

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS PREVIA LA OBTENCION DEL TITULO DE  
DOCTORA EN QUIMICA Y FARMACIA

TEMA:

ÍESTUDIO DE UN PROCESO DE CONTROL  
ANALITICO CUANTITATIVO PARA LA  
DETERMINACION DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES  
(TIAMINA, NIACINA, ACIDO FOLICO, RIBOFLAVINA)  
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA  
EFICIENCIA (HPLC) EN HARINAS DE TRIGO  
FORTIFICADASÍ

AUTOR: Q.F. MARIA EUGENIA CALLES PROCEL

TUTOR: DR. CARLOS SILVA HUILCAPI

GUAYAQUIL . ECUADOR

2004

En mi calidad de Director de Tesis, certifico que este trabajo ha sido elaborado por la Q.F. María Eugenia Calles Procel, y luego de ser revisado, autorizo su presentación.

.....

DR. CARLOS SILVA HUILCAPI

Director de Tesis

Dejo constancia, que la responsabilidad por los hechos, ideas, investigación, resultados, análisis resueltos, conclusiones y recomendaciones expuestas en esta tesis, corresponden exclusivamente a su autora.

Q.F. María Eugenia Calles Procel

## DEDICATORIA

A mi esposo Sócrates. A mis hijos, Alejandra y Emilio. Motivo de mi empeño y superación.

## AGRADECIMIENTO

A las autoridades del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez+ (Laboratorio de Bromatología del Dpto. de Registro y Control Sanitario de Alimentos Procesados), por permitirme llevar a cabo esta investigación. A mi querida Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil. Al director de tesis Dr. Carlos Silva Huilcapi, por su valiosa colaboración.

## RESUMEN

En el presente trabajo se resumen en forma general aspectos teóricos y prácticos de la Cromatografía Líquida de alta resolución o alta eficiencia (HPLC), al mismo tiempo que se detalla la aplicación de esta novedosa herramienta en el desarrollo de un proceso analítico que nos permite determinar cuantitativamente las vitaminas hidrosolubles (Tiamina, Nicotinamida, Ácido Fólico, Riboflavina) incorporadas a las harinas de trigo para su fortificación.

Durante el desarrollo de esta investigación se realizaron siete procesos de prueba, en cada uno de ellos la muestra fue tratada de varias maneras hasta poder llegar a obtener una adecuada extracción de las vitaminas, también se operó en condiciones diferentes hasta lograr buenos cromatogramas de las vitaminas, las cuales deben eluir en tiempos diversos, que faciliten la identificación al comparar los tiempos de retención de las vitaminas presentes en las muestras con los tiempos de retención de las vitaminas estándares.

De los siete procesos mencionados, el que más se ajusta a los resultados requeridos es el proceso # 7; el cual es un proceso en *Fase Reversa*, que emplea un sistema de solvente isocrático (de concentración constante) que representa a la *Fase móvil* que fluye a través del sistema cromatográfico sin variar las proporciones de sus componentes (constituida por una mezcla de Acetonitrilo y un Buffer de pH ácido), significativamente más polar que la *Fase estacionaria* (Columna C18).

El sistema de solvente empleado y la columna son particularmente elegidas para obtener una buena resolución con tiempos de retención convenientes. Se requiere de alta solubilidad tanto para el proceso cromatográfico como para asegurar que el soluto (vitaminas) no precipite en la cabeza de la columna después de ser inyectado.

Los tiempos aproximados de elución, son los tiempos de retención (R.T), los mismos que son diferentes para cada una de las vitaminas.

Las cantidades que se determinan pueden ser en concentraciones muy bajas como por ejemplo 0.1 ppm.

El desarrollo del proceso se llevó a cabo no solo en muestras de Harinas de Trigo Fortificadas; sino además en las Premezclas Vitamínicas que se emplean para la fortificación de las mismas.

Los resultados obtenidos con el empleo de este proceso son muy satisfactorios, tanto para Harinas como para Premezclas vitamínicas, por lo que constituye un proceso de fácil aplicación para ambos tipos de muestras.

Aunque el uso de un Cromatógrafo Líquido como herramienta de análisis podría tener un costo muy elevado, es reconfortante saber que con un solo proceso y en corto tiempo, se pueden determinar 4 vitaminas en muestras tan complicadas por su naturaleza como lo son las harinas de trigo fortificadas.

## SUMMARY

Presently work you summary in form general theoretical and practical aspects of the Liquid Chromatography of high resolution or high efficiency (HPLC), at the same time that the application of this novel tool is detailed in the development of an analytic process that allows us to determine the vitamins hydrosolubles quantitatively (Tiamina, Nicotinamida, Folic Acid, Riboflavina) incorporate to the wheat flours for its fortification.

During the development of the investigation they were carried out seven test processes, in each one of them the sample was been in several ways until being able to end up obtaining an appropriate extraction of the vitamins, if was also operated under different conditions until achieving good cromatogramas of the vitamins, which owe eluir in diverse times that facilitate the identification when comparing the times of retention of the present vitamins in the samples with the

Of the seven mentioned processes, the one that more it is adjusted to the required results it is the process # 7; which is a process in Reverse Phase that uses a system of solvent isocrático (constant concentration) that represents to the mobile Phase that flows through the system cromatografico without varyng the proportions of their components (constituted by a mixture of Acetonitrilo and a Buffer of sour pH), significantly more polar that the stationary Phase (Column C18).

Solvent employee's system and the column are particulary elected to obtain a good resolution with convenient times of retention. If is required so much of high solubility for the process cromatografico like to assure that the soluto (vitamins) it doesn't precipitate in the head of the column after being injected.

The aproximate times of elucion, are the times of retention (R,T), the same ones that are dfferent for each one of the vitamins.



The quantities that are determined can be in very low concentrations as for example 0.1 ppm.

The development of the process was carried out not only in samples of Fortified Flours of Wheat; but also in the Premezclas Vitminicas that are used for the fortification of the same ones.

The results obtained with the employment of this process are very satisfactory, so much so for Flours as for premezclas vitaminicas, for what constitutes a process of easy application for both types of samples.

Although the use of a Liquid Chromatograph as an analysis tool could have a very high cost, it is reassuring to know that with a single process and in a short time, 4 vitamins can be determined in samples so complicated by their nature as they are in the fortified wheat flours.

# INDICE

	<b>Página</b>
INTRODUCCIÓN	
<b>CAPITULO I</b>	
MARCO TEORICO	1
1.1 Bases de la Cromatografía Líquida	1
1.1.1 Definición de Cromatografía	1
1.1.2 Aplicaciones	2
1.1.3 Sistema típico de un cromatógrafo líquido	2
1.1.4 Generalidades del sistema de operación	4
1.1.5 Sistemas de gradientes	9
1.1.6 Ventajas y desventajas de un HPLC	11
1.1.7 Tipos de cromatografía líquida	12
Cromatografía líquido . líquido	12
Cromatografía líquido . sólido	12
Cromatografía de fase ligada	13
Fase normal	
Fase reversa	
Cromatografía de exclusión por tamaño	14
Cromatografía de intercambio iónico	14
1.1.8 Materiales de empaque y columnas	14
1.1.9 Solventes	18
1.2 Vitaminas	20
1.2.1 Definición	20
1.2.2 Vitaminas hidrosolubles	20
1.2.2.1 Vitamina B <sub>1</sub>	21
1.2.2.1.1 Estabilidad	21
1.2.2.2 Vitamina B <sub>2</sub>	21
1.2.2.2.1 Estabilidad	22
1.2.2.3 Vitamina B <sub>3</sub>	22
1.2.2.3.1 Estabilidad	23
1.2.2.4 Vitamina B <sub>9</sub>	23
1.2.2.4.1 Estabilidad	23

1.3 Alimentos fortificados	24
1.3.1 Contenido de micronutrientes en trigo y harina de trigo	24
1.3.2 Legislación	24
1.3.3 Costos y tecnología	26
<b>CAPITULO II</b>	
2.1 Definición del problema	28
2.2 Hipótesis	28
2.3 Objetivos	28
2.3.1 Objetivo general	28
2.3.2 Objetivos específicos	28
2.4 Variables	29
2.4.1 Definición de variables	29
2.4.1.1 Variables cualitativas	29
2.4.1.2 Variables cuantitativas	29
<b>CAPITULO III</b>	
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	30
3.1 Método	
3.2 Universo	30
3.3 Muestra	30
3.4 Desarrollo del proceso	30
3.4.1 Proceso #1	31
3.4.2 Proceso #2	31
3.4.3 Proceso #3	32
3.4.4 Proceso #4	32
3.4.5 Proceso #5	33
3.4.6 Proceso # 6	34
3.4.7 Proceso # 7	35
3.5 Descripción del proceso #7	35
3.5.1 Fundamento	35
3.5.2 Instrumentos	36
3.5.3 Materiales	36
3.5.4 Reactivos	37
3.5.5 Preparación de la fase móvil	37

3.5.6 Preparación de la solución estándar	38
3.5.6.1 Dilución final de solución estándar	39
3.5.7 Preparación de la solución muestra	39
3.5.7.1 Preparación de la solución muestra de harina de trigo fortificada	39
3.5.7.2 Preparación de solución muestra de premezcla vitamínica	40
3.5.8 Condiciones de operación	40
3.5.9 Diagrama de flujo del proceso # 7	41
3.6 Cálculos	43
3.6.1 Concentración de cada vitamina en la solución estándar final.	43
3.6.2 Concentración teórica de cada vitamina en la solución muestra.	43
3.6.3 Contenido experimental de vitaminas en la solución muestra.	44
3.7 Ejemplo Ilustrativo	45
3.7.1 Cromatograma de una solución estándar de vitaminas	45
3.7.2 Cromatograma de una solución muestra de harina de trigo fortificada	46
3.7.3 Áreas de los picos de un cromatograma	47
3.7.4 Concentración de cada vitamina en la solución estándar	47
3.7.5 Concentración teórica de cada vitamina en la solución muestra.	49
3.7.6 Contenido experimental de vitaminas en la solución muestra.	50

## **CAPITULO IV**

RESULTADOS E INTERPRETACION	51
Proceso #1	51
Proceso #2	52
Proceso #3	52
Proceso #4	53

Proceso #5	53
Proceso #6	56
Proceso #7	57
TABLA DE RESULTADOS	64
<b>CAPITULO V</b>	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
5.1 Conclusiones	69
5.2 Recomendaciones	71
<b>ANEXOS</b>	73
Nomenclatura básica aplicada a la cromatografía líquida	73
Términos estadísticos empleados	74
Fotografías	75
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	78

## INTRODUCCION

Por tener amplia distribución geográfica a más de otros factores como: aceptación, estabilidad y versatilidad, La harina de trigo es un alimento apropiado para suministrar micronutrientes a la humanidad. En su estado natural, el trigo es una buena fuente de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, Nicotinamida, B<sub>6</sub>, E, hierro y zinc, cuando están en estado natural.

Sin embargo, debido a que la mayoría de estos nutrientes se concentran en las capas externas del grano, se pierde una proporción significativa durante el proceso de molienda.

Las cantidades de vitamina B<sub>1</sub>, niacina y hierro que se agregan a la harina de trigo son generalmente equivalentes a las cantidades que se pierde por la molienda. Es decir, que al restituir los micronutrientes, se está enriqueciendo la harina.

En otros casos se debe agregar una cantidad superior a la perdida durante la molienda, por lo que la harina es *fortificada*. Para esto se debe incorporar una premezcla de micronutrientes, asegurando que esta mezcla tenga una concentración adecuada y una distribución uniforme.

A nivel mundial va en aumento la fortificación obligatoria de la harina de trigo; existiendo legislaciones y reglamentaciones en más de 14 países que determinan esta fortificación con varios micronutrientes.

Es en nuestro país, es el INEN quien reglamenta la fortificación, para lo cual se creó la Norma Técnica 616 vigente desde el año 1997:

Requisito equivalente en mg/kg (valores mínimos)

Mononitrato de Tiamina	4,0
Riboflavina	7,0
Nicotinamida	40,0
Ácido Fólico	0,6
Hierro reducido	55,0

La normativa fue creada a razón del Acuerdo Ejecutivo No. 1008 con fecha 10 de Agosto de 1996, en donde se expide el Reglamento de Fortificación y Enriquecimiento de las Harinas de Trigo en Ecuador, para la prevención de las Anemias Nutricionales, y la cantidad mínima de estos micronutrientes contemplada en el Decreto Ejecutivo se encuentra en la Premezcla vitamínica, la cual debe ser considerada por los fabricantes o molineras en general.

La determinación de micronutrientes en la harina resulta engorrosa si se siguen los métodos clásicos (Ej.: Fluorometría para determinación de las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>; determinación Microbiológica para el Ácido Fólico y el Método Colorimétrico para la Nicotinamida).

Es por este motivo que durante el desempeño de mis funciones me vi en la necesidad de desarrollar un proceso que cuantifique las vitaminas añadidas a las harinas de trigo mediante el empleo de un solo instrumento de trabajo como es el HPLC o cromatógrafo líquido, lo cual será de gran ayuda para el control respectivo, verificando si las Industrias Molineras cumplen con la disposición gubernamental y la respectiva norma INEN 616, y así colaborar con la población ecuatoriana consumidora en su dieta diaria de una gran variedad de subproductos de harina de trigo como lo son el pan y el fideo principalmente.

Para el estudio de este proceso analítico cuantitativo, será fundamental conocer varios aspectos relacionados con la instrumentación que se va a utilizar y con las características de la muestra.

No es misión de este trabajo llegar a la validación del proceso, que evidentemente sigue al desarrollo del mismo; pero de seguro que con la experiencia ya adquirida

y la investigación realizada, será posible hacerlo. Mas bien el tema de la validación se lo dejará como objeto de otro estudio para lo cual se deben considerar otros aspectos como son la selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, sensibilidad, linealidad, robustez; lo que implica un financiamiento extra, tanto en recursos económicos como en el tiempo que se requiere para su desarrollo.