



Validación de un método analítico por HPLC en fase reversa para la determinación de Vitaminas B1 y B2 en cereales

Validation of an analytical method by HPLC in reverse phase for the determination of Vitamin B1 and B2 in cereals

GREILE D ORTIZ M^{1*}, ALICIA M RINCÓN C^{**}, LIZET Y BOU RACHED R^{2**}

Resumen

Introducción: La necesidad de evaluar el cumplimiento del Plan Nacional de enriquecimiento por parte de la Industria alimentaria, para así garantizar los nutrientes para la población venezolana, ha conducido a obtener métodos analíticos confiables, precisos, rápidos y validados. En el presente trabajo se optimizó y validó un método analítico por HPLC en fase reversa para la identificación y cuantificación de las vitaminas B1 y B2 en un producto de alto consumo de los venezolanos como es la harina de maíz precocida y enriquecida con esos micronutrientes. **Objetivo:** Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) para la determinación de vitaminas B1 (tiamina) y B2 (riboflavina) en cereales. **Materiales y métodos:** La muestra utilizada fue harina de maíz precocida, adquirida en un supermercado local en la ciudad de Caracas. Se usó el equipo HPLC, marca Waters, con una columna Symetry C18. El método inicial para la validación fue el establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 42 NF 37, sección de suplementos dietéticos y vitaminas hidrosolubles, ensayos para tiamina y riboflavina. **Resultados:** Se optimizó y validó el método por HPLC para determinar las vitaminas B1 y B2, verificando que el procedimiento cromatográfico genera resultados consistentes y fiables, con desviaciones estándar relativas menores al 2%. Los parámetros de linealidad, selectividad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación son conformes con los valores establecidos por las normas ISO. Se extrajeron las vitaminas en estudio en dos muestras de harinas comerciales de cereales enriquecidos, permitiendo comparar con lo declarado por el fabricante. **Conclusiones:** Se demostró que el método HPLC optimizado puede ser aplicado para el análisis de productos derivados de cereales enriquecidos. Proporcionó una linealidad y precisión comparables al método de referencia establecido por la USP. El método propuesto tiene la ventaja de determinar rápida y simultáneamente ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica, a una misma longitud de onda, en un tiempo total de 10 min.

Palabras clave: Validación, método analítico, HPLC, fase reversa, tiamina, riboflavina, harinas de cereales enriquecidas

Abstract

Introduction: The need to evaluate compliance with the National Enrichment Plan by the industry to guarantee nutrients for the Venezuelan population has led to the obtaining of reliable, precise, rapid, and validated analytical methods. In the present work, an analytical method by HPLC in reverse phase was optimized and validated for identifying and quantifying vitamins B1 and B2 in a product of high consumption by Venezuelans, such as precooked corn flour enriched with those micronutrients. **Objective:** Validate an analytical method by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of vitamins B1 (thiamine) and B2 (riboflavin) in cereals. **Materials and methods:** The sample used was precooked corn flour purchased at a local supermarket in Caracas. Waters HPLC equipment was used with a Symmetry C18 column. The initial method for validation was established by United States Pharmacopeia (USP) 42 NF 37, the section on dietary supplements and water-soluble vitamins, and assays for Thiamine and Riboflavin. **Results:** It was possible to optimize and validate the HPLC method applied to determine vitamins B1 and B2, verifying that the chromatographic procedure generates consistent and reliable results with relative standard deviations less than 2%. Parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit, and quantification limit were obtained within the values established by ISO standards. The vitamins under study were extracted in two samples of enriched commercial cereal flours, allowing for a comparison with what was declared by the manufacturer. **Conclusions:** It was demonstrated that the optimized HPLC method can be applied to analyzing products derived from fortified cereals. It provided linearity and precision comparable to the reference method established by USP. The proposed method has the advantage of quickly and simultaneously determining both vitamins in a single chromatographic run at the same wavelength, with less time in the assay.

Keywords: Validation, analytical method, HPLC, reverse phase, thiamine, riboflavin, enriched cereal flours

*Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. **Unidad de Investigación Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: lizetbourachedr@gmail.com

Orcid: [10009-0004-0474-6181](https://orcid.org/0009-0004-0474-6181)
[20009-0005-8951-0377](https://orcid.org/0009-0005-8951-0377)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.13](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.13)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 31/10/2024
Aprobación: 05/12/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 265-280. 2024

Introducción

Los cereales son considerados la principal fuente de alimentos a nivel mundial (FAO, 2002). Los productos a base de cereales, además de proporcionar energía, proteínas, vitaminas del grupo B y minerales como fósforo, potasio y magnesio, y compuestos bioactivos como lignanos son beneficiosos para la salud. Resultan económicos de producir, fáciles de almacenar y transportar, y mantienen su calidad por más tiempo si se conservan en un ambiente seco. Son plantas cultivadas principalmente por sus semillas comestibles altamente nutritivas, las cuales son comúnmente conocidas como granos.

El arroz, el maíz y el trigo representan aproximadamente el 60 % de la energía obtenida de los alimentos en todo el mundo, lo que los convierte en alimentos básicos para más de 7000 millones de personas (McKevith, 2004). En Venezuela, la harina de maíz precocida representa el principal alimento consumido por la población (Zambrano y Sosa, 2018), usada en la preparación de la arepa y otros productos similares; siendo esta la razón por la cual es seleccionada como vehículo ideal para el enriquecimiento con algunas vitaminas y minerales. La harina de maíz precocida (HMP) se obtiene industrialmente a partir del endospermo del grano de maíz, el cual ha sido desprovisto del germen y de la cutícula, proceso que se lleva a cabo por medio de la molienda húmeda. Este producto es considerado un alimento estratégico de producción centralizada y de consumo masivo, siendo el ingrediente principal de la popular arepa. Además, la HMP también es un elemento esencial en la elaboración de la tradicional hallaca navideña. En su forma original, la HMP

contiene pequeñas cantidades de vitaminas del complejo B, menos de 4 mg de hierro y ninguna actividad de vitamina A. Debido a estas características, la HMP se convierte en un vehículo ideal para enriquecerse con hierro y vitaminas, como la B1 y B2 (Gaceta oficial, 1992).

La molienda es el principal proceso tecnológico relacionado con los cereales. Existen diversas técnicas de molienda adaptadas a cada tipo de cereal, así como otros procesos como la extrusión y la fermentación que pueden ser utilizados en la elaboración de productos derivados de los cereales. Estos procesos, además de tener implicaciones técnicas, también modifican el contenido nutricional de los cereales. Muchos alimentos a base de cereales son sometidos a procesos de calor que pueden afectar la biodisponibilidad de minerales como hierro, calcio y zinc. Durante procesos de ebullición, se pueden perder alrededor del 40% de las vitaminas B, con mayores pérdidas en folato. Por otro lado, las pérdidas durante el horneado suelen ser menores, excepto en el caso del folato (McKevith, 2004).

La riboflavina (vitamina B2) funciona en conjunto con las otras vitaminas del complejo B. Es importante para el crecimiento corporal y la producción de glóbulos rojos. La tiamina (vitamina B1) ayuda a las células corporales a convertir los carbohidratos en energía (Martín, 2000). Estos dos compuestos son sensibles al calor, la luz y otros factores, ocasionando que los procesos tecnológicos en los granos de cereales puedan llegar a destruirlos parcialmente. Por tanto, muchos productos de cereales industriales son enriquecidos con vitaminas del grupo B para restablecer sus niveles adecuados.

Los alimentos ricos en tiamina incluyen el cerdo, las vísceras, levadura de cerveza, carnes magras, huevos, vegetales de hoja verde, cereales y legumbres. La deficiencia de tiamina puede ser causada por una ingesta inadecuada, aumento en la demanda de la vitamina, problemas de absorción o metabolismo, y el alcoholismo crónico (Pardo, 2004). La falta de esta vitamina en la dieta puede llevar a la aparición de Beriberi, una enfermedad que se manifiesta con síntomas como neuritis, atrofia muscular, falta de coordinación y, en casos graves, parálisis. La muerte generalmente se produce por falla cardíaca (Fernández y col., 2013).

La riboflavina es una vitamina que juega un papel crucial en la oxidación tisular y en la liberación de energía de los alimentos (Pérez Ríos y Ruano, 2004). Se encuentra en alimentos como la leche, carne, pescado, hortalizas verdes y huevos. Es una sustancia cristalina de color amarillo que resulta ser mucho menos soluble en agua y más resistente al calor que la tiamina. La falta de vitamina B2, también conocida como arriboflavinosis, se caracteriza por la presencia de síntomas en la piel, mucosas, ojos y sistema nervioso. Algunos de estos síntomas incluyen lesiones en la piel, úlceras en la comisura de los labios, fotofobia, cataratas, úlceras en la córnea y problemas nerviosos. Es importante destacar que la deficiencia de vitamina B2 suele ser más común en personas que consumen cantidades insuficientes de alimentos ricos en esta vitamina, como los bebedores, fumadores y vegetarianos estrictos. Por lo tanto, es importante asegurarse de incluir fuentes de riboflavina en la dieta diaria para prevenir su carencia y los síntomas asociados (Pérez y Ruano, 2004).

Para contrarrestar las pérdidas durante el procesamiento de los cereales y sus derivados, además de ser una estrategia nutricional, en varios países se han implementado medidas de restauración (añadido de nutrientes perdidos durante el proceso tecnológico), fortificación (añadido de nutrientes no naturalmente presentes en alimentos o presente en cantidades muy pequeñas) o enriquecimientos (mejoramiento del valor nutritivo de un alimento mediante el agregado de nutrientes); según sea el caso, para los cereales y sus derivados (COVENIN, 1997). En Venezuela se dictó una medida para compensar la deficiencia de vitaminas en la población (Chávez, 2020). Así, mediante el Decreto 2.492 del año 1992, se estableció en su Artículo 6 (Gaceta Oficial, 1992), la fórmula presentada por el Instituto Nacional de Nutrición (INN) para enriquecer 1 kg de harina de maíz precocida, convirtiéndose en un requisito obligatorio, con el fin de compensar la carencia de vitaminas en la población y prevenir consecuencias graves en la salud, como retraso en el desarrollo mental y mayor riesgo de infecciones (Scrimshaw, 2005). Es importante resaltar que el Decreto también establece que esta fórmula de enriquecimiento sea ajustada de acuerdo con los criterios de las Normas Venezolanas COVENIN. El perfil de enriquecimiento de la Norma Venezolana COVENIN para harina de maíz precocida (COVENIN, 1996), incluye vitaminas y minerales como vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y hierro, de carácter obligatorio por 100 g: vitamina A 270 ER (900 UI); tiamina 0,31 mg; riboflavina 0,25 mg; niacina 5,1 mg y hierro 5,0 mg, para toda la HMP producida y comercializada en Venezuela. Por tanto, es crucial que en la industria, entes regulatorios y laboratorios

acreditados por la Contraloría Sanitaria realicen evaluaciones de los componentes nutricionales de este alimento para garantizar el cumplimiento de los valores establecidos.

Tanto la vitamina B1 como la B2 pueden ser fácilmente cuantificadas en productos farmacéuticos a través de métodos HPLC-UV. Varios autores, han sugerido a la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) como técnica de separación para detectar y cuantificar la tiamina y riboflavina (Rodríguez y col., 2011; Trinidad, 2020). A pesar de esto, cada método analítico propuesto que utilice equipos distintos debe ser validado para garantizar su desempeño de acuerdo con los requisitos establecidos para este propósito (PAHO, 2008).

Se han propuesto varios métodos analíticos para determinar tiamina y riboflavina, dependiendo de la precisión y sensibilidad requeridas, así como de posibles interferencias en la muestra. En productos farmacéuticos, se pueden cuantificar fácilmente mediante técnicas de HPLC-UV, pero en alimentos se necesitan métodos más específicos debido a las interferencias y diferentes matrices (Lynch, 2000). El análisis espectrofluorométrico es sensible y recomendado para alimentos, ya sea directamente o acoplado a HPLC (AOAC, 2011). Se prefieren columnas C18 en HPLC de fase inversa, pero también se pueden usar columnas de intercambio iónico. El uso de soluciones tampón (buffers) y reactivo de par iónico mejora la resolución de picos y condiciones reproducibles.

Rodríguez y col. (2011), desarrollaron un método para la determinación de tiamina y riboflavina en productos comerciales de cereales complejos utilizando UV-HPLC

Isocrático. Se utilizó una columna C18 con detección UV a 268 nm y reactivos de pares iónicos para la separación de las vitaminas. Se comparó con el método de referencia de la AOAC y se demostró que el método propuesto es menos sensible pero más preciso, con una rápida determinación simultánea de ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica. El método también permite un menor tiempo empleado y un menor uso de reactivos, con un costo inferior. Vizúete (2015) validó una técnica analítica por HPLC para la cuantificación de vitamina B1 en harina de trigo fortificada mediante hidrólisis y oxidación para formar un compuesto fluorescente. Se utilizaron diversas sustancias químicas y condiciones cromatográficas específicas, logrando resultados analíticos satisfactorios y una buena recuperación del micronutriente. Moncada y Ruiz (2000), validaron un método para la determinación simultánea de vitaminas (B1, B2, B3 y B9) en cereales utilizando HPLC con una columna RP-18 y una fase móvil de acetonitrilo y buffer fosfato. Se logró una separación clara de las vitaminas y se utilizó una solución de bicarbonato de sodio para la extracción. El método fue validado y demostró ser reproducible y confiable para la determinación de las vitaminas en estudio.

La validación de un método analítico consiste en confirmar que se llevó a cabo adecuadamente y cumplió con las especificaciones establecidas. Es fundamental para garantizar la calidad de los resultados y su uso en las diferentes industrias, farmacéutica, alimentaria, cosmética, entre otras. La norma ISO 17025 (2005) establece los requisitos para la validación, incluyendo pruebas objetivas y registros detallados. Antes de usar métodos nuevos, se deben realizar las verificaciones

y ajustes necesarios. La validación debe incluir parámetros como (ISO 17025, 2005; ICH, 1994): Selectividad, que es la capacidad del método para identificar de manera clara el analito en presencia de otros componentes; Linealidad, que se refiere a su capacidad de proveer resultados de pruebas que sean proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango específico; Precisión: que es el nivel de concordancia entre los resultados de pruebas individuales al realizar el mismo procedimiento analítico en varias muestras de una misma muestra homogénea; Exactitud: que trata de la discrepancia entre el resultado obtenido y el valor real; Límite de detección (LOD): nivel más bajo de analito que se puede detectar en una muestra en las condiciones dadas, aunque no se pueda determinar exactamente la concentración; Límite de cuantificación (LOQ): nivel más bajo de analito que se puede medir con precisión y exactitud en las condiciones establecidas.

Por lo antes expuesto, en la presente investigación se pretende establecer un protocolo que integre sistemas de extracción y separación compatibles, mediante HPLC con el fin de lograr la sensibilidad, precisión y exactitud necesarias para analizar con éxito las vitaminas B1 y B2 en la harina de maíz precocida, así como en otras harinas de cereales. Esto se logra mediante la obtención de picos de analitos limpios, separados y con una resolución adecuada, todo ello con la utilización de un solo rango de longitud de onda durante la separación simultánea. Por ello, en este estudio se empleó el método de análisis de las vitaminas B1 y B2, tomando como referencia lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 42 NF 37, 2018) para los ensayos de tabletas, optimizando y validando el mismo para aplicar en muestras

de harinas enriquecidas que contienen las vitaminas antes señaladas.

Por ello, se planteó como objetivo validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) para la determinación de vitamina B1 (tiamina) y vitamina B2 (riboflavina) en cereales. Para eso se procedió a 1. Optimizar las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37; 2. Evaluar las separaciones de las vitaminas B1 y B2 utilizando los parámetros de adecuación del sistema; 3. Establecer el tratamiento adecuado de la muestra, para la extracción y cuantificación de las vitaminas en estudio; 4. Diseñar un protocolo de validación para identificar y cuantificar las vitaminas B1 y B2 en la harina de maíz precocida; 5. Validar el método de ensayo desarrollado por HPLC en Fase Reversa para la determinación de tiamina y riboflavina y 6. Aplicar la metodología validada para la identificación y cuantificación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida.

Materiales y Métodos

Las muestras tanto de harina de maíz precocida como de harina de arroz fueron adquiridas en el mercado local. Se utilizó un cromatógrafo HPLC, marca Waters (USA).

Optimización de las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS INICIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Se efectuaron pruebas preliminares teniendo en cuenta las condiciones mencionadas por la USP 42 (2018), Tabla I.

Tabla I.
Condiciones cromatográficas iniciales

Parámetros	Condiciones
Detector	UV
Columna	Symetry® C18 5 µm, 4.6 x 150 mm
Velocidad de flujo	1mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Fase Móvil	Metanol grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (27:1:73) 140 mg de 1-Hexanosulfonato de sodio/100 mL
Temperatura	Ambiente
HPLC	Isocrático
Diluyente	Acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (5:1:94.)

PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Los estándares de vitaminas B1 y B2 se prepararon por separado, para obtener una solución madre de 100 µg/mL de cada uno. Se hicieron tres soluciones de trabajo a partir de la solución madre una con 3 µg/mL para B1, otra con 2 µg/mL para B2 y una mezcla de los estándares bajo estas mismas concentraciones, representando el punto intermedio con una concentración del 100%.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO

Se realizaron modificaciones para optimizar las condiciones del ensayo (Tabla II).

Tabla II.
Modificaciones de los parámetros de ensayo

Parámetros	Modificaciones
Fuerza del solvente	Cambio de metanol por acetonitrilo, manteniendo las mismas proporciones
Composición de la Fase Móvil (FM)	Aumento del 10% en metanol Disminución del 10% en metanol
Cambio de pH	Aumento a pH 3.5 con NaOH 0,1 N Disminución de pH a 2.5 con HCl 0,1 N
Cambio de volumen de inyección	De 10µL a 20 µL
Cambio de flujo	De 1 mL/min a 1.2mL/min

EVALUACIÓN DE LAS SEPARACIONES DE LAS VITAMINAS B1 Y B2 UTILIZANDO LOS PARÁMETROS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se procedió a inyectar los estándares preparados en el equipo, para evaluar cada uno de los parámetros cromatográficos (Número de platos teóricos o eficiencia, asimetría, selectividad, factor de retención).

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA VITAMINA DE ESTUDIO

Se realizaron varios tratamientos a la muestra a fin de evaluar la mejor extracción de las vitaminas en estudio (Tabla III).

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B1 Y VITAMINA B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

El diseño del protocolo de validación se basó en las pautas establecidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1994) y otros documentos relacionados. Se detallaron los procedimientos necesarios para llevar a cabo la validación, junto con los criterios de aceptación para cada prueba realizada.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Se evaluaron los parámetros aptitud del sistema, especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla III.
Protocolo del tratamiento de la muestra

Protocolo	Tratamiento	Reactivo	pH	Enzimas	Incubación	Agitación	Centrifugación
1	Hidrólisis ácida	H ₂ SO ₄ 0,1N	4,5 AcNa 2.5 M	α-Amilasa Amiloglucosidasa 500 mg c/u	18h, 37°C	-	-
2	Hidrólisis ácida	HCl 0,1 N	4,5 AcNa 2.5 M	α-Amilasa Amiloglucosidasa 500 mg c/u	18h, 37°C	-	-
3	Ultrasonido	Solución acuosa	2.5	-	-	1h con magneto en plancha sin calentamiento	3500 rpm Por 10 min

AcNa: Acetato de sodio

APTITUD DEL SISTEMA

Para evaluar la aptitud del sistema se preparó una mezcla de estándares inyectándose 6 veces bajo las condiciones cromatográficas optimizadas. Se determinó el número de platos teóricos (N), factor de cola (T) y el factor de capacidad (k') mediante el programa Breeze®. Criterio de aceptación: desviación estándar relativa menor a 2%, $N > 2000$, $k' 1-20$ y $T < 2$ (ICH, 1994).

ESPECIFICIDAD

Se inyectó la mezcla de estándares punto intermedio (6 veces), fase móvil y muestra, (en ambos casos por triplicado) bajo las condiciones optimizadas. Criterio de aceptación: la especificidad en un procedimiento analítico se logra cuando las fases móviles no interfieren con la lectura de los estándares y la muestra, y las señales cromatográficas coinciden entre los estándares y la muestra (ICH, 1994).

LINEALIDAD

La determinación de la linealidad se realizó usando una mezcla de estándares a 5 niveles de concentración.

Se inyectó en el equipo cromatográfico, siguiendo las condiciones óptimas, de la siguiente forma: se inyectaron cinco veces en cada nivel, excepto en el nivel 3 (100%), que se inyectó seis veces (Tabla IV). Se elaboró una curva de calibración utilizando las áreas de los picos cromatográficos de cada componente (concentración vs área). Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación entre la concentración real de las soluciones estándares y la señal del equipo para cada una de ellas debe ser mayor que 0,990 (Miller y Miller, 2002).

Tabla IV.

Niveles de concentración de los estándares

Estándares	Concentraciones en µg/mL (ppm)				
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Tiamina	1	2	3	4	5
Riboflavina	0.5	1	2	3	4

PRECISIÓN

Precisión del sistema: Se consideró la coincidencia de la señal de la mezcla de estándares dentro de un período de tiempo corto, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas. Para ello se preparó la mezcla de los estándares (100%), obteniéndose una solución con 3 µg/mL de tiamina y 2 µg/mL de riboflavina. Para la precisión del sistema, las soluciones de la mezcla

de estándares fueron analizadas para 6 réplicas en un día. Criterio de aceptación: El valor del porcentaje de desviación estándar relativa debe ser menor a 2,0% (ICH, 1994).

Precisión del método: Se realizaron dos ensayos, llevados a cabo en dos días consecutivos y se determinó el porcentaje de desviación estándar relativa. La solución de la mezcla de estándares al 100%, fue evaluada para 6 réplicas en 2 días consecutivos, al igual que dos muestras de harina de maíz precocida. La precisión se expresó como el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER). Criterio de aceptación: %DER debe ser <2% (Conferencia Internacional de Armonización, ICH, 1994).

EXACTITUD

Se prepararon tres (3) muestras de 10 mL, se le añadió 80%, 100% y 120% de las cantidades de vitamina B1 y B2, según lo declarado por el fabricante en la HMP, bajo los parámetros cromatográficos optimizados. Se inyectó por triplicado cada muestra y la mezcla de los estándares seis (6) veces. Se obtuvo cada uno de los cromatogramas correspondientes y se determinó el porcentaje de recuperación de los analitos para cada caso (Tabla V). Criterio de aceptación: El % R debe estar entre 70 hasta un 120% en alimentos (ICH, 1994).

Tabla V.
Ecuaciones de exactitud

Cantidad recuperada del analito	Porcentaje de recuperación de aditivos
$CR = CMX\% - CMX$ Donde: CR: cantidad recuperada en μg (diferencia entre la muestra con % agregado y la muestra sin % agregado). CMx%: cantidad de muestra con % agregado (μg)	$\%R = \frac{CR}{C_{Real}} \times 100$ Donde: %R: porcentaje de recuperación CReal: cantidad real (μg) inyectada de muestra con % agregado.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se prepararon tres mezclas de estándares con concentraciones conocidas (por debajo del nivel 1 de concentración) (Tabla VI).

Tabla VI.
Concentración de los estándares

Estándares	Concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ (ppm)		
	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Tiamina	0.25	0.5	0.75
Riboflavina	0.2	0.3	0.4

Se inyectó por triplicado cada una de las mezclas, bajo las condiciones óptimas y se determinaron ambos límites de manera estadística usando la ecuación de Miller y col. (2010) para Límite de detección (LOD): $LOD = 3,3 \times DE/m$ para el Límite de Cuantificación (LOQ): $LOQ = 10 \times DE/m$, donde DE es la desviación estándar de la respuesta y m la pendiente de la curva de calibración.

METODOLOGÍA VALIDADA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Una vez validada la metodología, se aplicó no solo a la muestra de HMP, sino también a una harina de arroz para uso infantil (6 meses a 1 año), enriquecida con tiamina y riboflavina. Se prepararon dos muestras pesando exactamente alrededor de 7,5 g, se le añadió 15 mL de agua grado HPLC para mezclar, y luego se llevó a un volumen de 25 mL. A la muestra 2 se le ajustó el pH a 2,5 con HCl 0,1 N. Se sonicó por 10 minutos y posteriormente se filtró a través de un papel de filtro Whatman No. 42. A continuación se filtró a través de un acrodisc de 0,45 μm antes de inyectar en el equipo HPLC.

Resultados y Discusión

Optimización de las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37

VERIFICACIÓN DE LOS MÓDULOS QUE CONFORMAN EL EQUIPO HPLC

Antes de las pruebas, se verificaron los módulos del equipo HPLC y se comprobó que funcionaban correctamente. Se utilizaron los módulos acoplados al Software Breeze® y se demostró la eficiencia de las bombas y el buen funcionamiento de los módulos según las especificaciones del proveedor Waters (2002). También, se determinó la eficiencia de la columna Symetry C18 para el análisis de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Una vez inyectados los estándares de acuerdo con las condiciones iniciales, se obtuvo que el tiempo de retención (RT) para la riboflavina fue 6,935 minutos y 13,431 minutos para la tiamina, por lo que se continuó optimizando los parámetros para lograr la separación en un tiempo menor a 10 minutos (Figura 1).

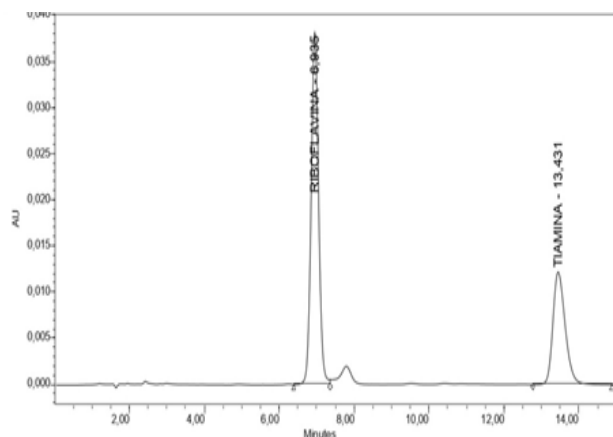


Figura 1. Cromatograma de la mezcla de estándares con las condiciones iniciales

Al modificar la fuerza del solvente sustituyendo metanol por acetonitrilo, no fue posible separar ambos picos, por lo que se regresó a la FM con metanol. Luego se procedió al cambio en la composición de la fase orgánica (10% más y 10% menos de MeOH), disminución del pH, aumento del volumen de inyección y aumento del flujo. En la Tabla VII se muestran los resultados óptimos en los parámetros de adecuación.

Tabla VII.
Condiciones optimizadas para el método de ensayo

Parámetros	Condiciones
Detector	UV
Columna	Symetry® C18 5 µm, 4.6 x 150 mm
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Fase Móvil	10% más de metanol grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (29,4:1:69,60) más 140 mg de 1-Hexanosulfonato de sodio/100 mL pH= 2.5
Temperatura	Ambiente
HPLC	Isocrático
Diluyente	Acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (5:1:94)

EVALUACIÓN DE LAS SEPARACIONES DE LAS VITAMINAS B1 Y B2 UTILIZANDO LOS PARÁMETROS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Una vez optimizado el método de ensayo, se inyectó la mezcla de estándares para evaluar la separación de los estándares (Figura 2).

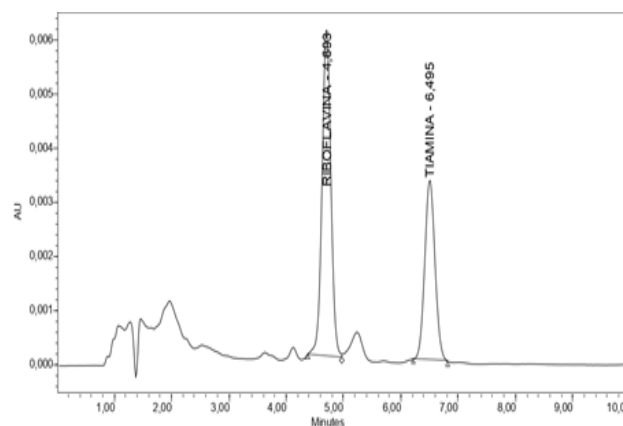


Figura 2. Cromatograma de la mezcla de estándares con las condiciones óptimas

Estas condiciones generaron resultados conformes en la separación de los estándares con valores para RT, N, T y k' adecuados (Tabla VIII).

Tabla VIII.

Resultados al optimizar el método

Analito	RT	% Área	N	K'	T
Riboflavina	4,693	61,10	4508,478	3,692764	0,9980968
Tiamina	6,495	38,90	6169,593	5,494835	1,067066

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA, PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS EN ESTUDIO

La hidrólisis con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, respectivamente, acompañados con enzimas, no resultaron adecuados, lo que se reflejó en los resultados de las áreas obtenidas al inyectar las muestras con esos tratamientos. Quizás la naturaleza de la muestra, al ser una HMP, en la que se encuentra el almidón pregelatinizado, además del uso de temperatura para la actuación de las enzimas, impidieron la liberación de los analitos de vitaminas B1 y B2 presentes en la muestra. Mientras que el tratamiento de la muestra, empleando agitación, ultrasonido, filtración y centrifugación, arrojó los mejores resultados.

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR LAS VITAMINAS B1 Y B2 EN LA HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Una vez optimizados cada uno de los parámetros que garantizan un menor tiempo de ensayo con las mejores condiciones, se aplicó el diseño de protocolo de validación del método a través de las pautas establecidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1994).

Validación del método de análisis para la determinación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida

APTITUD DEL SISTEMA

Una vez realizadas las seis inyecciones consecutivas de la mezcla de patrones (3 ppm de vitamina B1 y 2 ppm de vitamina B2), según las condiciones óptimas reflejadas en la Tabla VIII, se calcularon los promedios, desviaciones estándar y desviaciones estándar relativas de cada parámetro (tiempos de retención y áreas) (Tabla IX).

Tabla IX.

Aptitud del sistema para el tiempo de retención y área, bajo las condiciones óptimas establecidas

Parámetros	Riboflavina		Tiamina	
	Área	RT (min)	Área	RT (min)
Promedio	64401,83	4,67	41453,00	6,47
DESV STD	527,48	0,0019	89,31	0,017
% DER	0,82	0,41	0,22	0,26

Esto indica que el método cromatográfico utilizado genera resultados consistentes y fiables, con desviaciones estándar relativas que son menores al 2%.

En resumen, los valores obtenidos para los platos teóricos y el factor de capacidad en la cromatografía de riboflavina y tiamina cumplen con los estándares aceptables según la bibliografía. Además, los picos cromatográficos presentan una simetría adecuada y no tienen colas pronunciadas, lo que indica un método válido para la determinación de estos analitos (Tabla X).

ESPECIFICIDAD

Al estudiar los cromatogramas generados al inyectar la fase móvil, se pudo verificar

Tabla X.

Aptitud del sistema para los parámetros RT (tiempo de retención), N (número de platos teóricos), k' (factor de capacidad), T (factor de cola) y Rs (resolución), bajo las condiciones óptima

Compuesto	RT (min)	N	k'	T	Rs
Riboflavina	4,69	4.508,48	3,69	1,00	5,80
Tiamina	6,50	6.169,59	5,49	1,07	5,96

que no hubo interferencias que afectaran los picos de la mezcla de estándares, lo que confirma que el método utilizado para la determinación de vitaminas B1 y B2 no es influenciado por los componentes de las fases móviles.

Al inyectar la mezcla de los estándares (6 réplicas) y la muestra (3 réplicas) bajo las condiciones óptimas, se generaron cromatogramas que facilitaron la comparación de los tiempos de retención de cada pico cromatográfico relacionado con cada compuesto. Los resultados, revelaron una coincidencia en las señales cromatográficas de los estándares y la muestra (Tabla XI).

Tabla XI.

Tiempos de retención de los estándares y de la muestra de harina de maíz precocida inyectada

Compuestos	Promedio RT (min)	
	Mezcla de estándares	Muestra de harina de maíz precocida
Riboflavina	4,693±0,18	4,678±0,16
Tiamina	6,495±0,16	6,415±0,11

Además, se logró una buena separación de los dos compuestos en menos de 10 minutos a una longitud de onda de 280 nm, obteniendo picos estrechos y simétricos con una resolución óptima. Los resultados demostraron una selectividad satisfactoria en el sistema de HPLC, basados en la identificación de los picos de las vitaminas analizadas.

LINEALIDAD

Se construyó una curva de calibración utilizando la señal cromatográfica de los compuestos analizados en diferentes niveles de concentración en partes por millón (ppm), como se muestra en la Tabla IV. Los niveles de concentración de los estándares abarcan desde 1 a 5 ppm para la tiamina y de 0,5 a 4 ppm para la riboflavina. Se realizaron múltiples inyecciones de cada nivel de concentración de la mezcla de solución estándar, siguiendo las condiciones optimizadas.

La calibración estándar externa demostró ser efectiva para aplicaciones cuantitativas, con resultados lineales en un rango de concentraciones y coeficientes de determinación (R^2) dentro de los límites aceptables ($> 0,990$) (Figuras 3 y 4).

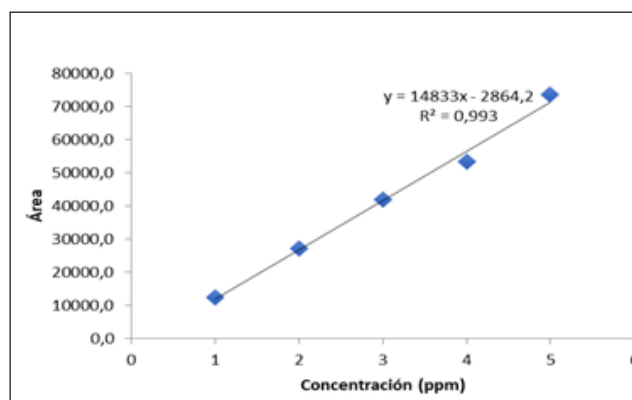


Figura 3. Curva de calibración para linealidad de la tiamina (Concentración vs. Área)

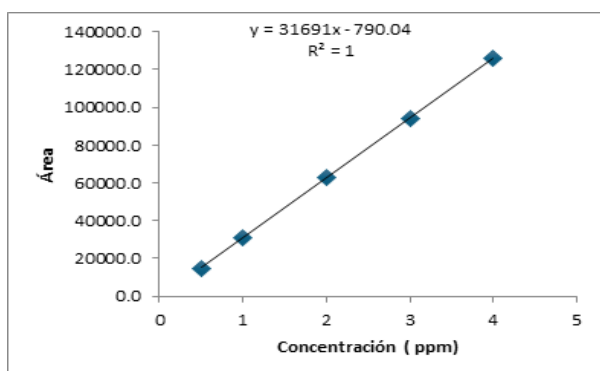


Figura 4. Curva de calibración para linealidad de la riboflavina (Concentración vs. Área)

PRECISIÓN

Se evaluó la precisión del método analítico a través de la reproducción de resultados en un mismo día (precisión del sistema) y en días diferentes (precisión del método). Se realizaron seis réplicas en un día utilizando soluciones de mezcla de estándares y se obtuvieron los promedios de las áreas en las inyecciones.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La desviación estándar relativa (DER) obtenida de las inyecciones realizadas es inferior al 2%, lo que demuestra que cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de repetibilidad establecido. Estos resultados confirman la precisión, donde el área para la Riboflavina fue de $67892,5 \pm 78,1$ (% DER: 0,12) y para la Tiamina fue de $41896 \pm 511,22$ (% DER: 1,22).

En el cromatograma correspondiente se pueden observar la Precisión del Sistema (Figura 5), con concentraciones de tiamina 3 ppm y riboflavina de 2 ppm, bajo las condiciones optimizadas.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se evaluó la precisión interdiaria del método mediante pruebas realizadas en diferentes días, el mismo analista y con el mismo equipo. Se realizaron determinaciones en dos días consecutivos utilizando soluciones estándar con 6 réplicas cada una, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas.

Se puede observar en la Tabla XII como todas las desviaciones estándar relativas se encuentran por debajo del 2%, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Los resultados de la precisión del método para la muestra de harina de maíz precocida, bajo condiciones optimizadas, arrojaron para la tiamina una desviación estándar relativa de 0,40% y para la riboflavina 0,53%, lo que indica que las inyecciones realizadas (estándares y muestra), cumplen con el criterio de aceptación para la repetibilidad, menor al 2% de desviación estándar relativa, demostrando que el método es preciso. Donde el área para la Riboflavina fue de $60158,5 \pm 329$ (% DER: 0,53) y para la Tiamina fue de 30765 ± 138 (% DER: 0,40).

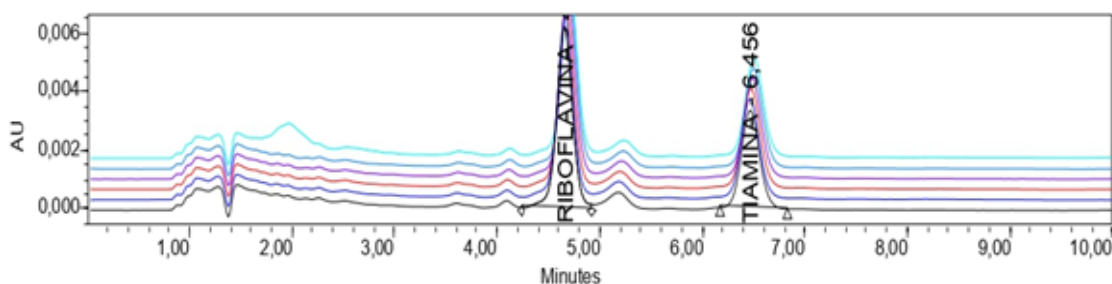


Figura 5. Cromatograma de las 6 inyecciones de la mezcla de estándares en el punto medio (100%), tiamina 3 ppm y riboflavina 2 ppm, para el ensayo de la Precisión del Sistema

Tabla XII.
Precisión del método para los estándares de tiamina y riboflavina

Inyección punto intermedio	Área			
	Riboflavina		Tiamina	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Promedio	62792	67892,5	37395,67	41896
DESV STD	291,1	78,71	108,83	511,22
% DER	0,46	0,12	0,29	1,22

EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran en el rango de aceptación establecido (70-120%), siendo el valor más bajo (81,42%) para la riboflavina en la muestra con un agregado del 100%, y el más alto (115,02%) para tiamina, con valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, resultando entre 0,43 y 1,57 %, lo que indica que el método es exacto para los analitos evaluados (Tabla XIII).

LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Se determinó la sensibilidad del método para detectar y cuantificar los analitos utilizando los datos de concentración y áreas obtenidos al inyectar las tres mezclas de estándares a concentraciones conocidas (Tabla VIII), siguiendo las condiciones óptimas establecidas.

Los resultados obtenidos, aplicando la Ecuación de Miller, para Riboflavina fue $y=32500x-1070$ y para Tiamina fue $y=14900x-1620$, esto indica que la LOD para riboflavina y la tiamina se detectan a 0,16 ppm y 0,19 ppm, sin necesariamente ser cuantificados. La mínima concentración en que se pueden cuantificar los analitos en estudio (LOQ) es 0,48 ppm para la riboflavina y 0,56 ppm para la tiamina. El valor de R2 para la Riboflavina fue 0,9931 y la Tiamina de 0,9915.

Aplicación de la metodología validada para la identificación y cuantificación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida y harina de arroz

En la Figura 6, se muestra el cromatograma de los resultados obtenidos de las vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida.

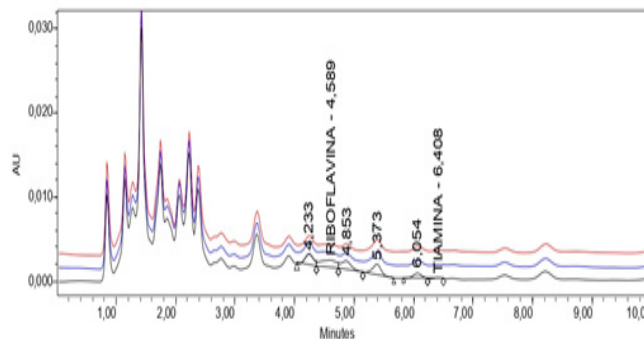


Figura 6. Cromatograma de la identificación y cuantificación de las vitaminas B2 y B1 en harina de maíz precocida

Tabla XIII.
Exactitud del método para las vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida, bajo las condiciones optimizadas

Parámetros	Tiamina			Riboflavina		
	80%	100%	120%	80%	100%	120%
% Recuperación	115,02	105,48	103,93	90,96	81,42	102,27
DESV STD	1,44	1,54	0,48	0,39	0,40	1,61
% DER	1,26	1,46	0,47	0,43	0,49	1,57

Con respecto a la harina de maíz precocida, se encontró en la muestra tratada valores para las vitaminas B1 y B2, similares a lo que declara el fabricante (Tabla XIV).

Tabla XIV.

Comparación de los valores de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida

Vitaminas	Declarado por el fabricante	Encontrado en el ensayo
Riboflavina	0,24 mg/100 g de producto	0,222 mg/100g de producto
Tiamina	0,31 mg/100 g de producto	0,316 mg/ 100 g de producto

En el caso de la harina de arroz, se encontró en la muestra tratada valores para las vitaminas B1 y B2 muy cercanos al reportado por el fabricante (Figura 7 y Tabla XV).

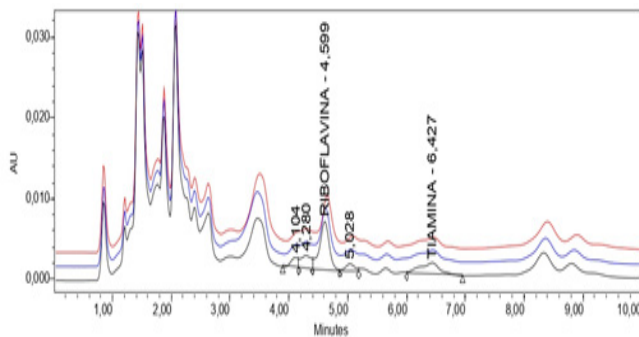


Figura 7. Cromatograma de la identificación y cuantificación de las vitaminas B2 y B1 en harina de arroz

Tabla XV.

Comparación de los valores de vitaminas B1 y B2 en Harina de arroz

Vitaminas	Declarado por el fabricante	Encontrado en el ensayo
Riboflavina	0,14mg/30 g de producto	0,12 mg/30 g de producto
Tiamina	0,3 mg/30 g de producto	0,2 mg/ 30g de producto

Los valores declarados por el fabricante se basaron en los requerimientos diarios establecidos por el Instituto Nacional de Nutrición para niños de 6 a 11 meses de edad.

Conclusiones

- Se desarrolló y optimizó un método para la separación, identificación y cuantificación simultánea de vitaminas B1 y B2, tomando como punto de partida el método establecido por la USP, cambiando la composición de la Fase Móvil, aumentando el 10% de la concentración de metanol, disminuyendo el pH a 2.5, incrementando el volumen de inyección a 20 uL y modificando el flujo a 1,2 mL/min.
- El método propuesto proporciona una linealidad y precisión comparables al método de referencia establecido por la USP.
- El método propuesto tiene la ventaja de determinar rápida y simultáneamente ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica, a una misma longitud de onda, siendo menor el tiempo consumido en el ensayo.
- Se demostró que el método HPLC desarrollado puede ser aplicado para el análisis de productos derivados de cereales enriquecidos.
- Se determinó que la muestra de harina de maíz precocida tiene un contenido de vitaminas B1 y B2 similar al declarado por el fabricante.
- En general, las vitaminas analizadas revelaron valores de número de platos teóricos (N), factor de cola (T) y factor de capacidad (K') dentro de los criterios de aceptación establecidos para la aptitud del sistema.
- Se diseñó un protocolo de validación, de acuerdo con la ICH 1994, para

la identificación y cuantificación de tiamina y riboflavina, logrando tener las instrucciones detalladas de las operaciones, orden en la ejecución del trabajo y los criterios de aceptación.

- La evaluación de la linealidad demostró que hubo un coeficiente de correlación para cada analito mayor a 0,990.
- El método cromatográfico desarrollado es preciso, al presentar Desviaciones estándar relativas menores al 2% para la precisión del sistema (áreas) en un día y para la precisión del método (áreas) en días consecutivos.

Recomendaciones

- Evaluar otros métodos de extracción para las vitaminas B1 y B2 en muestras de harina de maíz y arroz.
- Aplicar el método de ensayo en otras muestras de harina de maíz precocida, para comprobar el contenido de vitaminas B1 y B2.
- Estudiar otras vitaminas del complejo B, que pudieran estar presentes en harinas de cereales

Referencias Bibliográficas

AOAC. 2011. In: Horwitz W, Latimer Jr. G. (Eds.), Official methods of analysis of AOAC international, 18th ed, Revision 4. AOAC, Gaithersburg.

BNF (Fundación Británica de Nutrición). 1994. Alimentos ricos en almidón en la dieta. BNF, Londres.

Chávez JF. 2020. El enriquecimiento de la harina de maíz precocida y de la harina de trigo en Venezuela. Una gestión con éxito. Org.ve. Available from: <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2020/1/art-9/>

FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura). 2002. Agricultura mundial:Hacia 2015/2030. Informe resumido. FAO, Roma.

Fernández Falcó L, González G, Creagh Banderas I, Betancourt Y, Savón A. 2013. Algunas consideraciones acerca de la tiamina o vitamina B1. Revista Información Científica 81(5).

Gaceta Oficial de la República de Venezuela. No 35.032. 1992. Decreto No 2.492. Creación de la Comisión para el Enriquecimiento Nutricional de Alimentos.

ICH. 1994. Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 1994.

INN (Instituto Nacional de Nutrición). Tabla de Composición de Alimentos para Uso Práctico. Revisión 1999. Primera reimpresión Enero 2001. Publicación No 54. Serie Cuadernos Azules. Venezuela.

ISO 17025:2005. Norma internacional ISO 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Suiza.

Lynch PLM, Young IS, 2000. Determinación de tiamina mediante cromatografía líquida de alta resolución. Revista de Cromatografía A 881 (1e2), 267e284.

Martín MI, del Portal JI, del Portal JCI. 2000. Vitaminas y minerales. Editorial Complutense.

McKevith B. 2004. Nutritional aspects of cereals. Nutr Bull 29(2):111-42.

Miller J, Miller J. 2002. Método de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En: Estadística quimiometría para química analítica. España: Prentice Hall115-116.

Miller JR, Outlaw RA, HollowayBC. 2010. Graphene Double-Layer Capacitor with ac Line-Filtering Performance. Science 329:1637-1639.

Moncada J, Ruiz LM. 2000. Estandarización y validación de un método para la determinación simultánea de vitaminas tiamina B1, riboflavina b2, niacina b6 y ácido fólico B9, utilizando HPLC. Revista Colombiana De Química 29(1):73-77.

Norma Venezolana COVENIN 2135:1996. Harina de maíz precocida. (3^{era}. Revisión).

Norma Venezolana COVENIN 2552-1:1997. Directrices para la declaración de propiedades nutricionales y de salud en el rotulado de los alimentos envasados.

PAHO (Organización Panamericana de la Salud). 2008. La Armonización RPP, la Reglamentación Farmacéutica de buenas prácticas para

- laboratorios nacionales de control farmacéutico. Paho.org. Available from: https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_36_Anexo_3.pdf
- Pardo Arquero VP. 2004. La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físico-deportiva. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* 4 (16): 233-242.
- Pérez Ríos M, Ruano A. 2004. Vitaminas y salud. *Offarm* 23(8):96-106.
- Rodríguez R, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Sánchez-Mata MC. 2011. Determinación simultánea de vitamina B1 y B2 en alimentos complejos a base de cereales, mediante HPLC-UV isocrática de fase inversa. *Revista de Ciencia de los Cereales* 55(2012): 293e299
- Scrimshaw NS. 2005. La Fortificación de Alimentos: Una Estrategia Nutricional Indispensable. *An Venez Nutr* 18(1):64-8.
- Trinidad F. 2020. Validación de un método cromatográfico para determinar tiamina y riboflavina, en harina de trigo fortificada. Available from: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/25301/TM-1994.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- USP 42 NF 37. 2018. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional.
- Vizuet Pambabay SD. 2015. Validación de la técnica de cuantificación de vitamina B1 por el método de HPLC en harina de trigo fortificada. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6421>
- Zambrano S, Sosa S. 2018. Evolución de consumo de alimentos Edu.ve. Available from: <https://www.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/2019/05/IIESUCAB-Zambrano-Sosa-Informe-Consumo-Alimentos-08-2018.pdf>