191 $\pm$ 0,011	0,153 $\pm$ 0,005	0,151 $\pm$ 0,007	0,175 $\pm$ 0,007	0,683 $\pm$ 0,031	0,116 $\pm$ 0,007
CV(%)	5,8	3,3	4,6	4,0	4,6	6,0

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 98. Valores de NICOTINAMIDA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	NICOTINAMIDA					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	2,392	2,953	2,571	2,433	8,469	2,145
2	2,519	2,884	2,611	2,508	8,461	2,091
3	2,458	2,875	2,626	2,472	8,632	2,041
4	2,470	2,857	2,563	2,416	8,513	2,068
5	2,276	2,705	2,818	2,524	8,260	1,781
6	2,227	2,763	3,022	2,572	8,084	1,820
7	2,343	2,735	3,053	2,548	8,178	1,801
8	2,287	2,775	2,838	2,584	8,235	1,840
9	2,333	2,768	3,099	2,501	9,470	1,906
10	2,406	2,772	2,967	2,753	9,173	1,932
11	2,309	2,443	3,036	2,473	9,132	1,942
12	2,356	2,497	2,900	2,614	8,860	1,898
13	1,920	2,286	2,807	2,482	9,696	2,164
14	1,910	2,352	2,779	2,316	9,616	2,217
15	1,860	2,202	2,899	2,398	9,504	2,146
16	2,270	2,255	2,844	2,498	9,570	2,111
17	2,355	2,551	3,097	2,558	7,959	1,860
18	2,371	2,863	3,178	2,741	8,300	1,926
19	2,415	2,682	2,899	2,798	7,777	1,831
20	2,439	2,779	2,996	2,320	8,001	1,849
$\bar{x} \pm SD$	2,296 $\pm$ 0,187	2,650 $\pm$ 0,232	2,880 $\pm$ 0,183	2,525 $\pm$ 0,130	8,694 $\pm$ 0,629	1,968 $\pm$ 0,140
CV(%)	8,1	8,8	6,4	5,1	7,2	7,1

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 99. Valores de ACIDO NICOTINICO en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	ACIDO NICOTINICO					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	1,064	ND	ND	1,325	1,502	0,967
2	1,122	ND	0,219	1,264	1,394	0,945
3	1,027	ND	ND	1,193	1,463	0,893
4	0,989	ND	0,223	1,247	1,524	0,877
5	1,120	0,204	ND	1,307	1,323	0,912
6	1,064	ND	ND	1,284	1,262	0,940
7	1,083	0,213	ND	1,311	1,430	0,880
8	1,114	ND	ND	1,276	1,326	0,873
9	1,126	ND	ND	1,174	1,417	0,895
10	1,063	ND	ND	1,209	1,506	0,922
11	0,995	0,224	0,201	1,221	1,523	0,907
12	0,968	ND	ND	1,307	1,307	0,916
13	1,120	ND	ND	1,321	1,463	0,884
14	1,064	0,216	ND	1,274	1,524	0,893
15	1,106	ND	ND	1,325	1,421	0,904
16	0,984	ND	ND	1,261	1,377	0,869
17	0,978	ND	ND	1,308	1,385	0,893
18	1,014	ND	ND	1,227	1,469	0,921
19	1,120	ND	ND	1,264	1,534	0,940
20	1,090	ND	ND	1,250	1,327	0,929
$\bar{x} \pm SD$	1,061 $\pm$ 0,056			1,267 $\pm$ 0,045	1,424 $\pm$ 0,084	0,908 $\pm$ 0,027
CV(%)	5,3			3,6	5,9	3,0

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 100. Valores de NIACINA en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

<b>Muestras</b>	<b>Nicotinamida (mg/100 g) <sup>a</sup></b>	<b>Acido Nicotínico (mg/100 g) <sup>a</sup></b>	<b>NIACINA (mg/100 g) <sup>b</sup></b>
Lunch	2,296	1,061	3,357
Chopped pork	2,650	ND	2,650
Chopped beef	2,880	ND	2,880
Chopped pavo	2,525	1,267	3,792
Chopped vitaminado	8,694	1,424	10,118
Mortadela siciliana	1,968	0,908	2,876

<sup>a</sup> Los datos representan la  $\bar{x}$  (n=20)

<sup>b</sup> Los datos son la suma de los valores medios de nicotinamida y ácido nicotínico

TABLA 101. Valores de VITAMINA B<sub>6</sub> en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	VITAMINA B <sub>6</sub>					
	Lunch <sup>a</sup>	Chopped pork <sup>a</sup>	Chopped beef <sup>a</sup>	Chopped pavo <sup>a</sup>	Chopped vitaminado <sup>b</sup>	Mortadela siciliana <sup>a</sup>
1	0,154	0,191	0,207	0,174	0,881	0,129
2	0,156	0,199	0,202	0,170	0,890	0,127
3	0,156	0,205	0,203	0,174	0,906	0,129
4	0,153	0,193	0,211	0,168	0,877	0,125
5	0,157	0,189	0,205	0,175	0,894	0,130
6	0,156	0,191	0,215	0,172	0,844	0,126
7	0,157	0,183	0,213	0,166	0,872	0,131
8	0,159	0,179	0,218	0,165	0,859	0,133
9	0,154	0,181	0,225	0,166	0,835	0,127
10	0,156	0,194	0,224	0,163	0,817	0,125
11	0,167	0,176	0,226	0,165	0,805	0,129
12	0,172	0,185	0,224	0,169	0,793	0,130
13	0,170	0,189	0,224	0,171	0,836	0,132
14	0,172	0,196	0,227	0,167	0,854	0,133
15	0,171	0,204	0,223	0,172	0,853	0,130
16	0,170	0,201	0,195	0,179	0,828	0,131
17	0,158	0,194	0,193	0,172	0,845	0,123
18	0,159	0,207	0,198	0,164	0,849	0,126
19	0,160	0,196	0,198	0,168	0,838	0,129
20	0,158	0,194	0,196	0,163	0,836	0,128
$\bar{x} \pm SD$	0,161 ± 0,007	0,192 ± 0,009	0,211 ± 0,012	0,169 ± 0,005	0,851 ± 0,030	0,129 ± 0,003
CV(%)	4,4	4,7	5,7	3,0	3,5	2,3

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

<sup>a</sup> Valores de PMP / <sup>b</sup> Suma de valores de PMP y PN

TABLA 102. Valores de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	ACIDO L-ASCORBICO					
	Lunch	Chopped pork	Chopped beef	Chopped pavo	Chopped vitaminado	Mortadela siciliana
1	20,960	25,929	27,766	22,759	54,244	25,632
2	21,512	24,817	27,134	22,871	54,214	25,768
3	22,467	25,093	26,586	22,717	52,827	25,890
4	22,380	24,556	25,542	23,098	51,632	26,445
5	22,257	25,358	25,363	22,074	53,242	25,997
6	21,986	23,642	25,181	22,554	51,984	26,343
7	21,057	22,971	24,332	24,151	52,727	26,067
8	20,559	24,123	24,615	24,704	48,693	25,663
9	19,742	24,132	23,164	24,389	48,473	25,439
10	20,635	24,978	22,942	23,843	48,639	25,342
11	19,948	24,213	23,674	24,964	49,042	25,263
12	20,034	23,974	21,931	23,121	48,035	25,900
13	22,647	22,964	24,830	23,136	52,131	24,847
14	22,043	23,023	24,137	24,907	52,012	23,932
15	21,053	24,819	24,739	22,459	47,256	22,964
16	20,046	24,656	24,940	23,277	48,692	23,121
17	22,134	23,913	25,013	21,432	48,236	22,967
18	23,648	24,912	25,216	21,743	46,589	22,631
19	22,983	23,213	24,942	22,321	50,612	23,742
20	23,014	22,830	25,067	22,074	49,013	24,031
$\bar{x} \pm SD$	21,555 $\pm$ 1,162	24,206 $\pm$ 0,890	24,856 $\pm$ 1,358	23,130 $\pm$ 1,051	50,415 $\pm$ 2,400	24,899 $\pm$ 1,264
CV(%)	5,4	3,7	5,5	4,5	4,8	5,1

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras y se expresan en (mg/100 g)

TABLA 103. Valores de TODO-*TRANS*-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL en productos cárnicos tratados por el calor (producto acabado)

Muestras	TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL	DL- $\alpha$ -TOCOFEROL
	Chopped vitaminado ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Chopped vitaminado ( $\text{mg}/100\text{ g}$ )
1	103	2,189
2	100	2,146
3	105	2,220
4	101	2,162
5	102	2,104
6	105	2,206
7	106	2,245
8	107	2,302
9	105	2,096
10	106	2,124
11	108	2,345
12	107	2,168
13	106	2,285
14	101	2,014
15	103	1,982
16	102	2,306
17	99	2,146
18	98	2,205
19	96	2,104
20	95	2,307
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$102,750 \pm 3,754$	$2,183 \pm 0,098$
CV(%)	3,7	4,5

Los datos se han obtenido en el análisis por duplicado de las muestras

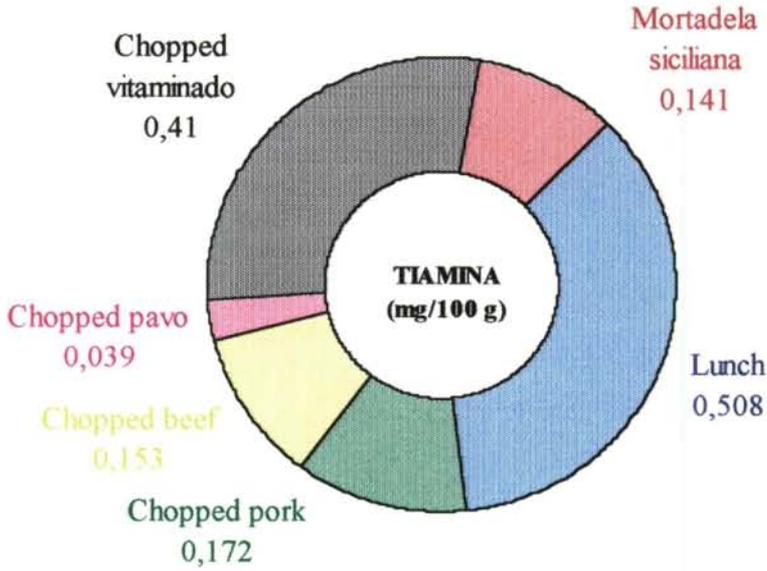


Fig. 90. Diagrama de anillo con el contenido medio de TIAMINA en productos cárnicos cocidos

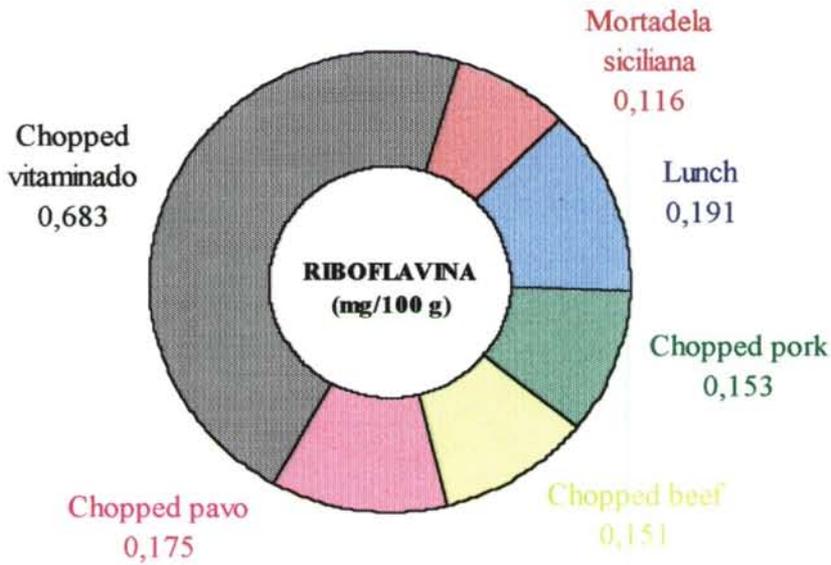


Fig. 91. Diagrama de anillo con el contenido medio de RIBOFLAVINA en productos cárnicos cocidos

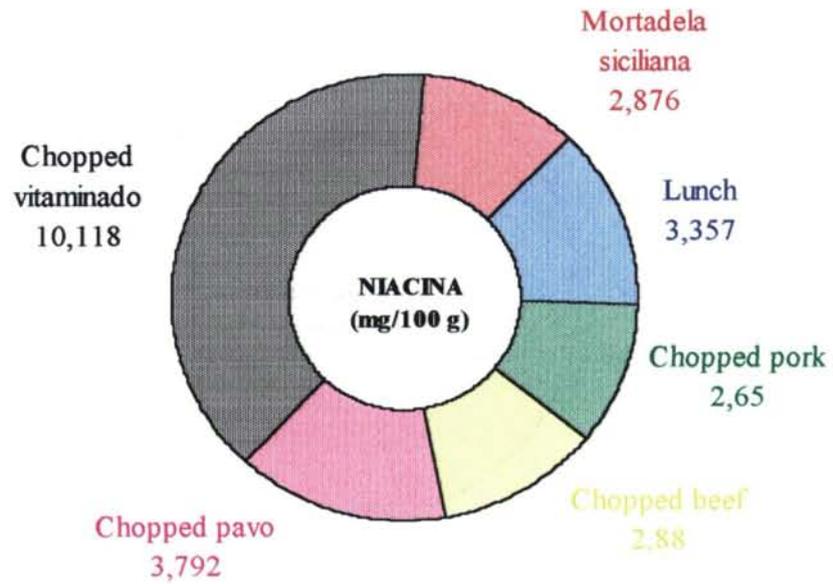


Fig. 92. Diagrama de anillo con el contenido medio de NIACINA en productos cárnicos cocidos

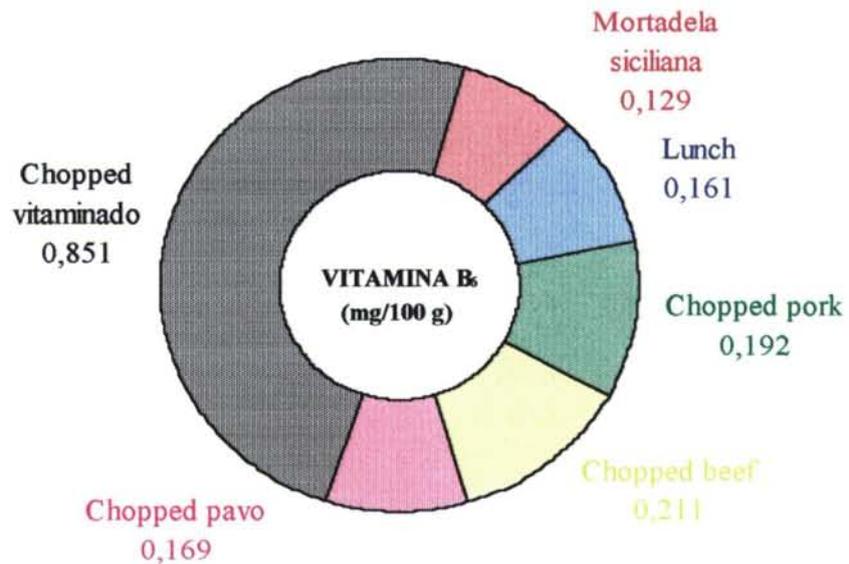


Fig. 93. Diagrama de anillo con el contenido medio de VITAMINA B<sub>6</sub> en productos cárnicos cocidos

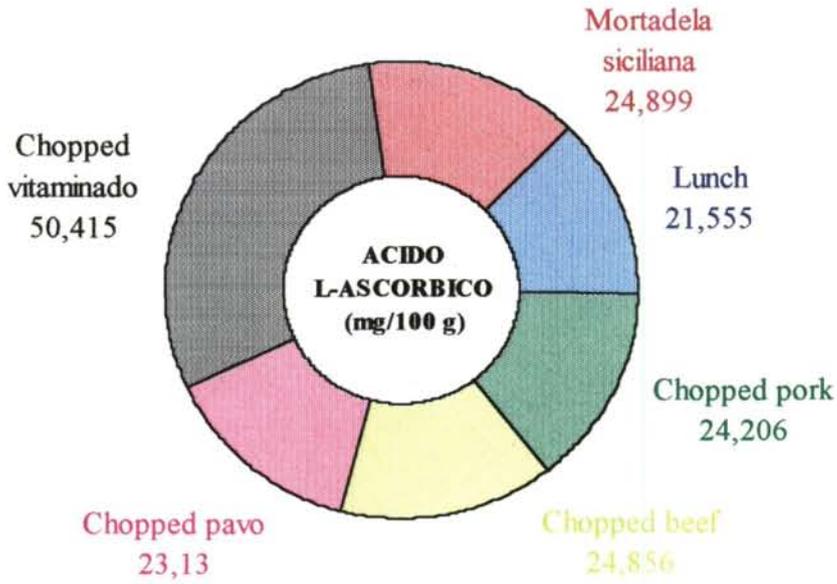


Fig. 94. Diagrama de anillo con el contenido medio de ACIDO L-ASCORBICO en productos cárnicos cocidos

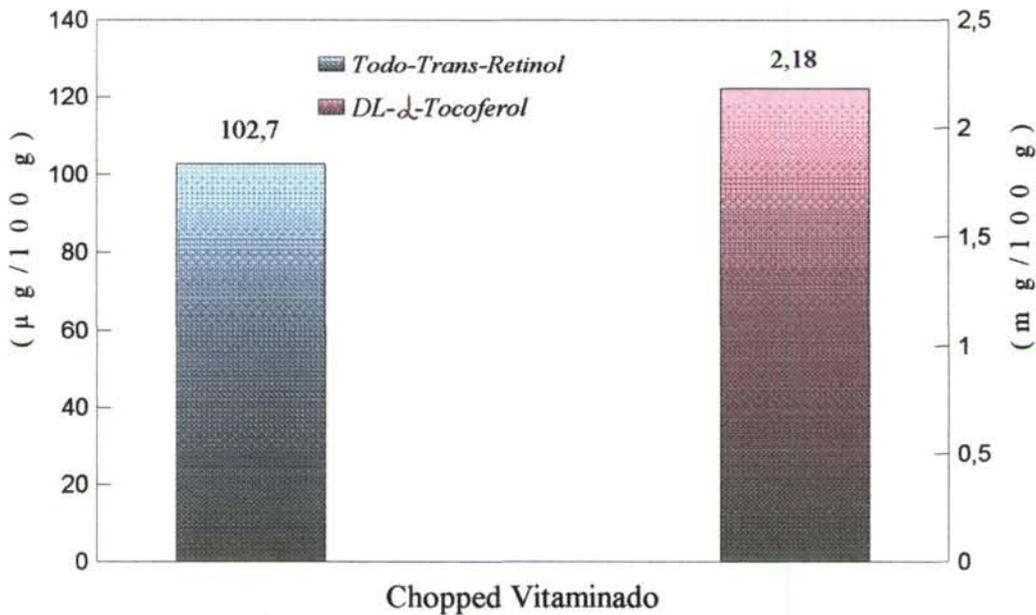


Fig. 95. Diagrama de barras con el contenido medio de TODO-TRANS-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

TABLA 104. Porcentajes de vitaminas con respecto a las CDR aportadas por los productos cárnicos cocidos

Vitaminas	Vitamina B <sub>1</sub>	Vitamina B <sub>2</sub>	Niacina	Vitamina B <sub>6</sub>	Vitamina C	Vitamina A	Vitamina E
CDR	1 mg	1,2 mg	16 mg	1,8 mg	60 mg	900 µg	12 mg
Muestras	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Lunch	50,8	15,9	21,0	8,9	35,9	-	-
Chopped pork	17,2	12,8	16,6	10,7	40,3	-	-
Chopped beef	15,3	12,6	18,0	11,7	41,4	-	-
Chopped pavo	3,9	14,6	23,7	9,4	38,6	-	-
Chopped vitaminado	41,0	56,9	63,2	47,3	84,0	11,4	18,2
Mortadela siciliana	14,1	9,7	18,0	7,2	41,5	-	-

### **6.B.3. Pérdidas vitamínicas durante el proceso industrial de fabricación**

Las vitaminas son muy frágiles, se alteran en general fácilmente en contacto con el aire, la luz y el calor. La disminución del contenido vitamínico de los productos cárnicos comienza en el mismo instante que se sacrifica al animal para obtener la materia prima, y prosigue en mayor o menor medida con cada etapa de almacenamiento y de preparación.

En este trabajo se han estudiado las pérdidas vitamínicas debidas a la inestabilidad de las vitaminas como consecuencia del proceso de cocción que experimentan estos productos en su elaboración. Consiste en un tratamiento térmico entre 75-80 °C durante un tiempo de 3-5 h alcanzándose en el centro de la pieza una temperatura entre 70-75 °C, acompañado a continuación de un proceso de enfriamiento durante 15 min.

Las tablas (105-112) recogen las pérdidas que se han obtenido para las vitaminas estudiadas por efecto del tratamiento térmico realizado y se representan mediante diagramas de barras en las figuras (96-102).

Las vitaminas que han experimentado más sensibilidad al procesado térmico han sido las vitaminas liposolubles (todo-*trans*-retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol) con pérdidas medias de 4,5% y 5,4% respectivamente. Ambas se oxidan fácilmente en la presencia de calor y de oxígeno del aire. Sin embargo, hay que destacar que estos porcentajes observados no representan una disminución importante.

Entre las vitaminas hidrosolubles el ácido L-ascórbico y la tiamina presentan pérdidas medias de 3,76%  $\pm$  0,21 y 3,00%  $\pm$  0,38 respectivamente. En ambos casos la disminución no es significativa, por lo que el tratamiento realizado da lugar a una reducción vitamínica mínima.

La vitamina B<sub>6</sub> y la niacina son las más estables con porcentajes de pérdida de 1,36%  $\pm$  0,16 y 0,33%  $\pm$  0,09 respectivamente, no siendo datos relevantes.

Para cada una de las vitaminas analizadas no se aprecian diferencias notables en el comportamiento de unos productos frente a otros.

Las principales pérdidas por cocción se producen cuando los productos están en contacto directo con el aire y el agua, sin superficie que los recubra, pasando las vitaminas directamente al líquido de cocción.

Observando los resultados obtenidos se recomienda la ingesta de productos cárnicos cocidos pues las alteraciones por procesado no han sido cuantitativamente significativas.

TABLA 105. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de TIAMINA

Muestras	TIAMINA		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	0,525 ± 0,031	0,508 ± 0,032	3,24
Chopped pork	0,177 ± 0,010	0,172 ± 0,010	2,82
Chopped beef	0,158 ± 0,008	0,153 ± 0,008	3,16
Chopped pavo	0,040 ± 0,004	0,039 ± 0,004	2,50
Chopped vitaminado	0,425 ± 0,034	0,410 ± 0,033	3,53
Mortadela siciliana	0,145 ± 0,006	0,141 ± 0,006	2,76
$\bar{x} \pm SD$			3,00 ± 0,38

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 106. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de RIBOFLAVINA

Muestras	RIBOFLAVINA		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	0,193 ± 0,010	0,191 ± 0,011	1,04
Chopped pork	0,155 ± 0,005	0,153 ± 0,005	1,29
Chopped beef	0,154 ± 0,005	0,151 ± 0,007	1,95
Chopped pavo	0,177 ± 0,008	0,175 ± 0,007	1,13
Chopped vitaminado	0,694 ± 0,032	0,683 ± 0,031	1,59
Mortadela siciliana	0,118 ± 0,007	0,116 ± 0,007	1,69
$\bar{x} \pm SD$			1,45 ± 0,35

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 107. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de NICOTINAMIDA

Muestras	NICOTINAMIDA		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	2,302 ± 0,186	2,296 ± 0,187	0,26
Chopped pork	2,655 ± 0,232	2,650 ± 0,232	0,19
Chopped beef	2,888 ± 0,180	2,880 ± 0,183	0,28
Chopped pavo	2,533 ± 0,129	2,525 ± 0,130	0,32
Chopped vitaminado	8,722 ± 0,631	8,694 ± 0,629	0,32
Mortadela siciliana	1,974 ± 0,141	1,968 ± 0,140	0,30
$\bar{x} \pm SD$			0,28 ± 0,05

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 108. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de ACIDO NICOTINICO

Muestras	ACIDO NICOTINICO		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	1,066 ± 0,055	1,061 ± 0,056	0,47
Chopped pork	ND	ND	-
Chopped beef	ND	ND	-
Chopped pavo	1,275 ± 0,044	1,267 ± 0,045	0,63
Chopped vitaminado	1,428 ± 0,083	1,424 ± 0,084	0,28
Mortadela siciliana	0,915 ± 0,032	0,908 ± 0,027	0,77
$\bar{x} \pm SD$			0,54 ± 0,21

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 109. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de NIACINA

Muestras	NIACINA		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	3,368	3,357	0,33
Chopped pork	2,655	2,650	0,19
Chopped beef	2,888	2,880	0,28
Chopped pavo	3,808	3,792	0,42
Chopped vitaminado	10,150	10,118	0,32
Mortadela siciliana	2,889	2,876	0,45
$\bar{x} \pm SD$			0,33 $\pm$ 0,09

<sup>a</sup> Los datos representan la suma de las medias de nicotinamida y ácido nicotínico en las muestras

TABLA 110. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de VITAMINA B<sub>6</sub>

Muestras	VITAMINA B <sub>6</sub>		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	0,163 ± 0,008	0,161 ± 0,007	1,23
Chopped pork	0,195 ± 0,009	0,192 ± 0,009	1,54
Chopped beef	0,214 ± 0,012	0,211 ± 0,012	1,40
Chopped pavo	0,171 ± 0,005	0,169 ± 0,005	1,17
Chopped vitaminado	0,862 ± 0,030	0,851 ± 0,030	1,28
Mortadela siciliana	0,131 ± 0,003	0,129 ± 0,003	1,53
$\bar{x} \pm SD$			1,36 ± 0,16

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 111. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de ACIDO L-ASCORBICO

Muestras	ACIDO L-ASCORBICO		Pérdida vitamínica (%)
	Antes cocción (mg/100 g) <sup>a</sup>	Después cocción (mg/100 g) <sup>b</sup>	
Lunch	22,456 ± 1,125	21,555 ± 1,162	4,01
Chopped pork	25,081 ± 0,922	24,206 ± 0,890	3,49
Chopped beef	25,810 ± 1,436	24,856 ± 1,358	3,70
Chopped pavo	24,099 ± 1,028	23,130 ± 1,051	4,02
Chopped vitaminado	52,302 ± 2,234	50,415 ± 2,400	3,61
Mortadela siciliana	25,868 ± 1,210	24,899 ± 1,264	3,75
$\bar{x} \pm SD$			3,76 ± 0,21

<sup>a</sup> Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20) ± SD por duplicado durante tres meses

TABLA 112. Efecto del tratamiento de cocción en el contenido de TODO-*TRANS*-RETINOL y DL- $\alpha$ -TOCOFEROL

Muestras	Vitamina	Antes cocción	Después cocción	Pérdida vitamínica (%)
Chopped vitaminado	TODO- <i>TRANS</i> -RETINOL <sup>a</sup>	107,550 $\pm$ 2,685	102,750 $\pm$ 3,754	4,5
Chopped vitaminado	DL- $\alpha$ -TOCOFEROL <sup>b</sup>	2,308 $\pm$ 0,088	2,183 $\pm$ 0,098	5,4

Los datos representan  $\bar{x}$  (n=20)  $\pm$  SD por duplicado durante tres meses

<sup>a</sup> Se expresa en ( $\mu$ g/100 g)

<sup>b</sup> Se expresa en (mg/100 g)

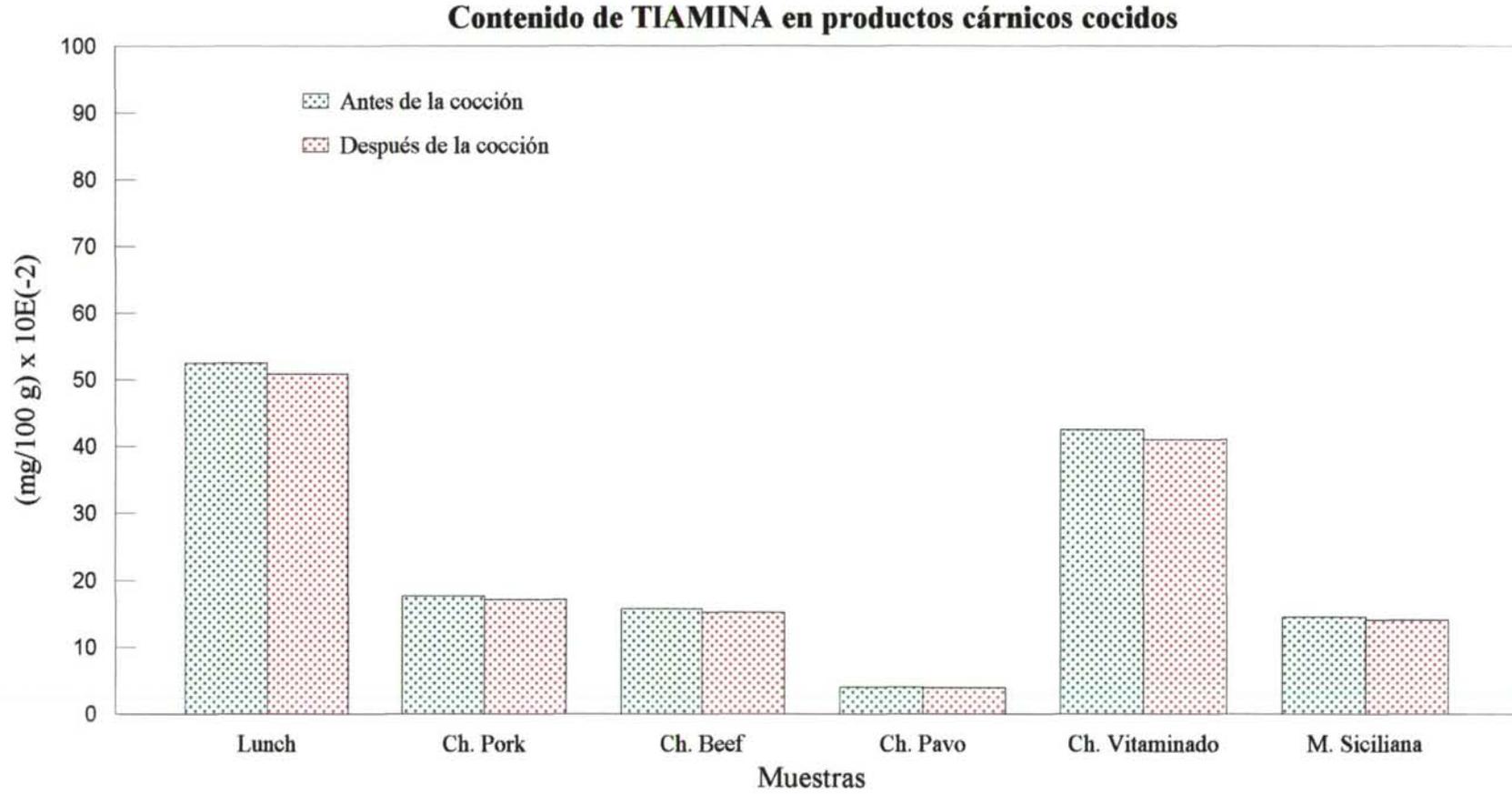


Fig. 96. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de tiamina en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

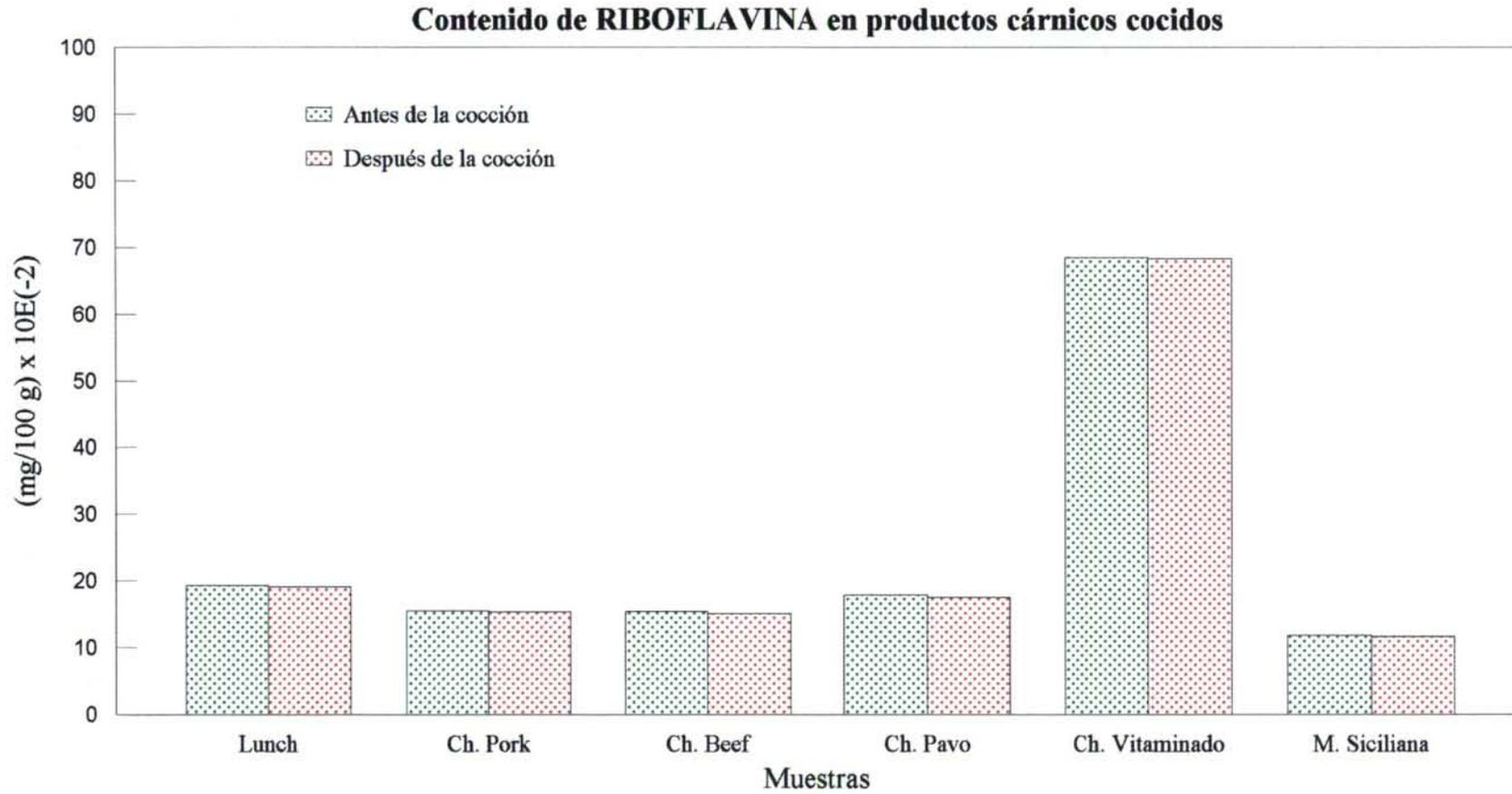


Fig. 97. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de riboflavina en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

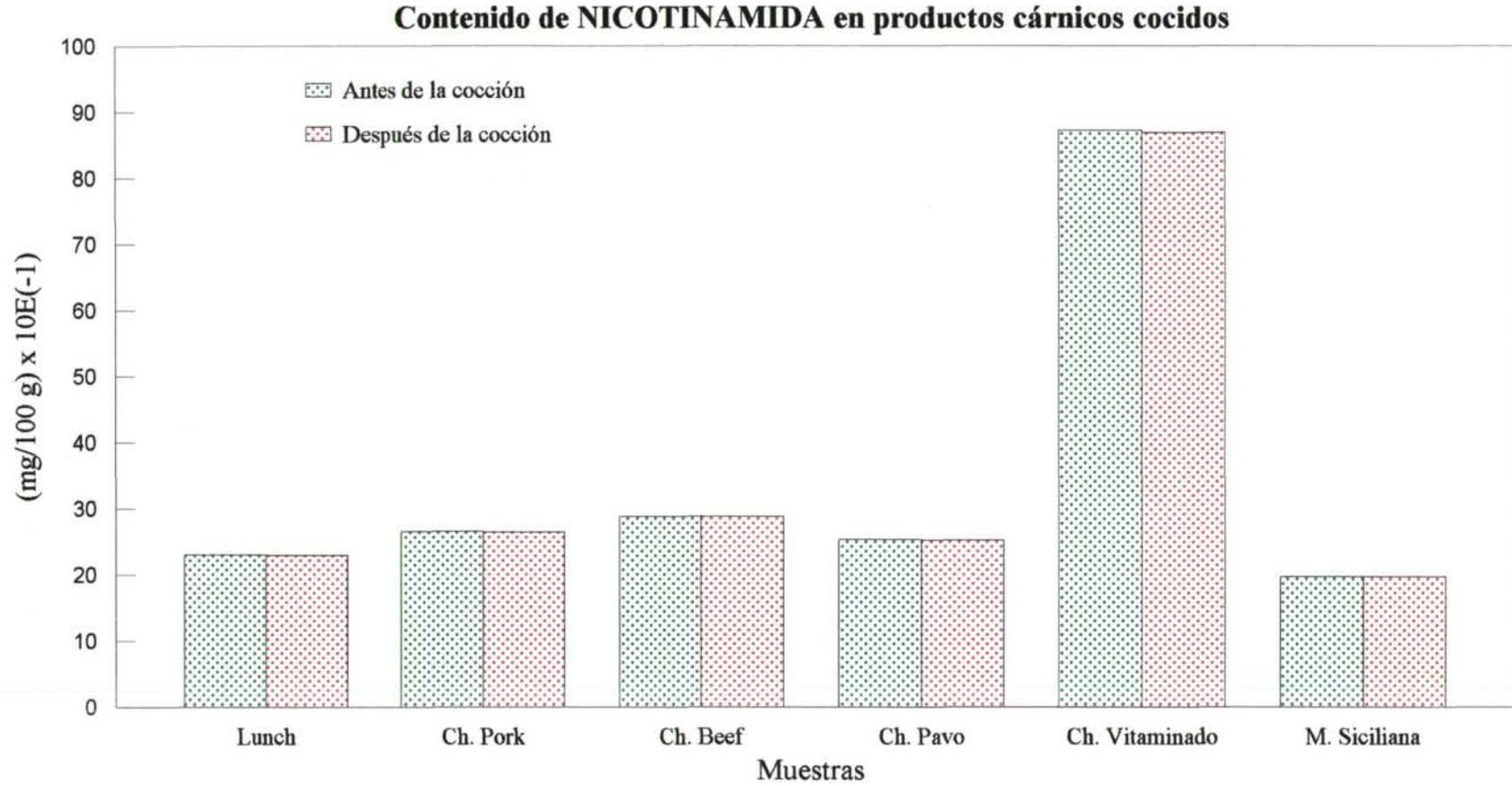


Fig. 98. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de nicotinamida en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

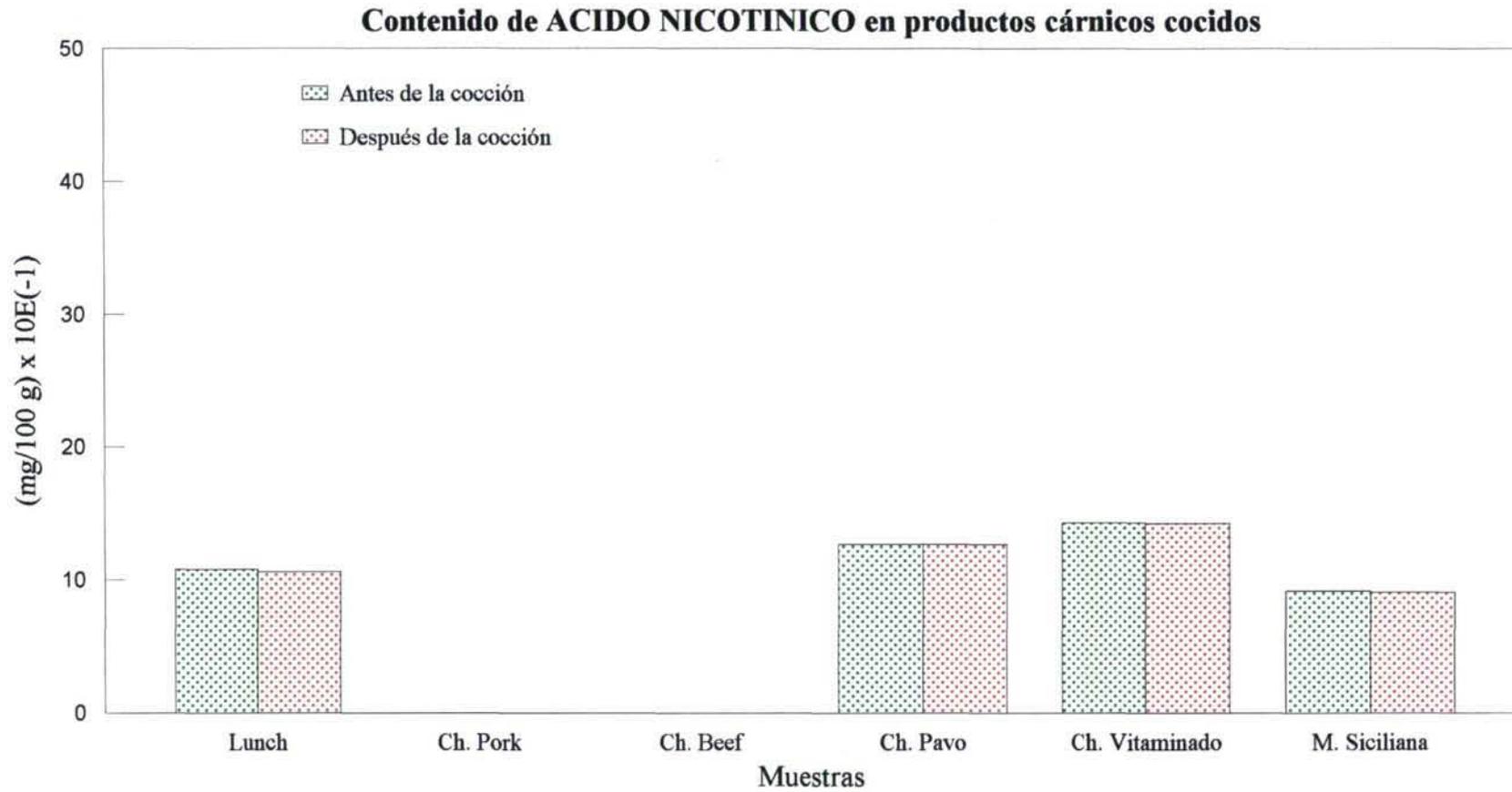


Fig. 99. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de ácido nicotínico en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

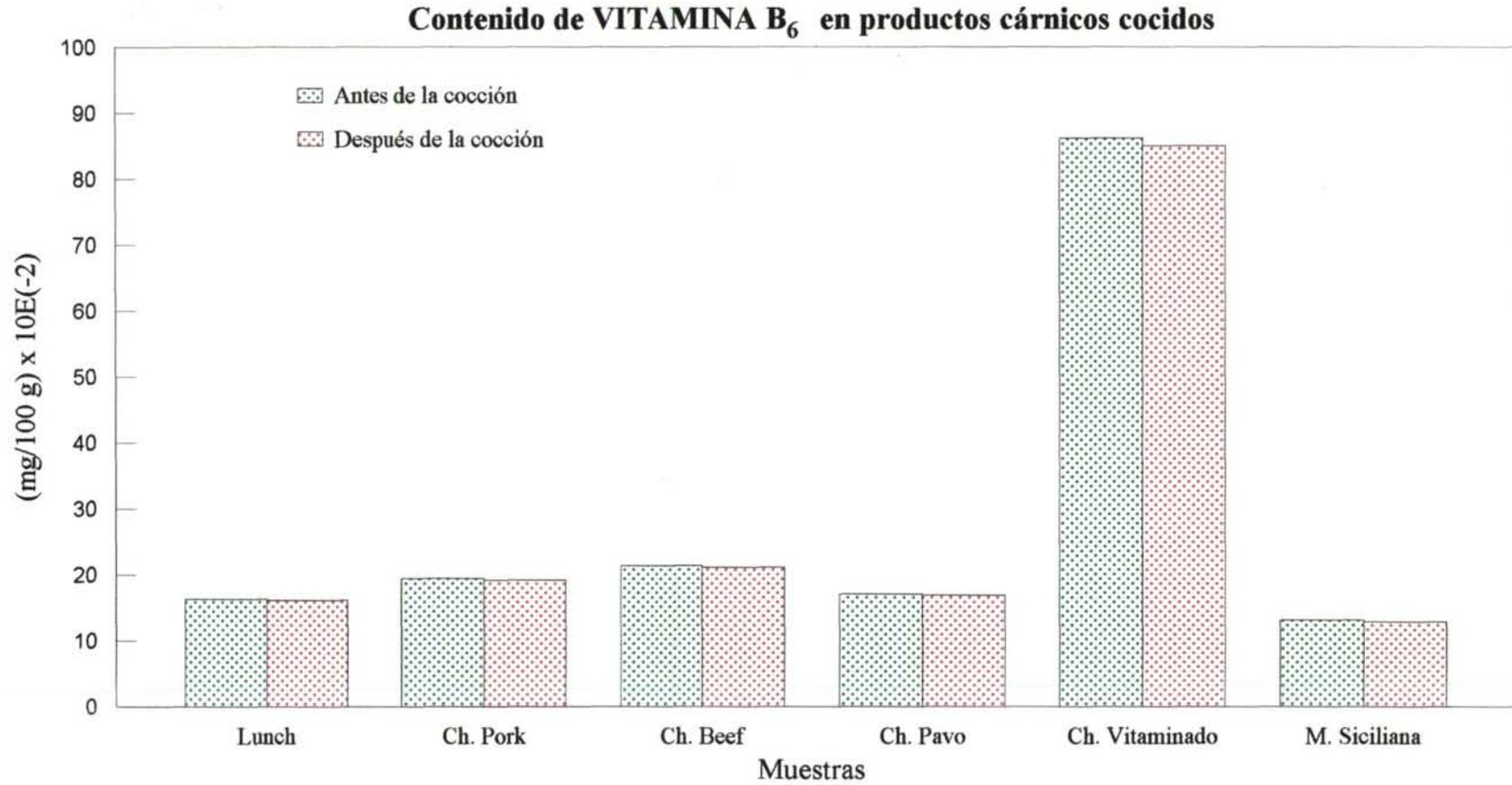


Fig. 100. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de vitamina B<sub>6</sub> en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

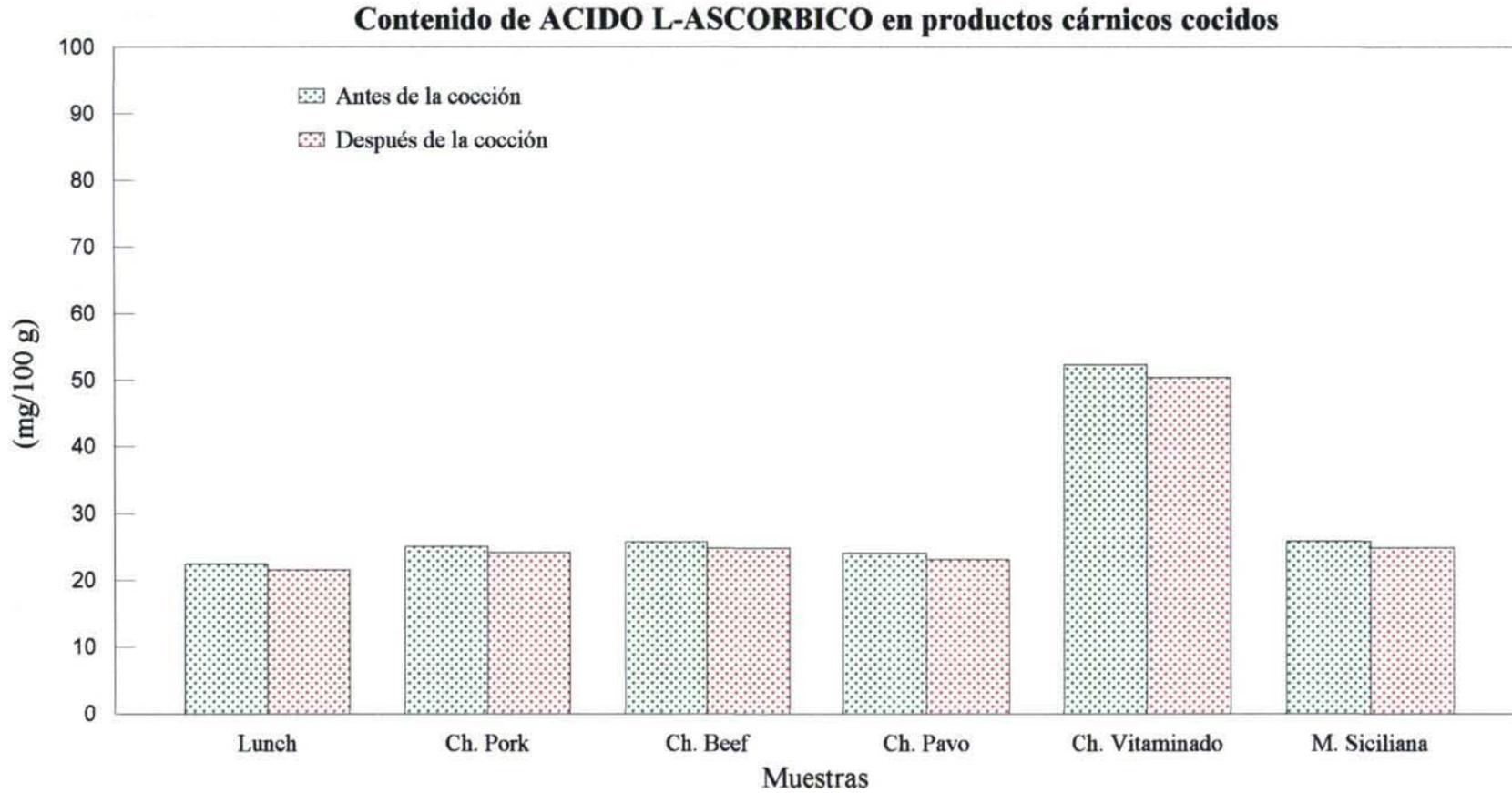


Fig. 101. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de ácido L-ascórbico en productos cárnicos antes y después de ser tratados por el calor

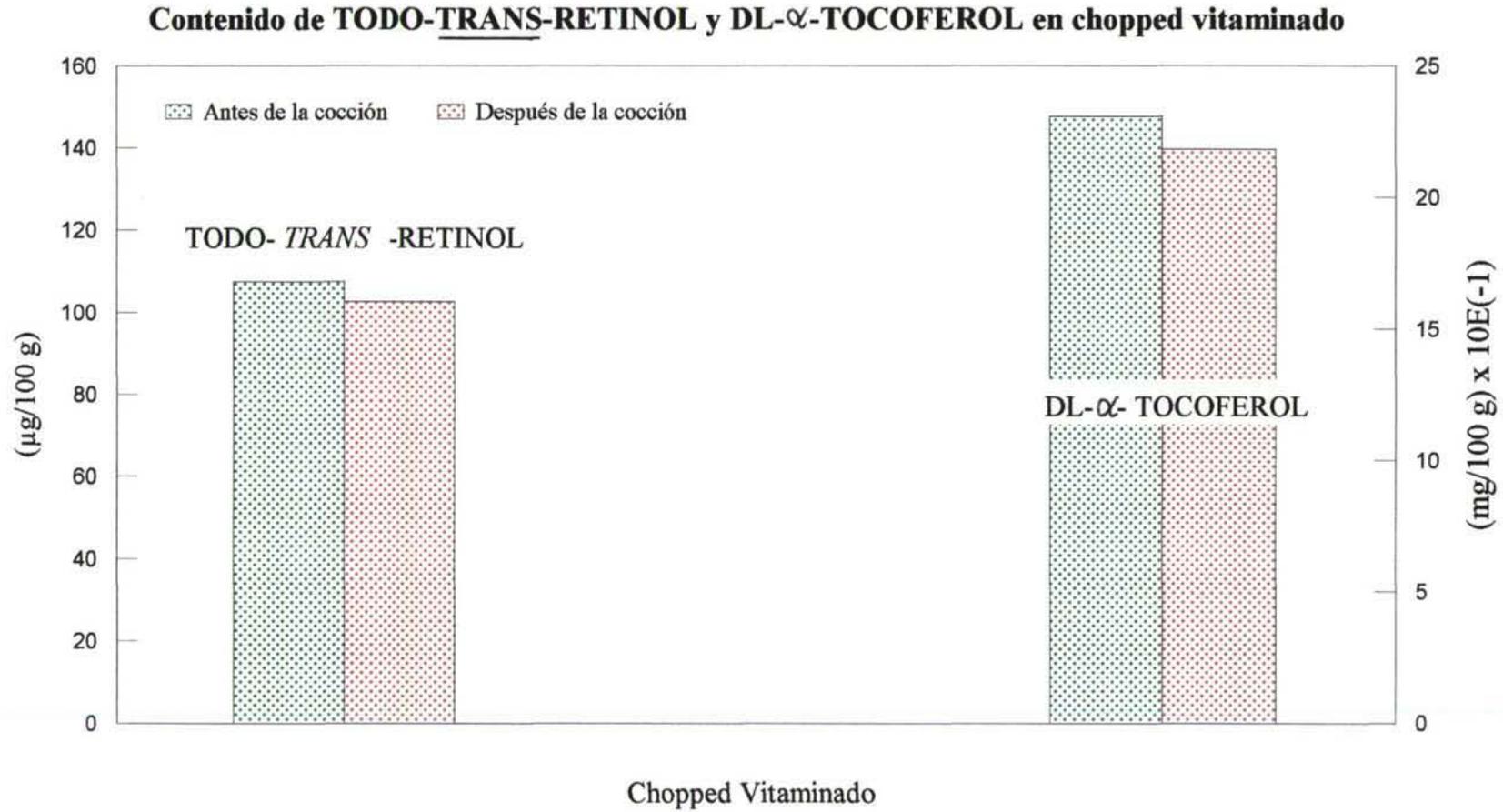


Fig. 102. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios de todo-trans-retinol y DL- $\alpha$ - tocoferol en chopped vitaminado antes y después de ser tratado por el calor

## **7. CONCLUSIONES**

1.- El método de extracción y de análisis cromatográfico que se ha puesto a punto para la determinación de tiamina en productos cárnicos cocidos tiene buena precisión y exactitud, está libre de interferencias y permite obtener una señal simétrica y bien definida. La sensibilidad, linealidad y precisión del método se han mejorado usando una etapa de purificación y concentración mediante cartuchos Sep-Pak para el tiocromo formado por oxidación *in vitro* de la tiamina.

2.- El método que se ha utilizado para la determinación de riboflavina presenta una buena precisión y exactitud al aplicarlo a las muestras objeto de estudio. La señal cromatográfica resultante tiene buena simetría y definición. El proceso de extracción no requiere etapas de derivatización, habiéndose eliminado el paso de oxidación utilizado por otros autores en el análisis de esta vitamina para otro tipo de productos, mejorándose la sensibilidad respecto al mismo proceso con oxidación y reduciéndose el tiempo de análisis.

3.- La tiamina y riboflavina no se hallan en los productos cárnicos cocidos en forma libre, por lo que el método de extracción requiere un tratamiento enzimático que asegure la liberación de ambas. Los mejores resultados se han obtenido con el enzima clara-diestasa, siendo estos datos constantes e independientes del producto que se ha utilizado. Sin embargo, el porcentaje de extracción de ambas vitaminas no es similar para un mismo enzima o si no hay tratamiento enzimático.

4.- El método de extracción descrito para la determinación de niacina es rápido y sencillo. Se ha mejorado el límite de detección conseguido por otros autores para esta vitamina en otros productos a pesar de que la baja sensibilidad del detector de fotodiodos dificulta la medida de pequeñas concentraciones. Las señales cromatográficas para los vitámeros no están afectadas por las interferencias que las acompañan, las cuales tienen intensa absorción ultravioleta.

5.- El método puesto a punto en este estudio para la determinación de vitamina B<sub>6</sub> permite cuantificar de forma rápida, precisa y exacta cinco vitámeros de esta vitamina en los productos cárnicos cocidos. La separación cromatográfica de los mismos permite obtener señales bien definidas y simétricas sin la necesidad de empleo de reactivos par-iónico usados en otros procedimientos con otros productos, disminuyendo así el coste del análisis. La vitamina B<sub>6</sub> se encuentra en los productos cárnicos cocidos en forma de fosfato de piridoxamina no habiéndose detectado la presencia de los otros vitámeros.

6.- El método que se ha desarrollado para la determinación de ácido ascórbico tiene la sensibilidad, linealidad y precisión óptimas para su aplicación en los productos cárnicos cocidos. La rápida descomposición de esta vitamina en soluciones acuosas en presencia de la luz y el aire, requiere tomar precauciones trabajando con valores ácidos de pH para asegurar su máxima estabilidad. La señal cromatográfica obtenida tiene buena definición, pero el tiempo de retención es menos reproducible que en otros casos por lo que la identificación de la señal se ha confirmado mediante el correspondiente espectro ultravioleta. El deterioro observado en la columna utilizada es mayor que cuando se emplean fases estacionarias de naturaleza apolar debido a la pérdida de grupos amino.

7.- Se ha puesto a punto un método preciso que permite la determinación simultánea de todo-*trans*-retinol y DL- $\alpha$ -tocoferol en un único análisis. Durante la etapa de extracción alcalina se han tomado precauciones trabajando en presencia de una atmósfera inerte de nitrógeno y con pirogalol como antioxidante para prevenir la oxidación e isomerización de las vitaminas. Se corrobora que el oxígeno y la luz deben ser evitados en estos ensayos. El n-hexano empleado como disolvente de extracción permite reducir el número de interferentes en las muestras que se inyectan al sistema cromatográfico, por lo que los cromatogramas obtenidos presentan picos bien definidos y simétricos.

**8.-** El contenido vitamínico de los productos cárnicos cocidos varía de unos a otros en función de la composición de la materia prima que los integra, la cual depende de la especie animal y de la alimentación recibida por éste, por lo tanto no es posible establecer unos niveles de vitaminas que puedan caracterizar objetivamente la calidad del producto. Considerando las cantidades diarias recomendadas por organismos oficiales se ha comprobado que todos ellos aportan cantidades significativas de vitaminas hidrosolubles, sin la necesidad de recurrir a su suplementación. Sin embargo, no se han encontrado vitaminas liposolubles, por lo que puede ser interesante la adición de éstas en dichos productos alimenticios.

**9.-** Estudiados los contenidos vitamínicos durante la fase inicial de amasado y después del tratamiento térmico de cocción de los productos cárnicos se pone de manifiesto que en general las vitaminas analizadas no sufren una alteración cuantitativamente importante como consecuencia del proceso de transformación de la materia prima. Se ha observado que la evolución experimentada por cada una de las vitaminas es diferente, siendo el DL- $\alpha$ -tocoferol, el todo-*trans*-retinol, el ácido L-ascórbico y la tiamina los más susceptibles a la alteración. Las pequeñas pérdidas halladas son independientes de los productos analizados.

**10.-** En vista de los resultados observados, se recomienda por su interés nutricional el consumo variado de productos cárnicos cocidos por ser alimentos fáciles de tomar y económicos, con la ventaja de evitar las carencias vitamínicas en el organismo sin la necesidad de tener que tomar complejos vitamínicos que son mucho más caros.

**11.-** En la Legislación alimentaria española no se contemplan métodos analíticos para la determinación de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en productos cárnicos cocidos, ni hay tablas con los contenidos vitamínicos de los mismos. Por lo tanto, dada la importancia de estos parámetros, se propone la inclusión de los

métodos de HPLC descritos en este trabajo para la cuantificación de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, B<sub>6</sub>, C, A y E.

## **8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- ABDEL-KADER Z. (1992). Comparison of AOAC and high-performance liquid chromatographic methods for thiamin determination in foods. *Food Chem.*, 43, 393-397.
  
- Analytical Methods Committee (1959). The determination of tocopherols in oils, foods and feeding stuffs. *Analyst*, London, 84, 356-372.
  
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1985). Determination of vitamin A in animal feedingstuffs by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, London., 110, 1019-26.
  
- ANDERSON L., DIBBLE M., TURKKI P., MITCHELL H. & RYNBERGEN H. (1985). En *Nutrición y Dieta*, 17th edn, Interamericana, México, DF.
  
- ANG C. & MOSELEY F. (1980). Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by high-pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 28(3), 483-486.
  
- ANG C., CENCIARELLI M. & EITENMILLER R. (1988). A simple liquid chromatographic method for determination of B<sub>6</sub> vitamers in raw and cooked chicken. *J. Food Sci.*, 53(2), 371-375.
  
- ANG C., SEARCY G. & EITENMILLER R. (1990). Tocopherols in chicken breast and leg muscles determined by reverse phase liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 55(6), 1536-1539.
  
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) in foods and vitamin preparations. Fluorometric Method. First action 1970. Final action 1971. *Ibid.*, 970.65.
  
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Thiamine (Vitamin B<sub>1</sub>) in foods. Fluorometric method. Final action. *Ibid.*, 942.23.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Vitamin A in margarine. Spectrophotometric method. First action 1960. In *Official Methods of Analysis*, 15th edn, (S. Williams, ed.), Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Va., 960.45.
  
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Vitamin A in mixed feeds, premixes and foods. Colorimetric method. First action 1974. *Ibid.*, 974.29.
  
- ARCHER A.W., HIGGINS V.R. & PERRYMAN D.L. (1980). Citado en "Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), J. Ass. Publ. Anal., 18, 99.
  
- ASHOOR S., KNOX M., OLSEN J. & DEGER D. (1985). Improved liquid chromatographic determination of riboflavin in milk and dairy products. J. Ass. Off. Anal. Chem., 68(4), 693-696.
  
- Association of Vitamin Chemists, Inc. (1966). In *Methods of Vitamin Assay*, 3rd edn, Interscience Publishers, New York.
  
- ATUMA S.S. & LINDQUIST J. (1973). Voltammetric determination of tocopherols by use of a newly developed carbon paste electrode. Analyst, London, 98, 866-894.
  
- ATUMA S.S. (1975). Electrochemical determination of vitamin E in margarine, butter, and palm oil. J. Sci. Food Agric., 26, 393-399.
  
- AYI B., YUHAS D., MOFFETT K., JOYCE D. & DEANGELIS N. (1985). Liquid chromatographic determination of thiamine in infant formula products by using ultraviolet detection. J. Ass. Off. Anal. Chem., 68(6), 1087-1092.

- BAILEY A. & FINGLAS P. (1990). A normal phase high performance liquid chromatographic method for the determination of thiamin in blood and tissue samples. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 147-157.
- BALL G.F.M. (1988). In *Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis*, Elsevier Science Publishers, London.
- BALSCHUKAT D. & KRESS E. (1990). Use of column switching for the determination of niacinamide in compound feed. *J. Chromat.*, 502, 79-85.
- BARBERA R., FARRE R., LAGARDA M. y PINTOR R. (1993). Determinación polarográfica de ácido ascórbico en fórmulas para lactantes. *Alimentaria*, Noviembre, 89-91.
- BARJA DE QUIROGA G., LOPEZ M., PEREZ R. y ROJAS C. (1991). Simultaneous determination of two antioxidants, uric and ascorbic acid, in animal tissue by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 199, 81-85.
- BARNA E. & DWORSCHAK E. (1994). Determination of thiamine (vitamin B<sub>1</sub>) and riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) in meat and liver by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, A 668, 359-363.
- BARNA E. (1991). Comparison of data obtained by HPLC and microbiological determination of riboflavin in ready-to-eat foods. *Acta Alimentaria*, 21(1), 3-9.
- BARNES P.J. & TAYLOR P.W. (1980). The composition of acyl lipids and tocopherols in wheat germ oils from various sources. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 997-1006.
- BAUER A., STEGER U. & WALLNÖFER P. (1991). Thiamingehalt von Grünkern in Abhängigkeit von der Art der küchentechnischen Verarbeitung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87(6), 180-182.

-BAYFIELD R.F. & COLE E.R. (1980). Colorimetric estimation of vitamin A with trichloroacetic acid. *Meth. Enzym.*, 67F, 189-195.

-BESSEY O.A. & KING C.G. (1933). The distribution of vitamin C in plant and animal tissues and its determination. *J. Biol. Chem.*, 103, 687.

-BESSEY O.A., ADAM D.J. & HANSEN A.E. (1957). Intake of vitamin B<sub>6</sub> and infantile convulsions: a first approximation of requirements of pyridoxine in infants. *Pediatrics*, 20, 33-44.

-BETTENDORFF L., GRANDFILS C., DE RYCKER C. & SCHOFFENIELS E. (1986). Determination of thiamine and its phosphate esters in human blood serum at femtomole levels. *J. Chromat.*, 382, 297-302.

-BILIC N. & SIEBER R. (1990). Determination of flavins in dairy products by high-performance liquid chromatography using sorboflavin as internal standard. *J. Chromat.*, 511, 359-366.

-BITSCH R. & MÖLLER J. (1988). Evaluation of the vitamin B<sub>6</sub> content in foods by HPLC analysis. Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant Bi 218/5-1, 77-79.

-BITSCH R. & MÖLLER J. (1989). Analysis of B<sub>6</sub> vitamers in foods using a modified high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromat.*, 463, 207-211.

-BLOTT A.D. & WOOLLARD D.C. (1986). Rapid determination of  $\alpha$ -tocopheryl acetate in animal feeds by high-performance liquid chromatography. *J. Micronutr. Anal.*, 2, 259-274.

-BLUNK H. (1993). Sodium ascorbate and sodium erythorbate. A comparison between the technological properties in the processing of cooked cured products. *Fleischwirtschaft*, 73, Jahrgang, Oktober.

- BOGNAR A. (1981). Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 77(12), 431-436.
- BOGNAR A. (1985). Bestimmung von Vitamin B<sub>6</sub> in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Z. Lebensm. Unters. Forsch., 181, 200-205.
- BOGNAR A. (1992). Determination of vitamin B<sub>1</sub> in food by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization. Fresenius J. Anal. Chem., 343, 155-156.
- BOGNAR A. (1993). Studies on the influence of cooking on the vitamin B<sub>6</sub> content of food. Bioavailability 93, 346-351.
- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO, N° 268, de 9 de noviembre (1981). Orden del 5 de noviembre por la que se aprueba la norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por el calor.
- BÖTTICHER B. & BÖTTICHER D. (1986). Simple rapid determination of thiamin by a HPLC method in foods, body fluids, urine and faeces. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 56, 155-159.
- BÖTTICHER B., BÖTTICHER D. & KLUTHE R. (1989). An HPLC method for the simultaneous determination of B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> vitamins in food. Akt. Ernähr., 14, 117-118.
- BOURQUIN A. & SHERMAN H.C. (1931). Quantitative determination of vitamin B<sub>2</sub>. J. Am. Chem. Soc., 53, 3501.
- BRINKMANN E., DEHNE L., BIJOSONO H., TIEBACH R. & BALTES W. (1995). Separation of geometrical retinol isomers in food samples by using

narrow-bore high-performance liquid chromatography. *J. Chromat., A* 693, 271-279.

-BRINKMANN E., MEHLITZ I., BIJOSONO H., TIEBACH R. & BALTES W. (1994). Determination of vitamin A in liver and liver-containing products using narrow-bore normal phase HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 206-209.

-BRUBACHER G. (1968). The determination of vitamins and carotenoids in fats. In *Analysis and Characterization of Oils, Fats and Fat Products*, Vol. II (H.A. Boekennoogen, ed.), Interscience Publishers, New York, pp. 607-654.

-BRUBACHER G., MÜLLER-MULOT W. & SOUTHGATE D. (1985). In *Method for the Determination of Vitamins in Food*. Elsevier Science Publishers, London.

-BUDOWSKI P. & BONDI A. (1957). Determination of vitamin A by conversion to anhydrovitamin A. *Analyst*, London, 82, 751-760.

-BUDOWSKI P. & BONDI A. (1957). Determination of vitamin A by conversion to anhydrovitamin A. *Analyst*, London., 82, 751-760.

-BUNNELL R.H. (1967). Vitamin E assay by chemical methods. In *The Vitamins*, 2nd edn, Vol. VI (P. György & W.N. Pearson, eds), Academic Press, New York, pp. 261-304.

-BUSLIG B.S., WILSON C.W. III & SHAW P.E. (1982). High-performance liquid chromatographic separation of carboxylic acids with anion-exchange and reverse-phase columns. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 342-345.

-CAMERON E., PAULING L. & LEIBOVITZ B. (1979). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Cancer Res.*, 39, 663.

- CANTONI C., CATTANEO P. & LAURI S. (1992). Sulla nicotinamide nei prodotti carnei e dati sperimentali. *Ingegneria Alimentare*, 5, 42-43.
- CARR R.S., BALLY M.B., THOMAS P. & NEFF J.M. (1983). Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Anal. Chem.*, 55, 1229-1232.
- CARRETERO BAEZA M.L. y GOMEZ VAZQUEZ M.D. (1995). En *Tablas de composición de alimentos españoles*, (Ministerio de Sanidad y Consumo, ed.), Departamento de Nutrición, Universidad Complutense.
- CHASE G., LANDEN W. & SOLIMAN A. (1993). Method modification for liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC Internat.*, 76(6), 1276-1280.
- CHASE G., LANDEN W., EITENMILLER R. & SOLIMAN A. (1992). Liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Internat.*, 75(3), 561-565.
- CHRISTIE A.A. & WIGGINS R.A. (1978). Developments in vitamin analysis. In *Developments in Food Analysis Techniques*, Vol. I (R.D. King, ed.), Applied Science Publishers, London, pp. 1-42.
- COBURN S.P. & MAHUREN J.D. (1983). A versatile cation-exchange procedure for measuring the seven major forms of vitamin B<sub>6</sub> in biological samples. *Anal. Biochem.*, 129, 310-317.
- Código Alimentario Español y disposiciones complementarias (1996). (M<sup>a</sup> D. Flores Cerdan y P. Deleuze Isasi, eds), Editorial Tecnos, S.A., Madrid.
- COMBS G. (1992). Fundamental aspects in nutrition and health. In *The Vitamins*, Academic Press, New York.

-COOPERMAN J.M. & LOPEZ R. (1991). Riboflavin. In *Handbook of Vitamins*, 2nd edn, (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.

-CORT W.M., VICENTE T.S., WAYSEK E.H. & WILLIAMS B.D. (1983). Vitamin E content of feedstuffs determined by high-performance liquid chromatographic fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1330-1333.

-COURSIN D.B. (1954). Convulsive seizures in infants with pyridoxine-deficient diet. *J. Am. Med. Ass.*, 154, 406-408.

-COUSTARD J.M. & SUDRAUD G. (1981). Séparation des acides ascorbique et isoascorbique par chromatographie de paires d'ions sur phase inverse. *J. Chromat.*, 219, 338-342.

-CUNNINGHAM E. & SNELL E.E. (1945). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Biol. Chem.*, 158, 491.

-DAWSON K., UNKLESBAY N. & HEDRICK H. (1988). HPLC determination of riboflavin, niacin, and thiamin in beef, pork, and lamb after alternate heat-processing methods. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1176-1179.

-DELDIME P., JACOBSBERG B. & BELHASSINE M. (1978). Contribution to the assessment of tocopherols in plant oils and fats by differential pulse voltammetry. *Analyt. Lett.*, AII(1), 63-72.

-DELEENHEER A.P., LAMBERT W.E. & NELIS H.J. (1992). In *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2nd edn, (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 235.

-DENNISON D., BRAWLEY T. & HUNTER G. (1981). Rapid high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid and

combined ascorbic acid-dehydroascorbic acid in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 927-929.

-DEVRIES J.W., EGBERG D.C. & HEROFF J.C. (1979). Concurrent analysis of vitamin A and vitamin E by reversed phase high performance liquid chromatography. In *Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages*, Vol. II (G. Charalambous, ed.), Academic Press, New York, pp. 477-497.

-DOLAN J.W. (1996). Improving an ion-pairing method. *LC-GC International*, October, 624-628.

-DRISKELL J.A. (1984). Vitamin B<sub>6</sub>. In *Handbook of Vitamins-Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects*, (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 379-401.

-DUGAN R.E., FRIGERIO N.A. & SIEBERT J.M. (1964). Colorimetric determination of vitamin A and its derivatives with trifluoroacetic acid. *Analyt. Chem.*, 36, 114-117.

-DUGGAN D.E., BOWMAN R.L., BRODIE B.B. & UDENFRIEND S. (1957). A spectrophotofluorometric study of compounds of biological interest. *Archs Biochem. Biophys.*, 68, 1-14.

-DYKE S.F. (1965). In *The Chemistry of the Vitamins*, Chapter 2, Interscience Publishers, New York.

-ELLEFSON W. (1984). Thiamine. In *Methods of Vitamin Assay*, 4th edn, (J. Augustin *et al.*, eds), John Wiley & Sons, New York.

-FAO (Food and Agriculture Organization) (1988). Requirements of Vitamin A, Iron, Folate, and Vitamin B<sub>12</sub>. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Series N° 23. Food and Agriculture Organization, Rome, p.107.

- FAVELL D.J. (1990). Vitamin analysis. Microbiological methods. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 237-246.
- FELLMAN J., ARTZ W., TASSINARI P., COLE C. & AUGUSTIN J. (1982). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 47, 2048-2050.
- FERNANDO S. & MURPHY P. (1990). HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 163-167.
- FINGLAS P. & FAULKS R. (1984). The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. *Food Chem.*, 15, 37-44.
- FINLEY J.M. & DUANG D. (1981). Resolution of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids by paired-ion reversed-phase chromatography. *J. Chromat.*, 207, 449-453.
- FONTAINE J. & HÖRR J. (1993). Determination of supplemented nicotinic acid or nicotinamide in compound feed by HPLC after cleaning of the feed extract with cationic sorbent extraction. *Agribiol. Res.*, 46(1), 10-19.
- FOX J., ACKERMAN S. & THAYER D. (1992). Fluorometric determination of thiamine vitamers in chicken. *J. AOAC Internat.*, 75(2), 346-354.
- FRIEDRICH W. (1987). *Handbuch der Vitamine*. Urban & Schwarzenberg. München.
- FUJITA T., KANBE K. & SASAKI K. (1983). Studies on high-performance liquid chromatographic determination of nicotinic acid in foods. *Seikatsu Eisei*, 27, 30.

-FUJIWARA M. & MATSUI K. (1953). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Anal. Chem.*, 25, 810-812.

-GARCIA ALMANSA A. (1983). Vitaminas (I y II). *Nutrición Clínica*, 3.

-GAUCH R., LEUENBERGER U. & MÜLLER U. (1992). Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> in Milch durch HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 312-315.

-GERMANN I. (1992). Antioxidant vitamins and cardiovascular diseases. *International Food Ingredients*, issue 5.

-GIGLIOTTI C. & DAGHETTA A. (1993). Indagine conoscitiva sul contenuto di acido nicotinico negli insaccati freschi. *Industrie Alimentari-XXXII*, febbraio, 113-120.

-GILPIN R.K. & SISCO W.R. (1980). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Chromat.*, 194, 285.

-GINTER E. (1979). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Lancet*, 2, 958.

-GREGORY J.F. (1983). Methods of vitamin assay for nutritional evaluation of food processing. *Food Technol.*, January, 75-80.

-GREGORY G., CHEN T. & PHILIP T. (1987). Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: red bell peppers. *J. Food Sci.*, 52(4), 1071-1073.

-GREGORY J.F. & KIRK J.R. (1979). Citado en "Determination of vitamin B<sub>6</sub> in animal tissues by reverse-phase high-performance liquid chromatography"

(GREGORY J.F., MANLEY D.B. & KIRK J.R., 1981), *Amer. J. Clin. Nutr.*, 32, 879.

-GREGORY J.F. & SARTAIN D.B. (1991). Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B<sub>6</sub> in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 899-905.

-GREGORY J.F. (1988). Methods for determination of vitamin B<sub>6</sub> in foods and other biological materials: a critical review. *J. Food Comp. Anal.*, 1, 105-123.

-GREGORY J.F., MANLEY D.B. & KIRK J.R. (1981). Determination of vitamin B<sub>6</sub> in animal tissues by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 921-927.

-GRYS S. (1975). An improved and accurate procedure for the determination of vitamin A. *Analyst*, London, 100, 637-639.

-GRYS S. (1980). Indirect spectrophotometry on vitamin A products: peak signal readout. *Meth. Enzym.*, 67F, 195-199.

-GUBLER C. (1991). Thiamine. In *Handbook of Vitamins*, 2nd edn, (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.

-HÄGG M. & KUMPULAINEN J. (1993). Thiamine and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. *J. Food Comp. Anal.*, 6, 299-306.

-HÄGG M. & KUMPULAINEN J. (1994). Thiamine and riboflavin contents in finnish pig, heifer, and cow livers and in pork loin. *J. Food Comp. Anal.*, 7, 1-6.

-HÄGG M. & KUMPULAINEN J. (1994). Thiamine and riboflavin contents of finnish breads and their corresponding flours. *J. Food Comp. Anal.*, 7, 94-101.

- HÄGG M. (1994). Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods. *J. AOAC Internat.*, 77(3), 681-686.
- HAKANSSON B., JAGERSTAD M. & OSTE R. (1987). Determination of vitamin E in wheat products by HPLC. *J. Micronutr. Anal.*, 3, 307-318.
- HAMANO T., MITSUHASHI Y., AOKI N. & YAMAMOTO S. (1988). Simultaneous determination of niacin and niacinamide in meats by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 457, 403-408.
- HANCK A. & WEISER H. (1979). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, Supplement 19, 83.
- HARRIS L.J., MAPSON L.W. & WANG Y.L. (1942). Vitamin methods. A simple potentiometric method for determining ascorbic acid suitable for use with colored extracts. *Biochem. J.*, 36, 183.
- HASHMI M. (1973). In *Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations*, John Wiley & Sons, London & New York.
- HASSELMANN C., FRANCK D., GRIMM P., DIOP P. & SOULES C. (1989). High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. *J. Micronutr. Anal.*, 5, 269-279.
- HEDLUND B. (1982). Analysis of vitamins in food by HPLC. In *Recent Developments in Food Analysis*. (Baltes W., Czedík-Eysenberg P.B. & Pfannhauser W., eds), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 27-32.
- HERVE C., BEYNE P. & DELACOUX E. (1994). Determination of thiamine and its phosphate esters in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography with isocratic elution. *J. Chromat.*, B 653, 217-220.

-HEWLETT-PACKARD ESPAÑOLA S.A. (1988). Folleto de especificaciones del HP 1090 Serie M, N° de publicación 12-5954-9890.

-HILKER D.M. & CLIFFORD A.J. (1982). Thiamin analysis and separation of thiamin phosphate esters by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. Biomedical Applications*, 231, 433-438.

-HORNIG D. (1975). Metabolism of ascorbic acid. *World Rev. Nutr. Diet.*, 23, 225-258.

-HORWITT M.K., HARPER A.E. & HENDERSON L.M. (1981). Niacin-tryptophan relationships for evaluating niacin equivalents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 423-427.

-HORWITT M.K., LIEBERT E., KREISLER O. & WITTMAN P. (1948). Investigations of human requirements for B-complex vitamins. *Bulletin of the National Research Council N° 116*. National Academy of Sciences, Washington, DC, p. 106.

-HOZOVA B. & SORMAN L. (1991). Combination of irradiation and thermal processing food irradiation. Elsevier Science Publishers, London, pp. 207-234.

-HOZOVA B. & TAKACSOVA M. (1993). The influence of combined storage procedures of foods on B vitamins content demonstrated at the example of heat sterilisation and irradiation. *Die Nahrung*, 38(4), 345-351.

-HOZOVA B., SORMAN L., DUDASOVA S. & RAJNIAKOVA A. (1988). Study of retention of vitamin B<sub>6</sub> in non-traditionally canned foods on using an experimental plan method. *Die Nahrung*, 32(4), 413-414.

-HUBBARD R., BROWN P.K. & BOWNDS D. (1971). *Retinol. Meth. Enzym.*, 18C, 644-647.

- HULSE J.D., ELLIS S.R. & HENDERSON L.M. (1978). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Biol. Chem.*, 253, 1654.
- HYTTEN F.E. (1980). Nutrition. In *Clinical Physiology in Obstetrics*, (F. Hytten & G. Chamberlain, eds), Blackwell, Oxford, pp. 163-192.
- INDYK H. (1983). The routine, simultaneous determination of vitamins A and E in fortified whole milk powders. *NZ J Dairy Sci. Technol.*, 18, 197-208.
- ISHII K., SARAI K., SANEMORI H. & KAWASAKI T. (1979). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Anal. Biochem.*, 97, 191.
- IUPAC (1970). Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochem.*, 147(1).
- IWASE H. & ONO I. (1993). Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in juices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using L-cysteine as precolumn reductant. *J. Chromat., A 654*, 215-220.
- JANSEN B.C.P. (1972). In *The Vitamins*, 2nd edn, Vol. V (W.H. Sebrell & R.S. Harris, eds), Academic Press, New York, p. 99.
- JANSSON L., AKESSON B. & HOLMBERG L. (1981). Vitamin E and fatty acid composition of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 8-13.
- JOHNSON B.C. (1945). The microbiological determination of nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinuric acid. *J. Biol. Chem.*, 159, 227.
- JOHNSON C. (1979). The antioxidant vitamins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 11, 217-309.

- JOHNSON C., WOTECKI C. & MURPHY R. (1984). Smoking, vitamin supplement use, and other factors affecting serum vitamin C. *Fed. Proc.*, 43, 666.
- JOHNSON H. & BRANZELL C. (1987). High performance liquid chromatographic determination of riboflavin in food. A comparison with a microbiological method. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 57, 53-58.
- KADER Z. & RYLEY J. (1988). The riboflavin content of blanched soya beans, a comparison of three methods of analysis. *J. Micronutr. Anal.*, 4, 169-175.
- KAMANGAR T. & FAWZI A.B. (1978). Spectrophotometric determination of vitamin A in oils and fats. *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 61, 753-755.
- KAMMAN J., LABUZA T. & WARTHESEN J. (1980). Thiamin and riboflavin analysis by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 45, 1499-1504.
- KASPAREK S. (1980). Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In *Vitamin E. A Comprehensive Treatise*, (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 7-65.
- KAWASAKI C. (1963). Modified thiamine compounds, In *Vitamins and Hormones*, Vol. XXI (R.S. Harris, ed.), Academic Press, New York.
- KITADA Y., INONE M., TAMASE K., IMOU M., HASUIKE A., SASAKI M. & TANIGAWA K. (1982). Analysis of nicotinic acid and nicotinamide in foods by ion-pair HPLC. *Eiyo Shokuryo*, 35, 121-124.
- KODAKA K., INAGAKI S., UJIE T., UENO T. & SUDA H. (1985). Determination of total vitamin C in foods by high-performance liquid chromatography. *Vitamin*, 59(5), 451-455.

- KRAMPITZ L.O. (1968). Citado en "Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), Ann. Rev. Biochem., 38, 213.
- KUTNINK M. & OMAYE S. (1987). Determination of ascorbic acid, erythorbic acid, and uric acid in cured meats by high performance liquid chromatography. J. Food Sci., 52(1), 53-56.
- LASCHI-LOQUERIE A., VALLAS S., VIOLLET J., LECLERCQ M. & FAYOL V. (1992). High performance liquid chromatographic determination of total thiamine in biological and food products. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 62, 248-251.
- LAWN R.E., HARRIS J.R. & JOHNSON S.F. (1983). Some aspects of the use of high-performance liquid chromatography for the determination of vitamin A in animal feeding stuffs. J. Sci. Food Agric., 34, 1039-1046.
- LEACH D., STADALIUS M., BERUS J. & SNYDER L. (1988). Reversed-phase HPLC of basic samples. LC-GC International, 1(5), 22-30.
- LEBOULANGER J. (1981). En *Las Vitaminas*, (Laboratorios Roche, ed.), Madrid.
- LEENHEER A.P. & LAMBERT W.E. (1985). In *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- LEHNINGER A.L. (1983). In *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York.
- LETH T. & JACOBSEN J. (1993). Vitamin A in danish pig, calf, and ox liver. J. Food Comp. Anal., 6, 3-9.
- LIM K., YOUNG R. & DRISKELL J. (1980). Separation of vitamin B<sub>6</sub> components by high-performance liquid chromatography. J. Chromat., 188, 285-288.

- LINDQUIST J. & FERROHA S.M. (1975). Citado en “*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*” (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Analyst*, London, 100, 377.
- LOPEZ A. y COS A. (1992). Vitaminas. En *Manual de Alimentación y Nutrición*, (López C. y Vázquez C., eds), Madrid.
- LOPEZ C., HERNANDEZ M. y SANCHEZ C. (1990). Determinación cinética de ácido ascórbico en zumos de frutas. *Anal. Chem.*, 87, 683-686.
- LUMLEY I.D. & WIGGINS R.A. (1981). Determination of riboflavin and flavin mononucleotide in foodstuffs using high-performance liquid chromatography and a column-enrichment technique. *Analyst*, 106(10), 1103-1108.
- LYON J. (1987). En *Le Grand Livre des Vitamines*, (Martínez Roca, ed.), Barcelona.
- MACRAE R., NICOLSON I.A., RICHARDSON D.P. & SCOTT K.J. (1984). Chromatographic determination of vitamins in dairy products. *RSC Proc. Challenges in Dairy Analytical Techniques*, Reading, pp. 155-166.
- MAHONEY M.J. & ROSENBERG L.E. (1971). Citado en “*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*” (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Lab. Clin. Med.*, 78, 302.
- MANZ U. & PHILIPP K. (1981). A method for the routine determination of tocopherols in animal feed and human foodstuffs with the aid of high-performance liquid chromatography. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 51, 342-348.
- MATTHEY M., GRAF H., LÜDKE C. & FLACHOWSKY G. (1993). Influence of frying and microwave treatment on the vitamin-A-content of livers of turkeys. In *Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrient Availability*, (U. Schlemmer, ed.), Ettlingen, May, pp. 9-12.

-MATTS F. (1980). Riboflavin. In *Vitamins in Medicine*, 4th edn, Vol. I (B. Barker & D. Bender, eds), William Heinemann Medical Books LTD, London.

-MAURO D. & WETZEL D. (1984). Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in enriched cereal based products by high-performance liquid chromatography using selective detection. *J. Chromat.*, 299, 281-287.

-McBRIDE H.D. & EVANS D.H. (1973). Rapid voltammetric method for the estimation of tocopherols and antioxidants in oils and fats. *Analyt. Chem.*, 45, 446-449.

-McCORMICK D.B. (1988). Thiamin. In *Modern Nutrition in Health and Disease*, 7th edn, (M.E. Shils & V.R. Young, eds), Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 355-361.

-McKEE R.N., KANG-LEE Y.A., PANAQUA M. & SWENDSEID M.E. (1982). Determination of nicotinamide and metabolic products in urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 230, 309-317.

-McMURRAY C.H., BLANCHFLOWER W.J. & RICE D.A. (1980). Influence of extraction techniques on determination of  $\alpha$ -tocopherol in animal feedstuffs. *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 63, 1258-1261.

-MERCK INDEX (1989). 11th edn, Merck & Co., Inc., USA.

-MEYER B.J., LAGALLY H. & DODDS M.L. (1965). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Anal. Biochem.*, 4, 88.

-MOLEDINA K.H. & FLINK J.M. (1982). Determination of ascorbic acid in plant food products by high performance liquid chromatography, *Lebensm.-Wiss. Unters. -Technol.*, 15, 351-358.

- MÖLLER J. & BITSCH R. (1988). Einsatz der hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur simultanen bestimmung der pyridoxinderivate aus biologischen materialien. *Ernährungs-Umschau*, 35 (9), 324-328.
- MORAWSKI J. (1984). Analysis of dairy products by HPLC. *Food Technol.*, 38(4), 70-78.
- MOREIRAS O., CARBAJAL A. y CABRERA L. (1994). En *Tablas de composición de alimentos*, Departamento de nutrición, Universidad Complutense de Madrid.
- MORRISSEY P., BUCKLEY D. & SHEEHY P. (1994). Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 289-295.
- MORRISSEY P., SHEEHY P. & GAYNOR P. (1992). Vitamin E. Flair concerted action, 10, 260-264.
- NAIL P.A., THOMAS M.R. & EAKIN B.S. (1980). The effect of thiamin and riboflavin supplementation on the level of those vitamins in human breast milk and urine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 198-204.
- National Research Council (NRC) (1989). In *Recommended Dietary Allowances*, 10th edn, National Academy Press, Washington, DC.
- NOBILE S., SAVAGE V. & HUBER U. (1972). A new procedure for the determination of thiamine in foods. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 42, 444-450.
- OLLILAINEN V., MATTILA P., VARO P., KOIVISTOINEN P. & HUTTUNEN J. (1990). The HPLC determination of total riboflavin in foods. *J. Micronutr. Anal.*, 8, 199-207.

-OLLILAINEN V., VAHTERISTO L., UUSI-RAURA A., VARO P., KOIVISTOINEN P. & HUTTUNEN J. (1993). The HPLC determination of total thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) in foods. *J. Food Comp. Anal.*, 6, 152-165.

-OLSON J.A. (1965). The determination of the fat-soluble vitamins: A, D, E and K. In *Newer Methods of Nutritional Biochemistry*, Vol. II (A.A. Albanese, ed.), Academic Press, New York, pp. 345-402.

-OTTAWAY P. (1994). Vitamins as technical aids in food processing. *Food Technol. Internat.*, 111-114.

-PAROLARI G. (1982). L'acido ascorbico nelle carni. *Industria Conserve*, 57, 19-21.

-PARRIS N.A. (1978). Non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. A neglected approach to the analysis of low polarity samples. *J. Chromat.*, 157, 161-170.

-PASSMORE R. & EASTWOOD M.A. (1986). In *Human Nutrition and Dietetics*, 8th edn, (Davidson & Passmore, eds), Churchill Livingstone, New York.

-PICCININO R. (1985). La incorporación de vitaminas a los productos alimenticios en el ámbito de la normativa nacional y comunitaria. *Alimentaria*, Septiembre, 51-56.

-PIIRONEN V., LILJEROOS A. & KOIVISTOINEN P. (1991). Transfer of  $\alpha$ -tocopherol stereoisomers from feeds to eggs. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 99-101.

-PIIRONEN V., SYVÄOJA E., VARO P., SALMINEN K. & KOIVISTOINEN P. (1985). Tocopherols and tocotrienols in finnish foods: meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1215-1218.

-PIKKARAINEN S. & PARVIAINEN M. (1992). Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver-based ready-to-eat foods. *J. Chromat.*, 577, 163-166.

-PIKKARAINEN S. & PARVIAINEN M. (1993). Vitamin A levels in bovine and pork liver. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 63, 86-88.

-PONTING J.D. (1943). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 15, 389.

-PRASAD J.S. (1975). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Clin. Chem. Acta*, 59, 101.

-RAMMELL C.G., CUNLIFFE B. & KIEBOOM A.J. (1983). Determination of  $\alpha$ -tocopherol in biological specimens by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromat.*, 6, 1123-1130.

-RAMOS M., GONZALEZ J., REUVERS TH. y RUIZ E. (1989). Contenido de vitaminas A, C y E en diferentes tipos de alimentos del mercado español. *Alimentaria*, Diciembre, 51-59.

-REID M.E. (1947). Bioassay methods for vitamin C. *Estimation of Vitamins. In Biological Symposia XII*, Jacques Cattell Press, Lancaster, Pa, p. 373.

-REITZER-BERGAENTZLE M., MARCHIONI E. & HASSELMANN C. (1993). HPLC determination of vitamin B<sub>6</sub> in foods after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamers into pyridoxol. *Food Chem.*, 48, 321-324.

-RETTENMAIER R. & SCHÜEP W. (1992). Determination of vitamins A and E in liver tissue. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 62, 312-317.

- REUVERS TH., POZUELO M., RAMOS M. y JIMENEZ R. (1982). Determinación cuantitativa simultánea de las vitaminas A y E en alimentos infantiles, mediante cromatografía líquido-líquido de alta eficacia. Boletín CENAN- N° 10, 3-6.
- REYES E. & SUBRYAN L. (1989). An improved method of simultaneous HPLC assay of riboflavin and thiamin in selected cereal products. *J. Food Comp. Anal.*, 2, 41-47.
- REYES E., NORRIS K., TAYLOR C. & POTTS D. (1988). Comparison of paired-ion liquid chromatographic method with AOAC fluorometric and microbiological method for riboflavin determination in selected foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 71(1), 16-19.
- REYNOLDS S.L. (1984). The use of HPLC in the determination of fat-soluble vitamins in a variety of milk-based food products. In *Developments in Applications of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Foods*, Royal Soc. Chem. Symp., September, pp. 43-50.
- RIZZOLO A., FORNI E. & POLESELLO A. (1984). HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. *Food Chem.*, 14, 189-199.
- ROE J.H., MILLS M.B., OESTERLING M.J. & DAMERON C.M. (1948). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Biol. Chem.*, 174, 201.
- ROELS O.A. & MAHADEVAN S. (1967). Vitamin A. In *The Vitamins*, 2nd edn, Vol. VI (P. György & W.N. Pearson, eds), Academic Press, New York, pp. 139-197.
- ROJAS HIDALGO E. (1985). En *Dietética. Principios y Aplicaciones*. (CEA, ed.), Grupo Jarpyo, Madrid.

- RUSSELL L. & VANDERSLICE J. (1992a). Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. *Food Chem.*, 43, 79-82.
- RYAN M. & INGLE J. (1980). Fluorometric reaction rate method for the determination of thiamine. *Anal. Chem.*, 52, 2177-2184.
- SAHBAZ F. & SOMER G. (1993). Photosensitized decomposition of ascorbic acid in the presence of riboflavin. *Food Chem.*, 46, 177-182.
- SAKAI H., SUZUKI A., IZAWA K. & NIIMI T. (1985). Determination of nicotinamide in premixes by high performance liquid chromatography. *Shiryō Kenkyū Hokoku (Tokyo Hishiryō Kensasho)*, 10, 122-129.
- SANDER S., HAHN A., STEIN J. & REHNER G. (1991). Comparative studies on the high-performance liquid chromatographic determination of thiamine and its phosphate esters with chloroethylthiamine as an internal standard using pre- and post-column derivatization procedures. *J. Chromat.*, 558, 115-124.
- SAWAMURA M., OOISHI S. & LI Z. (1990). Reduction of dehydroascorbic acid by sodium hydrosulphide and liquid chromatographic determination of vitamin C in citrus juices. *J. Sci. Food Agric.*, 53, 279-281.
- SCHMALL M., PIFER C.W. & WOLLISH E.G. (1953). Determination of ascorbic acid by a new colorimetric reaction. *Anal. Chem.*, 25, 1486.
- SCHOONHOVEN J., SCHRIJVER J., BERG H. & HAENEN G. (1994). Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B<sub>6</sub> in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1475-1480.

- SCHUDEL P., MAYER H. & ISLER O. (1972). Tocopherols. 2. Chemistry. In *The Vitamins*, 2nd edn, Vol. V (W.H. Sebrell & R.S. Harris, eds), Academic Press, New York, pp. 168-217.
- SCHÜEP W. & KECK E. (1990). Measurement of ascorbic acid and erythorbic acid in processed meat by HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 191, 290-292.
- SCHWIETER U. & ISLER O. (1967). Vitamins A and carotene. 2. Chemistry. In *The Vitamins*, 2nd edn, Vol. I (W.H. Sebrell & R.S. Harris, eds), Academic Press, New York, pp. 5-99.
- SCOTT M.L. (1978). Vitamin E. In *Handbook of Lipid Research*, Vol. II (H.F. Deluca, ed.), Plenum Press, New York, pp. 133-210.
- SCOTTER M., THORPE S., REYNOLDS S., WILSON L. & LEWIS D. (1992). Survey of animal livers for vitamin A content. *Food Additives and Contaminants* 9(3), 237-242.
- SENYK G.F., GREGORY J.F. & SHIPE W.F. (1975). Modified fluorometric determination of vitamin A in milk. *J. Dairy Sci.*, 58, 558-560.
- SHAH J. (1984). Riboflavin. In *Methods of Vitamin Assay*, 4th edn, (J. Augustin *et al.*, eds), John Wiley & Sons, New York.
- SHERMAN H.C., LAMER V.K. & CAMPBELL H.L. (1922). The quantitative determination of the antiscorbutic vitamin. *J. Am. Chem. Soc.*, 44, 165.
- SHORTT C. (1990). Micronutrients and health, I : vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, July, 17-19.
- SIMS A. & SHOEMAKER D. (1993). Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods. *J. AOAC Internat.*, 76(5), 1156-1160.

-SKURRAY G. (1981). A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamine in foods. *Food Chem.*, 7, 77-80.

-SMITH J.L. & HODGES R.E. (1987). Serum levels of vitamin C in relation to dietary and supplemental intake of vitamin C in smokers and nonsmokers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 498, 144-152.

-SNELL E.E. & WRIGHT L.D. (1941). A microbiological method for the determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, 139, 675.

-SNYDER L.R., GLAJCH J.L. & KIRKLAND J.J. (1988). In *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, New York.

-SOOD S., SARTORI L., WITTMER D. & HANEY W. (1976). High-pressure liquid chromatographic determination of ascorbic acid in selected foods and multivitamin products. *Anal. Chem.*, 48(6), 796-798.

-SPEEK A., SCHRIJVER J. & SCHREURS W. (1984). Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 352-355.

-STEINER F. (1992). In *Applications of Narrow-bore Columns in HPLC*, Hewlett-Packard GmbH, Germany.

-STEINER I., HRUSCHKA G., WASHÜTTL J. & KROYER G. (1993). Selected B-vitamins in foodstuffs after conventional cooking and microwave treatment. *Ernährung/Nutrition*, 17(4), 221-225.

-STROHECKER R. & HENNING H.M. (1966). In *Vitamin Assay-Tested Methods*, (Translated by D.D. Libman), Verlag Chemie, Weinheim.

- SUHARA T., TORIDA S., ITO K. & FUKUMOTO Y. (1985). Determination of vitamina B<sub>2</sub> in feed premixes by high-performance liquid chromatography. *Shiryō Kenkyū Hokoku* (Tokyo Hishiryō Kensasho), 10, 152-163.
- SYKES P. & TODD A.R. (1951). Citado en “*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*” (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *J. Chem. Soc.*, 534-544.
- TAKATSUKI K., SUZUKI S., SATO M., SAKAI K. & USHIZAWA I. (1987). Liquid chromatographic determination of free and added niacin and niacinamide in beef and pork. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 70(4), 698-702.
- THOMPSON J.N. (1986). Problems of official methods and new techniques for analysis of foods and feeds for vitamin A. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 69, pp. 727-38.
- THOMPSON J.N., HATINA G. & MAXWELL W.B. (1979). Determination of vitamins E and K in foods and tissues using high-performance liquid chromatography. In *Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry*, (H.S. Hertz & S.N. Chesler, eds), National Bureau of Standards Special Publication 519, Washington, DC.
- TILLMANS J. (1927). Citado en “*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*” (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 54, 33.
- TOMA R. & TABEKHIA M. (1979). High performance liquid chromatographic analysis of B-vitamins in rice and rice products. *J. Food Sci.*, 44(1), 263-268.
- TRUGO L., MACRAE R. & TRUGO N. (1985). Determination of nicotinic acid in instant coffee using high-performance liquid chromatography. *J. Micronutr. Anal.*, 1, 55-63.

- TSAO C.S. & SALIMI S.L. (1982). Differential determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromat.*, 245(3), 355-358.
- TYLER T. & GENZALE J. (1990). Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina, and cottage cheese. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 73(3), 467-469.
- UEDA T. (1990). Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - Pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 79-96.
- UHEROVA R., BUCHTOVA V. & TAKACSOVA M. (1992). Nährwertfaktoren im Wildfleisch. *Fleischwirtschaft*, 72, Jahrgang, August.
- UHEROVA R., FEDOROVA N. & DUBRAVICKY J. (1993). The study of vitamin interaction with the reactive constituents of smoking agent. *Die Nahrung*, 37(1), 85-87.
- UHEROVA R., HOZOVA B. & SMIRNOV V. (1993). The effect of microwave heating on retention of some B vitamins. *Food Chem.*, 46, 293-295.
- VANDEMARK F. & SCHMIDT G. (1981). Determination of water soluble vitamins in pharmaceutical preparations using liquid chromatography. *J. Liq. Chromat.*, 4(7), 1157-1171.
- VANDERSLICE J., MAIRE C., DOHERTY R. & BEECHER G. (1980). Sulfosalicylic acid as an extraction agent for vitamin B<sub>6</sub> in food. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1145-1149.
- VANDERSLICE J. & HIGGS D. (1988). Chromatographic separation of ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid and their quantitation in food products. *J. Micronutr. Anal.*, 4, 109-118.

-VANDERSLICE J. & HIGGS D. (1989). Automated analysis of total vitamin C in foods. *J. Micronutr. Anal.*, 6, 109-117.

-VANDERSLICE J. & HIGGS D. (1990). Separation of ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and animal tissue. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 67-70.

-VANDERSLICE J. & HIGGS D. (1991). Vitamin C content of foods: sample variability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 1323S-1327S.

-VANDERSLICE J. & HIGGS D. (1993). Quantitative determination of ascorbic, dehydroascorbic, isoascorbic, and dehydroisoascorbic acids by HPLC in foods and other matrices. *J. Nutr. Biochem.*, 4, March, 184-190.

-VANDERSLICE J. & HUANG M. (1986). Liquid chromatographic analysis of thiamin and its phosphates in food products using amprolium as an internal standard. *J. Micronutr. Anal.*, 2, 189-199.

-VANDERSLICE J., BROWNLEE S. & CORTISSOZ M. (1984). Liquid chromatographic determination of vitamin B<sub>6</sub> in foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 67(5), 999-1007.

-VANDERSLICE J., HIGGS D., HAYES M. & BLOCK G. (1990). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods-as-eaten. *J. Food Comp. Anal.*, 3, 105-118.

-VANDERSLICE J.T., STEWART K.K. & YARMAS M.M. (1979). Liquid chromatographic separation and quantification of B<sub>6</sub> vitamers and their metabolite, pyridoxic acid. *J. Chromat.*, 176, 280-285.

-VIDAL-VALVERDE C. & RECHE A. (1990a). An improved high performance liquid chromatographic method for thiamin analysis in foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 191, 313-318.

-VIDAL-VALVERDE C. & RECHE A. (1990b). Reliable system for the analysis of riboflavin in foods by high performance liquid chromatography and UV detection. *J. Liq. Chromat.*, 13(10), 2089-2101.

-VIDAL-VALVERDE C. y RECHE A. (1991). Determination of available niacin in legumes and meat by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 116-121.

-VIVANCO F., PALACIOS J.M. y GARCIA ALMANSA A. (1990). En *Alimentación y Nutrición*, (Dirección General de Sanidad, ed.), Sección de Nutrición, Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas.

-WALTKING A.E., KIERNAN M. & BLEFFERT G.W. (1977). Evaluation of rapid polarographic method for determining tocopherols in vegetable oils and oil-based products. *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 60, 890-894.

-WATADA A. & TRAN T. (1985). A sensitive high-performance liquid chromatography method for analyzing riboflavin in fresh fruits and vegetables. *J. Liq. Chromat.*, 8(9), 1651-1662.

-WEBER P., BENDICH A. & SCHALCH W. (1966). Vitamin C and human health - a review of recent data relevant to human requirements. *Internat. J. Vit. Nutr. Research*, 66(1), pp. 19-30.

-WEERDHOF T., WIERSUM M. & REISSENWEBER H. (1972). Application of liquid chromatography in food analysis. *J. Chromat.*, 83, 455-460.

-WEHLING R. & WETZEL D. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin, and thiamin in fortified cereal products by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1326-1331.

-WELT B. & TONG C. (1993). Effect of microwave power and electromagnetic energy. *J. Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 28(4), 187-195.

- WIELDERS J. & MINK C. (1983). Quantitative analysis of total thiamine in human blood, milk and cerebrospinal fluid by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 277, 145-156.
- WILLIAMS A.K. & COLE P.D. (1975). Vitamin B<sub>6</sub>: Ion exchange chromatography of pyridoxal, pyridoxol and pyridoxamine. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 915-916.
- WILLIAMS R.D., MASON H.L., SMITH B.F. & WILDER R.M. (1942). Induced thiamin deficiency and the thiamine requirement of man: further observations. *Archs Internat. Med.*, 69, 721-738.
- WILLIAMS W.L. (1946). Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, 166, 397.
- WILLS R., SHAW C. & DAY W. (1977). Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. *J. Chromat. Sci.*, 15, July, 262-266.
- WIMALASIRI P. & WILLS R. (1985). Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 318, 412-416.
- WOIDICH H., PFANNAHUSER W. & BLAICHER G. (1978). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Lebensm. Chem. Gericht. Chem.*, 32, 74.
- WONG F.F. (1978). Analysis of vitamin B<sub>6</sub> in extractives of food materials by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1444-1446.
- WOODCOCK E.A., WARTHESEN J.J. & LABUZA T.P. (1982). Riboflavin photochemical degradation in pasta measured by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 47, 545-549, 555.

- WOODRUFF C.W. (1975). Ascorbic acid-scurvy. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1, 493-506.
- WOOLLARD D.C. (1987). Quality control of the fat-soluble vitamins in the New Zealand dairy industry. *Food Technol. Aust.*, 39, 250-253.
- WOSTMAN B.S. & KNIGHT P.L. (1960). Citado en "*Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*" (Leenheer A.P. & Lambert W.E., 1985), *Experientia*, 16, 500.
- YASUMOTO K., TADERA K., TSUJI H. & MITSUDA H. (1975). Semi-automated system for analysis of vitamin B<sub>6</sub> complex by ion-exchange column chromatography. *J. Nutr. Sci. Vit.*, 21, 117-127.
- YOSHIDA K., YAMAMOTO Y. & FUJIWARE M. (1982). Simple analytical method for niacin (nicotinic acid) and nicotinamide in foods by high-performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 23(6), 428-433.
- YOST R.W., ETTRE L.S. & CONLON R.D. (1981). In *Practical Liquid Chromatography-An Introduction*, 1st edn, The Perkin-Elmer Corporation, USA.
- ZANDI P. & McKAY J.E. (1976). Determination of tocopherols in soybean oil using fractional crystallisation. *J. Sci. Food Agric.*, 27, 843-848.
- ZONTA F. & STANCHER B. (1983). High-performance liquid chromatography of tocopherols in oils and fats. *Riv. ital sostanze grasse*, 60, 195-199.