

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN LECHE POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

SANDRA CAROLINA CAVANZO DÍAZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2010

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN LECHE POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

SANDRA CAROLINA CAVANZO DÍAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar el título de Química**

Directores:

ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2010

DEDICATORIA

A Dios porque me dio la vida y la fuerza necesaria para no desfallecer en los momentos difíciles.

A mis padres, Saúl y Emilce, por la formación que me han dado

A mis hermanos, Zuly y Cristian, por su cariño y admiración

A mi gran amor, Fredy, por su apoyo incondicional

A mi hija Mariana, por ser la luz que alumbra mi camino

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores, Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez, por la maravillosa oportunidad que me ofrecieron y porque a pesar de las dificultades siempre confiaron en mí.

A mis abuelos, Lucrecia, Vidal y Myriam, ejemplos de vida, quienes con su sabiduría y consejos lograron convertirme en la persona que soy.

A mis padres, que amo profundamente y quienes con su esfuerzo y dedicación constante han logrado brindarme todas las herramientas necesarias para alcanzar mis sueños. Por sus enseñanzas, su amor infinito y por haber confiado ciegamente en mí.

A mis hermanos, Zuly y Cristian, quienes fueron una de mis motivaciones más grandes para culminar este proyecto.

A Fredy, por su amor, su entrega desinteresada y su compañía incondicional en una de las etapas más importantes de mi vida.

A mi hija Mariana, a quien amo y adoro con toda mi alma y que inesperadamente llegó a mi vida para llenarla de felicidad y alegría.

A Mónica Cala por su paciencia y porque todo lo que sé de HPLC en gran parte lo aprendí de ella.

A mis amigos, Luisa, Angelita, Silvia, Sandra, Edgar, Carlos Mario por todas las bellas experiencias vividas.

A William y Deyanira, por todos sus invaluable aportes y por estar siempre dispuestos a compartir sus conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio de cromatografía y Cenivam, Freys, Fabio, Andrés G, Katherine, Nathaly, Paolita, Gustavo, Camilo, Andreita quienes me acompañaron y me apoyaron desinteresadamente durante esta larga travesía.

Sandra Cavanzo

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.	21
1 ESTADO DEL ARTE.	23
1.1 VITAMINAS.	23
1.1.1 Generalidades.	23
1.1.2 Definición.	23
1.1.3 Clasificación de las vitaminas.	24
1.1.4 Estructura química de las WSV.	24
1.1.5 Funciones, fuentes alimentarias, síntomas de deficiencia y dosis recomendada de las WSV.	27
1.1.6 Rutas metabólicas de las WSV.	31
1.1.7 Propiedades fisicoquímicas de las WSV.	32
1.1.8 Las WSV en los alimentos.	36
1.2 LA LECHE.	37
1.2.1 Definición, características.	37
1.2.2 Factores que afectan la composición de la leche.	39
1.2.3 Las vitaminas en la leche.	39
1.2.4 Consumo de leche en Colombia.	40
1.2.5 Control de calidad de leche en Colombia.	41
1.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS WSV.	43
1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.	43
2 CIENCIOMETRÍA.	47
3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.	51
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS.	51
3.1.1 Reactivos y solventes.	51
3.1.2 Material de referencia certificado.	51
3.1.3 Material de laboratorio.	51
3.2 IMPLEMENTACIÓN DE A METODOLOGÍA DE	52

	ANÁLISIS DE LAS WSV POR HPLC/DAD UV-Vis.	
3.2.1	Implementación de la metodología de análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.	53
3.2.1.1	Implementación del método cromatográfico para el análisis simultáneo de las 8 WSV.	53
3.2.1.2	Determinación de los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de las 8 WSV.	54
3.2.1.3	Determinación de las figuras analíticas de mérito para el análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.	55
3.2.2	Implementación de la metodología de análisis de la vitamina C (AA) por HPLC/DAD UV-Vis.	57
3.2.2.1	Implementación del método cromatográfico para el análisis de la VC.	58
3.2.2.2	Determinación de los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de la vitamina C.	59
3.2.2.3	Determinación de las figuras analíticas de mérito para el análisis de la vitamina C por HPLC/DAD UV-Vis.	59
3.3	DETERMINACIÓN DE LAS WSV EN LAS MUESTRAS POR HPLC/DAD UV-Vis.	59
3.3.1	Determinación de las 8 WSV en las muestras.	59
3.3.1.1	Identificación.	59
3.3.1.2	Cuantificación.	60
3.3.2	Determinación de la vitamina C en las muestras.	60
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	61
4.1.	METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS 8 WSV POR HPLC/DAD UV-VIS.	61
4.1.1.	Método cromatográfico para el análisis simultáneo de las 8 WSV.	61
4.1.2.	Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de las 8 WSV.	70

4.1.3	Figuras analíticas de mérito para el análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.	72
4.2	METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE VC POR HPLC/DAD UV-VIS.	78
4.2.1	Método cromatográfico para el análisis de la VC.	78
4.2.2	Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de la VC.	82
4.2.3	Figuras analíticas de mérito para el análisis VC por HPLC/DAD UV-Vis.	82
4.3	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS WSV.	86
4.3.1	Extracción y cuantificación de las 8 WSV en leche.	86
4.3.2	Extracción y cuantificación de la VC.	91
5	CONCLUSIONES.	94
6.	RECOMENDACIONES.	95
7.	BIBLIOGRAFÍA.	96
	ANEXOS.	106

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras químicas de las vitaminas hidrosolubles.	25
Figura 2. Mecanismo de la reacción de oxido-reducción del ácido ascórbico.	34
Figura 3. Composición nutricional media de la leche.	38
Figura 4. Factores que afectan las características fisicoquímicas y de composición de la leche.	39
Figura 5. Consumo de leche per cápita en Colombia.	41
Figura 6. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i> .	53
Figura 7. Variación de la concentración del TFA en la fase móvil para la separación de las WSV.	62
Figura 8. Variación del pH del TFA en la fase móvil para la separación de las WSV.	63
Figura 9. Variación del modificador orgánico en la fase móvil para la separación de las WSV.	64
Figura 10. Variación de la concentración del <i>buffer</i> en la fase móvil para la separación de las WSV.	65
Figura 11. Variación del pH del <i>buffer</i> en la fase móvil para la separación de las WSV.	66
Figura 12. Variación del modificador orgánico en la fase móvil para la separación de las WSV.	67
Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a diferentes longitudes de onda, λ , en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.	69
Figura 14. Procedimiento para la extracción de las 8 WSV en leche.	75

Figura 15.	Perfil cromatográfico típico de la VC obtenido por HPLC/DAD UV-Vis, a una longitud de onda de 245 nm, en una columna apolar ZORBAX 300SB-C18, bajo los parámetros cromatográficos establecidos (Tabla 21).	81
Figura 16.	Procedimiento para la extracción y reducción de la VC en leche.	48
Figura 17.	Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche semidescremada enriquecida con vitaminas	87
Figura 18.	Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche en polvo (para niños).	88
Figura 19.	Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche deslactosada semidescremada ultrapasteurizada.	89
Figura 20.	Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-Vis, en columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 de las WSV de leche materna.	90
Figura 21.	Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-VIS, en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de leche semidescremada enriquecida con vitaminas.	92
Figura 22.	Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-VIS, en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de un jugo de naranja comercial.	92
Figura 23.	Perfil cromatográfico tíj) obtenido por HPLC/DAD UV-VIS, en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de un suplemento vitamínico.	92

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Funciones, fuentes alimentarias, síntomas de deficiencia y dosis media recomendada de las WSV.	28
Tabla 2. Precursores vitamínicos, reacciones y coenzimas.	31
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las WSV.	35
Tabla 4. Formas sintéticas de las WSV disponibles comercialmente.	37
Tabla 5. Concentraciones medias de algunas vitaminas presentes en la leche.	40
Tabla 6. Comparación de diferentes técnicas para la determinación de WSV.	44
Tabla 7. Principales resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre las WSV en la leche y su análisis por HPLC en las bases de datos <i>Scopus</i> y <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge)</i> .	49
Tabla 8. Especificaciones del material de referencia certificado.	52
Tabla 9. Preparación de las soluciones patrón de las WSV de diferente concentración.	60
Tabla 10. Selección de longitud de onda para las 8 WSV analizadas.	68
Tabla 11. Parámetros cromatográficos establecidos para el análisis de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.	68
Tabla 12. Tiempos de retención de las WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.	70
Tabla 13. Parámetros de eficiencia de la separación de las 8 WSV analizadas utilizando los parámetros cromatográficos reportados en la Tabla 11.	71

Tabla 14.	Repetibilidad de los t_R de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.	73
Tabla 15.	Repetibilidad de las área de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.	74
Tabla 16.	Porcentaje de recuperación de la mezcla de WSV adicionada a una leche sin vitaminas.	76
Tabla 17.	Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de correlación lineal, pendiente y su desviación estándar, obtenidos en la determinación simultánea de las WSV, a partir de la curva de calibración (1–64 ppm), por HPLC/DAD UV-Vis.	77
Tabla 18.	Niveles mínimos de detección y de cuantificación de la VB ₁ , VB ₂ , VB ₃₋₁ , VB ₃₋₂ , VB ₅ , VB ₆ , VB ₉ y VB ₁₂ por HPLC/DAD UV-Vis.	77
Tabla 19.	Reproducibilidad de los t_R de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.	79
Tabla 20.	Reproducibilidad de las áreas de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.	80
Tabla 21.	Parámetros cromatográficos establecidos para el análisis de VC por HPLC/DAD UV-Vis.	81
Tabla 22.	Parámetros de eficiencia de la separación de la VC analizada utilizando los parámetros cromatográficos reportados en la Tabla 21.	82
Tabla 23.	Repetitividad de los t_R de la VC analizada por HPLC/DAD UV-Vis.	82
Tabla 24.	Repetitividad de las área de la VC analizada por HPLC/DAD UV-Vis.	83
Tabla 25.	Porcentaje de recuperación de la VC.	83
Tabla 26.	Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de correlación lineal, pendiente y su desviación estándar, obtenidos en la determinación de la VC, a	84

partir de la curva de calibración (1–64 ppm), por HPLC/DAD UV-Vis.

Tabla 27.	Reproducibilidad del t_R de la VC analizada por HPLC/DAD UV-Vis.	85
Tabla 28.	Reproducibilidad del área de la VC analizada por HPLC/DAD UV-Vis.	85
Tabla 29.	Concentración de WSV ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en leche semidescremada enriquecida con vitaminas.	88
Tabla 30.	Concentración de WSV ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en leche en polvo (para niños).	89
Tabla 31.	Concentración de WSV ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en leche semidescremada deslactosada ultrapasteurizada.	90
Tabla 32.	Concentración de WSV ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en leche materna.	91
Tabla 33.	Concentración de VC (mg/g de muestra) en muestras analizadas.	93

LISTADO DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Espectros UV-Vis de la VB ₁ , VB ₂ , VB ₃₋₁ , VB ₃₋₂ , VB ₅ , VB ₆ , VB ₉ VB ₁₂ y VC.	18
Anexo 2. Curvas de calibración de la VB ₁ , VB ₂ , VB ₃₋₁ , VB ₃₋₂ , VB ₅ , VB ₆ , VB ₉ VB ₁₂ y VC.	27

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS

AA	Ácido L-ascórbico.
b	Pendiente de la recta.
ca.	<i>circa</i> (Aproximadamente).
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Electroforesis capilar).
CV	Coefficiente de variación.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
DHAA	<i>Dehydroascorbic acid</i> (Ácido dehidroascórbico).
et al.	<i>Et alii</i> (y otros).
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
ICA	Instituto Colombiano de Agricultura.
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferencia Internacional sobre Armonización).
i.e.	<i>Id ets</i> (Es decir, osea).
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
L	Litros.
µg	Microgramos.
mg	Miligramos.
µL	Microlitros.
mL	Mililitros.
MRC	Material de referencia certificado.
NMD	Nivel mínimo de detección.
NMC	Nivel mínimo de cuantificación.
OMS	Organización Mundial de la Salud.

RDL	Rango Dinámico Lineal
S	Desviación estándar.
S_b	Desviación estándar de la pendiente de la recta.
S_{y/x}	Desviación estándar de la recta.
R²	Coefficiente de correlación.
TFA	Ácido trifluoroacético.
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina).
t_R	Tiempo de retención, <i>min.</i>
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias/mililitros.
UV-Vis	Ultravioleta –Visible.
VB₁	Tiamina.
VB₂	Riboflavina.
VB₃₋₁	Ácido nicotínico.
VB₃₋₂	Nicotinamida.
VB₅	Ácido pantoténico.
VB₆	Piridoxina
VB₈	Biotina
VB₉	Ácido fólico
VB₁₂	Cianocobalamina
VC	Vitamina C
WSV	<i>Water-Soluble Vitamins</i> (Vitaminas hidrosolubles).
<X>	Promedio

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN LECHE POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA*.

Autor: Sandra Carolina Cavanzo Díaz**

Palabras clave: Vitaminas, hidrosolubles, HPLC, Leche.

En la presente investigación se implementaron y validaron dos metodologías por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), una, para la identificación y cuantificación simultánea de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, nicotinamida, ácido pantoténico, piridoxina, ácido fólico y cianocobalamina y otra para el análisis de Ácido L-ascórbico (AA) implementando una reacción de reducción previa al análisis cromatográfico para convertir el ácido dehidroascórbico en AA utilizando L-cisteína como agente reductor. La cuantificación de las 8 vitaminas hidrosolubles se realizó en tres muestras de leche comercial y una de leche materna. La cuantificación del AA se realizó en una muestra de leche, un jugo de naranja y un suplemento vitamínico.

Para el proceso de extracción simultánea de las 8 vitaminas hidrosolubles se evaluaron 3 pH diferentes. Los resultados determinaron que a pH 4 se obtuvo la recuperación más alta de las vitaminas hidrosolubles. A continuación, se procedió a realizar la validación de los métodos implementados determinando las figuras de mérito analíticas. Los resultados permitieron concluir que los métodos son repetibles y reproducibles; Además presentaron coeficientes de determinación $R^2 > 0,999$; con porcentajes de recuperación entre 89 % y 110%, excepto para el ácido fólico (<60%); y niveles mínimos de detección y cuantificación en un rango entre 0,01-0,26 y 0,1-0,36 mg/L respectivamente.

* Trabajo de grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION AND VALIDATION OF AN HPLC-METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS IN MILK SAMPLES*.

Author: Sandra Carolina Cavanzo Díaz**

Keywords: water-soluble vitamins, HPLC, milk.

In this work two high performance liquid chromatography (HPLC) methodologies were implemented and validated. The first methodology performs the simultaneous identification and quantification of thiamine, riboflavin, nicotinic acid, nicotinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and cyanocobalamine; and the second determines L-ascorbic acid (AA) after a previous reduction of dehydroascorbic acid using L-cystein as a reducing agent. The eight water-soluble vitamins quantification was carried out in three different samples of commercial milk and one of breast milk; AA was determined in one milk sample, an orange juice sample and in a vitamin supplement.

For the eight vitamins simultaneous extraction process three different pH levels were evaluated. The results showed that the highest water-soluble vitamins recovery was obtained at pH= 4. The validation of the two methodologies included the determination of analytical figures of merit. Results showed that both methodologies were reproducible and repeatable; coefficients of determination were $R^2 > 0,999$; recovery yields were between 89 and 110 %, except for folic acid (< 60%), and detection and quantification limits were between 0,01 - 0,26 and 0,1 - 0,36 mg/L, respectively.

* Graduation project.

** Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry.
Directors: Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son compuestos orgánicos minoritarios presentes en los alimentos y son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal del cuerpo humano. Éstas presentan una composición química variada, propiedades fisicoquímicas diferentes y su clasificación se basa en su solubilidad (hidrosolubles y liposolubles) [1-3].

Las vitaminas hidrosolubles (WSV, por sus siglas en inglés) no se almacenan en el organismo ya que se eliminan a través de la orina. Por lo tanto, es fundamental consumir alimentos que las contengan para evitar enfermedades causadas por su carencia parcial o total. La mayoría de los alimentos tienen WSV, pero se presentan pérdidas de éstas debido a un número de factores tales como la temperatura elevada, el pH, la presencia de agentes reductores, oxígeno y luz, los cuales están asociados con el procesamiento y almacenamiento prologado de un producto [4, 5]. Por tal razón, muchos países promueven la fortificación vitamínica de alimentos base con el propósito de corregir estas deficiencias nutricionales. Como consecuencia de lo anterior es importante implementar una metodología analítica para la determinación de estos analitos para que los laboratorios de alimentos, los fabricantes y las entidades regulatorias puedan confirmar confiablemente el porcentaje de vitaminas presentes el producto final [6-8].

La determinación de las WSV en los alimentos se dificulta debido a la inestabilidad química y a la complejidad de estas matrices. Existen diferentes métodos para el análisis de estos compuestos orgánicos, entre los cuales se encuentra la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Esta técnica analítica permite hacer una identificación y cuantificación simultánea de estas vitaminas y adicionalmente es rápida, altamente sensible y exacta [4, 6, 9-11].

En la presente investigación, desarrollada en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, se realizó la implementación y validación de dos metodologías por HPLC/DAD UV-Vis, una, para la determinación simultánea de tiamina (VB₁), riboflavina (VB₂), ácido nicotínico (B₃₋₁), nicotinamida (VB₃₋₂), ácido pantoténico (VB₅), piridoxina (VB₆), ácido fólico (VB₉) y cianocobalamina (VB₁₂) y la otra para el análisis de Ácido L-ascórbico (AA) en leche.

Este trabajo presenta un marco teórico sobre las WSV y su técnica de análisis (HPLC). También se describen la metodología implementada para la extracción y cuantificación de estos analitos y los resultados obtenidos.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 VITAMINAS

1.1.1 Generalidades. El descubrimiento de las vitaminas tuvo sus inicios en la Grecia antigua cuando *Hipócrates* postuló que la administración de hígado podía mejorar la visión nocturna. Más adelante en 1757, en Inglaterra, James Lind descubrió que para curar el escorbuto era preciso administrar frutas y verduras frescas. En 1896, el médico holandés Eijkman descubrió que la adición a la dieta de extractos obtenidos de la cáscara de arroz, salvado y germen podía aliviar considerablemente la parálisis. Estas y posteriores observaciones sumadas a los trabajos de Casimir Funk sobre el beri-beri en Polonia, llevaron a formular la teoría de las vitaminas para explicar muchas enfermedades como el escorbuto, raquitismo, pelagra y beri-beri, cuya causa es la ausencia en la dieta de diferentes aminas vitales (de ahí, el nombre de vitaminas) [10, 12].

1.1.2 Definición. La palabra “vitamina” proviene del Latín *vita* (vida) mas del griego “*ammoniakós*” (producto libio, amoníaco) [13]. Las vitaminas son sustancias orgánicas con una actividad biológica alta, que se requieren en pequeñas cantidades para el crecimiento y el funcionamiento normal del cuerpo humano; son de naturaleza y composición variada, imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. Éstas intervienen como catalizadores en las reacciones bioquímicas provocando la liberación de energía. En otras palabras, la función de las vitaminas es facilitar la transformación que siguen los substratos a través de las vías metabólicas [11, 13].

Como las vitaminas no pueden ser sintetizadas por el cuerpo (a excepción de la vitamina D y de la vitamina B₃), éstas deben ser aportadas a través de la alimentación. Aunque todos los alimentos aportan vitaminas en mayor o menor cantidad, no hay ningún alimento que las contenga en las cantidades necesarias para el organismo [14, 15].

1.1.3 Clasificación de las vitaminas. Existen 13 vitaminas, las cuales se clasifican en dos grupos, las vitaminas liposolubles y las vitaminas hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles son moléculas apolares hidrofóbicas, solubles en grasas o lípidos, dentro de las cuales se encuentran las vitaminas A, D, E y K. Las WSV tienen estructuras químicas que son notablemente diversas, pero comparten la propiedad de ser polares, por lo tanto, son solubles en agua; este grupo está conformado por las vitaminas del Complejo B y la vitamina C (VC) [1, 2].

1.1.4 Estructura química de las WSV. Existen 9 WSV y su estructura química se relaciona en la **Figura 1** [2, 16, 17].

La VB₁ en forma libre consiste en un anillo pirimidínico con hidrógenos sustituidos enlazado por un puente de metilo a un derivado del tiazol. Esta vitamina es una amina cuaternaria y existe como un catión monovalente o divalente dependiendo del pH de la solución [16, 18].

La VB₂ posee una estructura heterocíclica. Este anillo de isoaloxazina es comúnmente conocido como flavina. El anillo de flavina está metilado en la posición 7 y 8 y sustituido en la posición 10 con una cadena lateral de ribitol [2,18].

La vitamina B₃ se refiere a la VB₃₋₁ y a la VB₃₋₂, estructuras químicas que tienen la misma actividad biológica en forma libre.

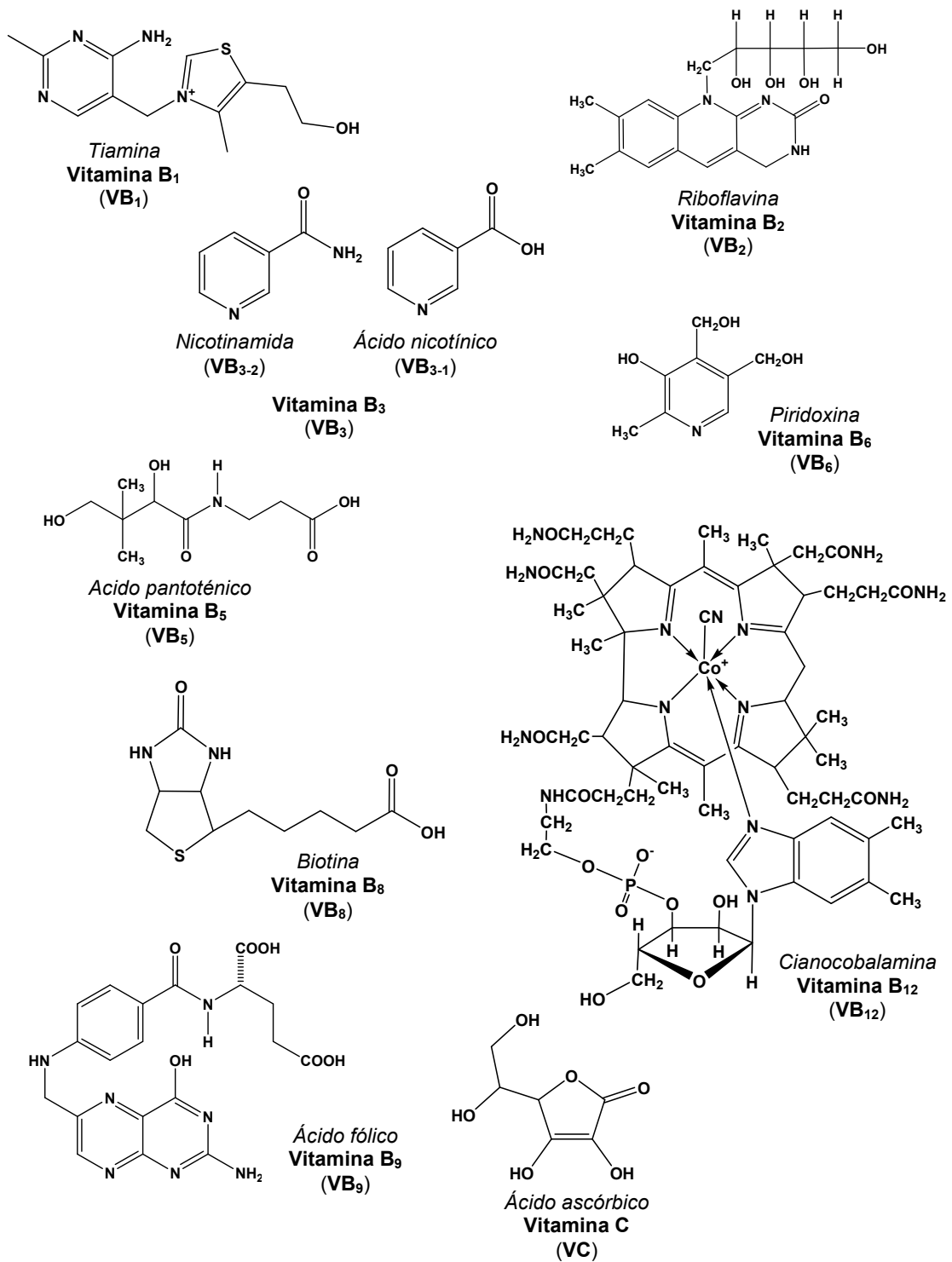


Figura 1. Estructuras químicas de las WSV.

La VB₃₋₁ y VB₃₋₂ son derivados de la piridina y son interconvertibles fácilmente [10, 18, 19].

La VB₅ está compuesta por el ácido pantoico enlazado a la alanina a través de una amida. Debido a la quiralidad del átomo de carbono hidroxilado del ácido pantoico, esta vitamina es ópticamente activa y la mezcla racémica es el resultado de la síntesis; solo los d-(+)-enantiómeros son biológicamente activos y se encuentran en la naturaleza [18].

La vitamina B₆ hace referencia a todos los derivados de la 3-hidroxi-2-metil piridina que tienen actividad biológica similar a la de la piridoxina. Se conocen como VB₆ tres compuestos, a saber: piridoxina o piridoxol, piridoxal y piridoxamina, los cuales poseen, respectivamente, grupos alcohol, aldehído y amina localizados en la posición 4 del anillo piridínico [14, 20].

La biotina está compuesta por la unión de un anillo imidazólico con un anillo de tetrahidrotiofeno con una cadena lateral del ácido pentanoico. La molécula contiene 3 átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, 8 estereoisómeros son posibles. De éstos, solo el dextrógiro, d-(+)-biotina, se produce en la naturaleza y posee actividad biológica [14, 18, 19].

Los folatos se refiere a un grupo grande de compuestos heterocíclicos basados en la estructura del ácido pterico conjugado con uno o mas L-glutamatos enlazados a través del carboxilo de los aminoácidos. El ácido fólico contiene un residuo de ácido glutámico, debido a este componente estructural también es llamado ácido pterocoglutámico [14, 18].

La vitamina B₁₂ es el nombre dado a un grupo de compuestos activos llamados cobalaminas, porque contienen un átomo de cobalto. La estructura de corrina incluye 4 anillos de pirrol reducidos, unidos por 3 puentes meteno

con dos pirroles vinculados directamente. El átomo central de cobalto está coordinando los átomos de nitrógeno de los anillos de pirrol [14, 18].

El termino VC se usa para describir a todos los compuestos que exhiben cualitativamente la actividad biológica del AA. La molécula de AA tiene un anillo de 5 miembros con dos centros quirales en los átomos de carbono 4 y 5, que dan como resultado 4 estereoisómeros. El AA se oxida fácilmente y, de forma reversible al ácido dehidroascórbico (DHAA, por sus siglas en inglés) [18, 19, 21].

1.1.5 Funciones, fuentes alimentarias, síntomas de deficiencia y dosis recomendada de las WSV. Las WSV son esenciales en la dieta humana, porque los tejidos del cuerpo no pueden sintetizarlas. Una excepción es la VB₃, su síntesis depende de una ingesta suficiente de su aminoácido precursor, el triptófano. Al contrario de otros nutrientes, las WSV sólo son necesarias en pequeñas cantidades, pero su presencia es imprescindible para el desarrollo normal del metabolismo. Entre las principales funciones de las WSV, se conocen las siguientes: actúan como antioxidantes y además desempeñan un papel fundamental en la prevención de infecciones e intervienen en el sistema inmunológico.

Las vitaminas, al ser solubles en agua no se almacenan en el cuerpo, por lo tanto el organismo toma la cantidad que necesita de ellas y lo demás lo elimina por la orina. Por tal razón, la alimentación diaria debe aportar y cubrir las necesidades vitamínicas, que varían según la edad, la actividad física, etc. [18, 19, 22].

En la **Tabla 1** se reportan de forma general algunas funciones, las principales fuentes alimentarias, síntomas de deficiencia y dosis recomendada de las WSV [1, 2, 19, 23].

Tabla 1. Funciones, fuentes alimentarias, síntomas de deficiencia y dosis media recomendada de las WSV.

Vitamina	Funciones	Fuentes alimentarias	Síntomas de deficiencia	Dosis recomendada
VB₁	Ayuda al cuerpo a liberar energía a partir de los carbohidratos en el metabolismo; fomenta el crecimiento y la tonificación de los músculos.	Vísceras (hígado, corazón y riñones), levadura de cerveza, vegetales de hoja verde, germen de trigo, legumbres, cereales, carne, leche, frutas.	Insomnio, debilidad, fatiga, poca fuerza muscular, pérdida de peso, problemas gastrointestinales y cardíacos, depresión e irritabilidad.	1,0 – 1,5 mg por día
VB₂	Ayuda al cuerpo a liberar energía a partir de las proteínas, las grasas y los carbohidratos durante el metabolismo.	Levadura de cerveza, germen de trigo, verduras, cereales, lentejas, hígado, leche, carne, coco, pan, queso.	Crecimiento retardado, ojos dolorosos y enrojecidos, dermatitis, llagas en la boca y en la lengua, cabello grasoso, pereza, etc.	1,3 – 1,8 mg por día
VB₃₋₁	Involucrada en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y las grasas.	Carnes, vegetales de hojas, granos, cereales, levadura, leche.	Falta de energía, dolor de cabeza, mal aliento, falta de apetito, debilidad muscular, irritabilidad, nerviosismo, depresión, úlceras, problemas gastrointestinales, etc.	15 – 20 mg por día

Tabla 1. Continuación

Vitamina	Funciones	Fuentes alimentarias	Síntomas de deficiencia	Dosis recomendada
VB₅	Como parte de la coenzima A, es un componente esencial del catabolismo de todos los nutrientes.	Levadura de cerveza, vegetales verdes, yema de huevo, leche, cereales, vísceras, maní, carnes, frutas.	Calambres en los músculos, problemas estomacales, cansancio, ganas de vomitar, dificultad para dormir, torpeza mental, arritmia cardíaca, sensación de pies ardientes, etc.	10 – 100 mg por día
VB₆	Ayuda en la construcción del tejido corporal y en el metabolismo de las proteínas.	Semillas, granos, hígado, leche, huevos, vegetales de hojas verdes.	Insomnio, anemia, falta de tono muscular, problemas en la piel, grietas en las comisuras de los labios, caída del cabello o alopecia, nerviosismo, calambres en los brazos y en las piernas, retención de líquidos, dificultad para aprender, etc.	2 mg por día
VB₈	Involucrada en el metabolismo de las proteínas, las grasas y los carbohidratos.	Levadura de cerveza, yema de huevo, leguminosas, hígado, frutas.	Debilidad extrema, falta de apetito, piel escamada, dolores en los músculos, depresión, pelo canoso, etc.	0,3 mg por día

Tabla 1. Continuación

Vitamina	Funciones	Fuentes alimentarias	Síntomas de deficiencia	Dosis recomendada
VB₉	Ayuda en el desarrollo del material genético, y está involucrada en la producción de los glóbulos rojos.	Vegetales verdes, yema de huevo, champiñones, legumbres, naranjas, cereales, hígado, nueces, leche.	Anemia, deficiencia de la VB ₁₂ , cabello canoso, problemas gastrointestinales, prematuro.	0,4 mg por día
VB₁₂	Ayuda al metabolismo de las proteínas y las grasas, al desarrollo celular y al funcionamiento del sistema nervioso.	Pescado, riñones, huevos, quesos, leche, carne.	Falta de apetito, poco crecimiento en niños, cansancio, depresión, problemas de equilibrio, diarrea, dolor en la boca o en la lengua, inflamaciones de los nervios	2,4 mg por día
VC	Esencial para la estructura de los huesos, cartílagos, músculos y vasos sanguíneos. Además ayuda a mantener los vasos capilares y el colágeno y facilita la absorción del hierro.	Las frutas cítricas, las moras, los melones, los pimentones verdes, la col, los vegetales de hojas y la leche.	Dificultad de cicatrización de heridas y fracturas, debilidad capilar con problemas de sangrado en las encías o en la nariz, facilidad para desarrollarse moretones, articulaciones hinchadas y dolorosas, anemia, problemas digestivos, etc.	60 mg por día

1.1.6 Rutas metabólicas de las WSV. Algunas vitaminas y sus derivados, en especial las vitaminas del grupo B sirven como coenzimas de enzimas, que funcionan en el catabolismo de los alimentos para producir energía. Una coenzima consta de una proteína a la cual se une la vitamina. La vitamina es la responsable de la unión con el sustrato. Si la vitamina específica no está disponible para formar la coenzima, la secuencia de cambios químicos no puede continuar, ello hace que el producto bloqueado se acumule en los tejidos y alternativamente el metabolismo se desvíe por otro camino. Las WSV participan principalmente en reacciones de óxido-reducción o de transferencia de grupos en los procesos metabólicos. En la **Tabla 2** se reportan, de forma general, los precursores vitamínicos, los tipos de reacciones en las que participan y los coenzimas derivados [1, 15, 19].

Tabla 2. Precursores vitamínicos, reacciones y coenzimas.

Precursor	Tipo de reacción	Coenzima derivados
VB₁	Transferencia de aldehídos, descarboxilación en la fermentación alcohólica y el ciclo del ácido cítrico.	Pirofosfato de tiamina
VB₂	Oxido-reducción en cualquier parte del ciclo del ácido cítrico y el transporte electrónico.	Coenzimas de flavina
VB₃₋₁	Óxido-reducción.	Nicotinamida adenina dinucleótido
VB₅	Transferencia de grupo acilo en muchos procesos metabólicos.	Coenzima A
VB₆	Transaminación, especialmente de aminoácidos.	Piridoxal fosfato
VB₈	Carboxilación en metabolismo de carbohidratos y lípidos.	Se une covalentemente a las carboxilasas
VB₉	Transferencia de grupos de un átomo carbono, en particular, en compuestos nitrogenados.	Ácido tetrahidrofólico
VB₁₂	Metilación de la homocisteína a metionina e isomerización de la L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA.	Coenzimas de cobamida
VC	Óxido-reducción.	

1.1.7 Propiedades fisicoquímicas de las WSV. La tiamina es una de las vitaminas más inestables. Tiene una estructura de uniones débiles y se descompone con facilidad en medio alcalino [22], la estabilidad de la VB₁ depende del pH, la temperatura, la fuerza iónica y las características de la matriz alimenticia; su máxima estabilidad en solución está a pH entre 2 y 4 [18], este compuesto es más inestable a pH elevados y se descompone por oxidación o en la presencia de agentes reductores, se destruye por la radiación UV [14] y es relativamente estable en soluciones ácidas, pero se inactiva rápidamente por calentamiento en soluciones neutras [1, 23].

La riboflavina es destruida por exposición tanto a la luz visible como a la radiación UV y es estable al calentamiento si se protege ésta. La estabilidad incrementa con el aumento de la acidez y su óptima estabilidad está en un rango de pH entre 3,5 y 4. Bajo condiciones alcalinas, la riboflavina se fotodegrada a lumiflavina, que es inactiva biológicamente y bajo condiciones ácidas, se fotodegrada a lumicromo, un producto también biológicamente inactivo [18,19].

La VB₃₋₁ y VB₃₋₂ son las WSV más estable, su actividad biológica no es afectada por la luz o la oxidación, ni por tratamientos térmicos, ácidos o alcalinos [18, 24].

EL ácido pantoténico, en su forma libre es inestable y extremadamente higroscópico. La estabilidad del ácido pantoténico y su sal de calcio en soluciones acuosas depende del pH [19]. La VB₅ es estable a pH neutro, a la oxidación y a la exposición a la luz pero se destruye fácilmente por calentamiento, acidez o álcalis [18, 21, 25]. Las soluciones del pantotenato de calcio son más estables a pH entre 5 y 7 [19].

La piridoxina es estable en soluciones ácidas, su estabilidad disminuye notablemente a medida que aumenta el pH a valores superiores a neutro y

se destruye rápidamente por la luz. La piridoxina es más estable que el piridoxal y la piridoxamina [1, 2].

La biotina es estable al calentamiento y al oxígeno pero es gradualmente destruida por la radiación UV. Las soluciones acuosas con pH entre 4 y 9 son estables a 100 °C, pero soluciones más ácidas o más alcalinas son inestables al calentamiento. El átomo de azufre en la VB₈ está sujeto a la oxidación con una formación secuencial de biotina sulfóxido y biotina sulfona.

En solución acuosa, el ácido fólico es estable a 100 °C por 10 horas en un rango de pH entre 5 y 12, cuando se protege de la luz, pero comienza a incrementar su inestabilidad cuando el pH decrece por debajo de 5 [18,19]. Esta vitamina exhibe una óptima estabilidad a un pH de 7,6 [26].

La cianocobalamina es la forma más estable y predominante de la VB₁₂. La estabilidad óptima de la vitamina está a pH entre 4 y 4,5. En condiciones severas de acidez y alcalinidad y con la exposición a la radiación UV, a la luz visible y a los agentes oxidantes la VB₁₂ se inactiva [18, 19, 22].

La estabilidad del AA es más alta en un rango de pH entre 3 y 4,5 que entre 5 y 7. A pH alcalinos la VC es inestable y a pH=1, la ionización del AA es suprimida y la molécula, completamente protonada, es atacada lentamente por el oxígeno; consecuentemente, la velocidad de oxidación de este compuesto se acelera cuando el pH incrementa de 1,5 a 3,5 [18]. Las reacciones de degradación del AA en soluciones acuosas dependen de factores como el pH, temperatura y la presencia de oxígeno o metales, por lo tanto, su fuerte propiedad reductora puede llevar a un rápido y excesivo cambio oxidativo para su conversión en DHAA [19, 20, 22, 28].

En la **Figura 2** se describe el mecanismo de la reacción de óxido-reducción del AA [16].

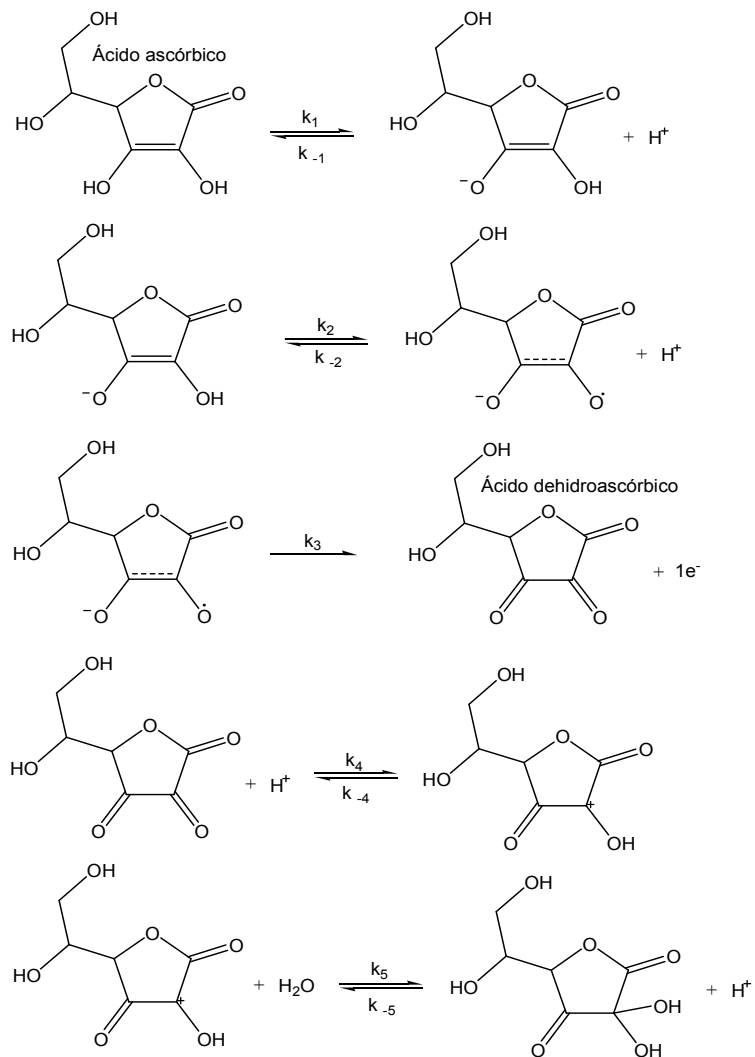


Figura 2. Mecanismo de la reacción de óxido-reducción del AA.

En la **Tabla 3** se relacionan algunas propiedades fisicoquímicas de las WSV [28].

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las WSV.

Vitamina	Fórmula molecular	Peso molecular [g/mol]	Punto de fusión [°C]	Punto de ebullición [°C]	Solubilidad
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS	265.35	N.R.	N.R.	Soluble: Agua.
Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.36	280	N.R.	Insoluble: Agua, éter dietílico, acetona, cloroformo. Ligeramente soluble: Etanol.
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	236	sublima	Soluble: Agua, glicerol y alcohol. Ligeramente soluble: Éter.
Nicotinamida	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.12	130	157	Soluble: Agua, etanol, glicerol. Ligeramente soluble: Cloroformo.
Ácido pantoténico	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.23	N.R.	N.R.	Soluble: Agua, benceno, éter dietílico.
Piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.18	156-159	N.R.	Soluble: Agua.
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.30	231-233	N.R.	Soluble: Agua, etanol. Ligeramente soluble: Cloroformo, éter dietílico.
Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.39	250 (desc.)	-	Soluble: Ácido acético, etanol, piridina.
Cianocobalamina	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄	1355.13	> 300	N.R.	Soluble: Agua.
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176.12	191 (desc.)	-	Soluble: Agua, etanol. Insoluble: Cloroformo, éter dietílico, benceno, éter de petróleo.

N.R.= No reportado, desc.= descomposición

1.1.8 Las WSV en los alimentos. Los alimentos comúnmente presentan pérdida de vitaminas, ya que éstas, por ser solubles en agua, son susceptibles a la lixiviación durante los procesos de lavado y cocción [29].

Otros factores que juegan un papel importante en la pérdida o degradación de las WSV durante la transformación y el almacenamiento de un alimento son el aire o el oxígeno, la luz, la humedad, la actividad del agua, el pH, las enzimas de degradación y las trazas de elementos metálicos, especialmente, de hierro y cobre [19].

Debido a lo anterior, es importante que los alimentos procesados, los cuales deben ser almacenados hasta que se consumen, presenten envases o envolturas adecuados, que el tiempo y la temperatura de procesamiento y almacenamiento sean controlados por las buenas prácticas de fabricación para preservar la calidad, prolongar la vida útil y evitar que se presenten deterioros o se reduzca el valor nutritivo de estos productos. Sin embargo, es importante considerar la pérdida de las WSV específicas de un producto [30-32].

La fortificación o enriquecimiento se ha utilizado para describir una forma de mejorar el contenido de las WSV en los alimentos, debido a su pérdida parcial o total en un producto durante su procesamiento y almacenamiento.

Las formas sintéticas más estables de las WSV que están disponibles comercialmente para la fortificación de alimentos se describen en la **Tabla 4** [18, 19, 21].

Las WSV en forma natural o sintética que se encuentran comúnmente en la leche son las siguientes: VB₁, VB₂, VB₃, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂ y VC [2, 14, 15].

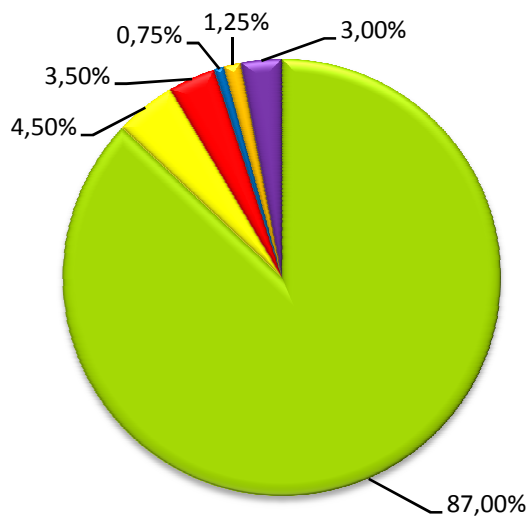
Tabla 4. Formas sintéticas de las WSV disponibles comercialmente.

Vitamina	Forma sintética
VB₁	Hidrocloruro de tiamina
VB₂	Riboflavina
VB₃₋₁	Ácido nicotínico
VB₃₋₂	Nicotinamida
VB₅	Pantotenato de calcio
VB₆	Hidrocloruro de piridoxina
VB₉	Ácido fólico
VB₁₂	Cianocobalamina
VC	Ácido L-ascórbico

1.2. LA LECHE

1.2.1 Definición, características. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la leche es el producto normal de secreción de la glándula mamaria y es un alimento natural completo, porque desde el punto de vista nutricional contiene proteína, carbohidratos, grasa, vitaminas y minerales. En la **Figura 3** se muestra el contenido medio de los nutrientes de la leche [1, 33].

La leche es un líquido blanco y opaco, de sabor ligeramente dulce, pH casi neutro y tiene una estructura física compleja con tres estados de agregación de la materia.



■ Agua ■ Carbohidratos ■ Lípidos ■ Cenizas ■ Otros ■ Proteínas

Figura 3. Composición nutricional media de la leche.

La caseína que es la principal proteína de la leche, se encuentra dispersa como un gran número de partículas sólidas tan pequeñas que no se sedimentan y permanecen en suspensión; la grasa y las vitaminas liposolubles se encuentran en forma de emulsión y la lactosa, algunas proteínas, las sales minerales y las vitaminas hidrosolubles se encuentran totalmente disueltas en el agua de la leche [1, 34-36].

Las propiedades especiales de la leche se derivan de la presencia de proteínas altamente nutritivas, de lactosa, de glicéridos de los ácidos grasos más bajos, y de calcio y fósforo. Las deficiencias más significativas consisten en el contenido relativamente bajo de hierro, cobre y de vitaminas C y D. Aunque la composición general de la leche es casi la misma en todos los mamíferos, el contenido de ciertos componentes varía considerablemente entre las especies [2, 36].

1.2.2 Factores que afectan la composición de la leche. Las características fisicoquímicas y de composición de la leche varían por la influencia de una serie de factores: los asociados al animal, los que dependen del manejo del animal y los relacionados con el ambiente (**Figura 4**) [34-39].

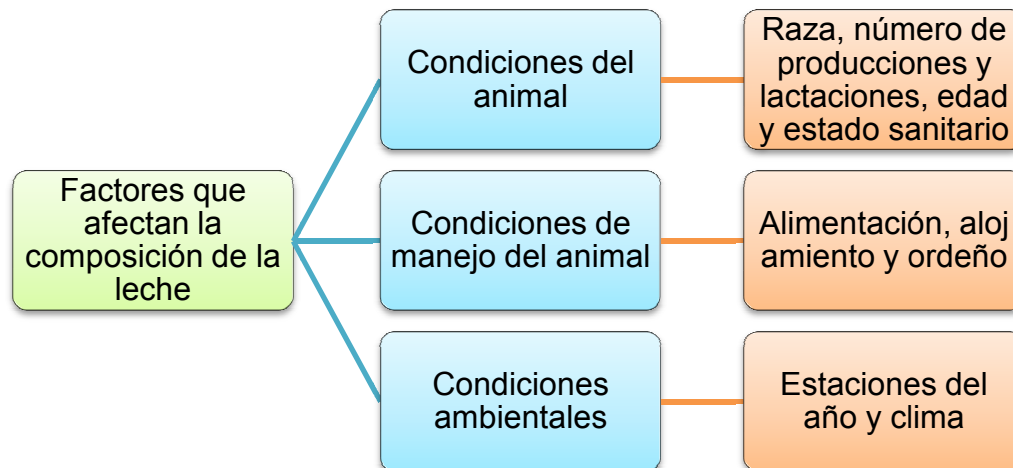


Figura 4. Factores que afectan las características fisicoquímicas y de composición de la leche.

Teniendo en cuenta los factores que afectan la composición nutricional de la leche, los parámetros que presentan mayor variación son los lípidos y las proteínas [35, 36].

1.2.3 Las vitaminas en la leche. La leche contiene todas las vitaminas, pero es especialmente rica en vitaminas A, E y en VB₂. En cantidades inferiores se encuentran la vitamina D, VC, VB₁, VB₃ y VB₅ [2]. En la **Tabla 5** se muestran las cantidades medias de algunas vitaminas presentes en la leche [39].

Tabla 5. Concentraciones medias de algunas vitaminas presentes en la leche.

Vitamina	Cantidad, $\mu\text{g}/100\text{ mL}$
VA	30
VD	0,06
VE	88
VB ₁	37
VB ₂	180
VB ₆	46
VB ₁₂	0,42
VC	1,70

1.2.4 Consumo de leche en Colombia. La leche es un alimento especial, que por su valor nutricional y beneficios, ha sido recomendado por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como indispensable para la alimentación humana [36, 40]. Sin embargo la producción láctea dista mucho de cubrir las necesidades de la población mundial, que de acuerdo con los estándares establecidos por la FAO, debe ser de 170 litros por persona al año [41]. La mayor parte de la leche que se consume en el mundo, es la leche bovina aunque también se consumen leches de otros mamíferos como la cabra y la oveja. En la **Figura 5** se reporta el consumo de leche bovina por habitante en Colombia, entre los años 1995 y 2007 [42-44].

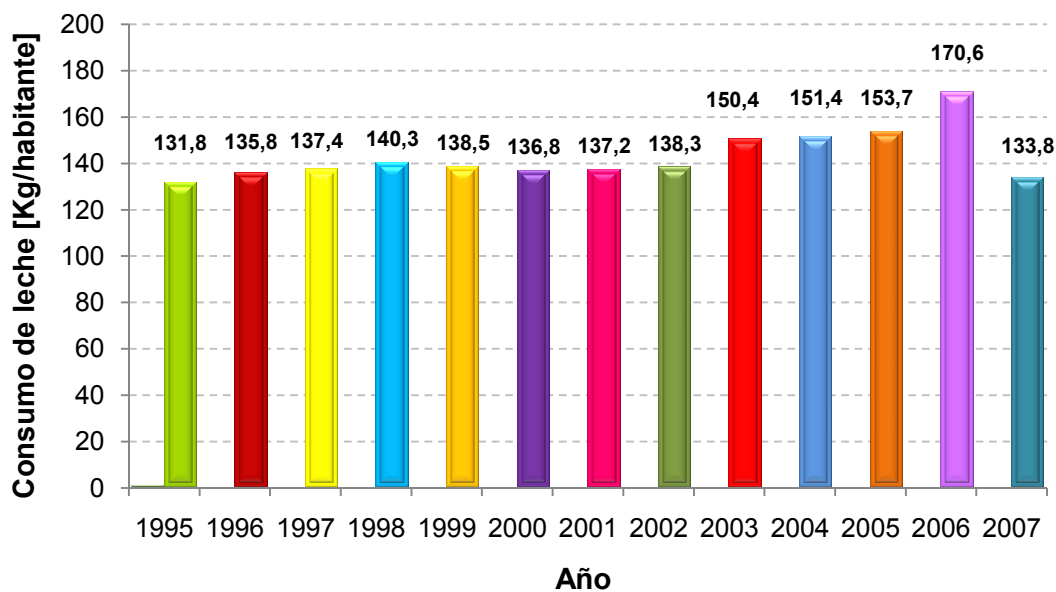


Figura 5. Consumo de leche per cápita en Colombia 1995-2007.

1.2.5 Control de calidad de leche en Colombia. La calidad de la leche, como de cualquier otro producto, se refiere al ajuste del mismo a las especificaciones establecidas. El estudio de la calidad de la leche, desde el punto de vista de su composición y de sus propiedades fisicoquímicas, así como sus variaciones, es necesario, en primer lugar, para determinar su contenido nutricional y, en segundo, por su influencia en los procesos de elaboración de productos lácteos [35, 45, 46].

La calidad está determinada por las características fisicoquímicas y bacteriológicas que determinan la composición de un producto. Una leche de buena calidad debe reunir las siguientes características: poseer una composición adecuada, o sea, contenido de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas, no contener un número excesivo de microorganismos (<50.000 UFC/ml), estar libre de sustancias extrañas (calostro, sedimentos) y de residuos químicos e inhibidores (antibióticos, pesticidas y otros), no tener cuerpos extraños ni agentes patógenos (brucelosis, tuberculosis y

salmonella, entre otros), y poseer adecuadas características organolépticas (sabor y olor normales) [33].

La entidad regulatoria para el control de calidad de la leche, a nivel mundial es la FAO. En nuestro país el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el cual a través del Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), se encarga de supervisar e inspeccionar las condiciones asociadas al animal y a su manejo, mientras que el Ministerio de la Protección Social, en conjunto con el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), se encargan de verificar y apoyar los programas de aseguramiento y control de calidad, en las plantas de procesamiento y enfriamiento de la leche.

En Colombia, el *Decreto N° 616 de 2006*, establece el reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano, que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país. En su *Artículo 25* sobre el control interno en las plantas de procesamiento de leche, menciona que todos los días, como mecanismo de control interno, criterios de aceptación, liberación y rechazo de la leche se realizarán pruebas microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas.

Teniendo en cuenta estos tres criterios de control de calidad de la leche, en esta normatividad colombiana no se establecen pruebas nutricionales, que son muy importantes, debido a que en las plantas de procesamiento, la leche se somete a diferentes tipos de tratamiento térmico (pasteurización, ultrapasteurización y ultra alta temperatura), a procesos de pulverizado y a prolongados periodos de almacenamiento, que pueden alterar el valor nutritivo de la leche [47-49].

1.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS WSV

La determinación de las WSV en matrices alimenticias ha sido difícil debido a su composición química variada, a su inestabilidad, al gran número de componentes, (que producen interferencias) y a su contenido bajo [14, 50, 51].

Existen diferentes métodos para el análisis de WSV, entre éstos se destacan los métodos químicos y fisicoquímicos. Entre los métodos químicos se encuentran la volumetría y la gravimetría [52, 53]. Entre los métodos fisicoquímicos se encuentran los espectrofotométricos y enzimáticos o microbiológicos [54, 55]. Estos métodos requieren mucho tiempo de preparación y análisis y no son exactos.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de las WSV, su variada composición y su relativamente alto peso molecular, para la determinación y análisis de éstas, la técnica más frecuentemente utilizada es la HPLC, que es un método rápido y sensible [14, 50, 51, 55-58].

En la **Tabla 6** se muestra una comparación de diferentes técnicas utilizadas para la determinación de las WSV [57-60].

1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia. La HPLC es la técnica analítica de separación más usada para el análisis de una amplia variedad de especies, especialmente, no volátiles o termolábiles. Ésta es la más utilizada para la determinación de WSV en diferentes matrices [4, 6, 50, 52, 56]. En la separación de estos compuestos, está incluida la cromatografía en fase reversa, donde la fase estacionaria es de menor polaridad que la fase móvil, por lo tanto, la elución de los compuestos será en orden decreciente de polaridad.

Tabla 6. Comparación de diferentes técnicas para la determinación de WSV.

Técnica	Principio	Propiedad medida	Ventajas	Desventajas
Fluorimetría [4, 14, 52, 61]	Utilizando una lámpara, las moléculas del analito se excitan para dar una especie, con un espectro de emisión fluorescente característico.	Intensidad de la radiación de emisión fluorescente.	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilidad. - Selectividad. - Amplios intervalos de linealidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Interferencias de la matriz. -La influencia de la temperatura, el pH, la viscosidad del solvente y de la concentración del oxígeno disuelto en la intensidad de la fluorescencia.
Fosforimetría [52, 61, 62]	Utilizando una lámpara, las moléculas del analito se excitan para dar una especie con un espectro característico de emisión fosforescente.	Intensidad de la radiación de emisión fosforescente.	<ul style="list-style-type: none"> - Selectividad. - Amplios intervalos de linealidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las temperaturas bajas. -Poca precisión en las medidas. - Interferencias de la matriz.
TLC [52, 61]	El analito se desplaza por capilaridad con la fase móvil a través de la fase estacionaria, la cual está fijada sobre una placa plana.	Polaridad del analito.	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo costo. - Se puede acoplar con técnicas de detección selectiva. - Rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> -Interferencias de la matriz.

Tabla 6. Continuación.

Técnica	Principio	Propiedad medida	Ventajas	Desventajas
GC [61, 63, 64]	El analito es volatilizado y arrastrado por un gas inerte a través de la fase estacionaria.	Polaridad del analito.	-Se acopla con técnicas selectivas de detección. - Rango amplio de temperaturas.	- Los analitos deben ser volatilizables. - Analitos de bajo peso molecular.
HPLC [9, 14, 52, 61, 62, 64]	El analito es arrastrado a través de una fase estacionaria por un solvente.	Polaridad del analito.	- Alta sensibilidad. - Analitos no volátiles o termolábiles. - La mayoría de los detectores son no destructivos.	- Alto costo
CE [9, 14, 61, 62]	Se basa en la diferencia de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante.	Se basa en las diferencias entre la relación carga-tamaño de los diferentes analitos.	-Capacidad de separar macromoléculas.	- Alto costo - Moléculas Ionizables

Para la separación de las WSV comúnmente se utilizan como fase móvil mezclas de *buffer* de fosfato o acetato y modificadores orgánicos (acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros) [5-7, 11]. Los solventes mencionados anteriormente, tienen la posibilidad de utilizarse como fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable (elución con gradiente), con lo que se tienen diferentes grados de polaridad durante el tiempo de análisis cromatográfico.

Para la detección de las WSV, uno de los detectores más utilizado es el detector de arreglo de diodos ultravioleta-visible (DAD UV-Vis), el cual presenta una buena sensibilidad, rango dinámico lineal amplio y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. Este detector no es destructivo, puede emplearse con gradiente de solventes y permite obtener tanto el cromatograma a una longitud de onda determinada como el espectro UV-Vis de cada uno de los compuestos presentes en la mezcla. La identificación de estos compuestos se realiza mediante la comparación de los tiempos de retención y los espectros UV-Vis con los de los correspondientes materiales de referencia certificados (MRC) [5, 8, 9, 63, 64].

2. CIENCIOMETRÍA

La comunidad científica cuenta con algunos mecanismos que evalúan la calidad y confiabilidad de su producción intelectual. Hoy por hoy una de las herramientas más utilizadas es la bibliometría, que permite realizar un análisis cuantitativo y reflejar la actividad científica actual. La bibliometría usa técnicas matemáticas y estadísticas para establecer las características de la investigación científica e incluye el análisis de factores que pueden ser determinantes para el desarrollo de esta actividad: número de investigadores, su distribución geográfica o por especialidad, fuentes de financiamiento y productividad [65-69]. Los análisis bibliométricos utilizan las bases de datos y las patentes como principales fuentes de información.

Con el objeto de revisar el estado actual de las investigaciones sobre el análisis de WSV en la leche, se realizó el estudio bibliométrico utilizando dos bases de datos: ***Elsevier (Scopus)*** y ***Web of Science (WOS, ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)***.

En la **Tabla 7** se muestra un resumen de los resultados obtenidos con las dos bases de datos. Para la base de datos ***Elsevier (Scopus)*** se utilizaron las ecuaciones de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*water-soluble vitamins*) AND TITLE-ABS-KEY (*milk*) AND PUBYEAR AFT 2001 y TITLE-ABS-KEY (*water-soluble vitamins*) AND TITLE-ABS-KEY (HPLC) AND PUBYEAR AFT 2001 y para la base de datos ***Web of Science*** las ecuaciones de búsqueda: TS=(*water-soluble vitamins and milk*) y TS=(*water-soluble vitamins and HPLC*).

Como se observa en la **Tabla 7** las áreas de mayor investigación son ciencia de alimentos y tecnología, junto con química y química analítica. En

consecuencia, las revistas con mayor número de publicaciones son *Journal of Chromatography A*, donde se encuentran varias publicaciones sobre el análisis de WSV. Entre las investigaciones más relevantes tenemos la desarrollada por Vidovic *et al.* [32] “*Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method*”, en la cual se implementó y validó un método por cromatografía líquida de partición modificada con una fase reversa para la determinación simultánea de VB₁, VB₂, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VC usando una fase móvil con acetonitrilo y una solución de ácido octanesulfónico (0.0125 M, pH=2,5) con gradiente de elución; y para la detección de las WSV se utilizó un DAD.

Otra investigación importante fue la publicada por Heudi *et al.* [9] “*Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes*”. En este artículo fueron separadas las vitaminas VB₁, VB₂, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₈, VB₉ y VC, utilizando una columna C-18 y una fase móvil con una solución de ácido trifluoroacético (0,025%, pH=2,6) y acetonitrilo con gradiente de elución.

Otra revista de impacto científico en los temas mostrados en la **Tabla 7**, fue *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, donde se encontró que el artículo más destacado fue realizado por Zafra-Gómez *et al.* [8] “*Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography*”. En este trabajo, se propuso un método para la determinación simultánea de VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂ y VC en productos enriquecidos. Utilizando HPLC en fase reversa con gradiente de elución de metanol y *buffer* de fosfato modificado, una columna C-18 y detector de fluorescencia y UV-Vis, se lograron separar las 8 WSV.

Tabla 7. Principales resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre las WSV en la leche y su análisis por HPLC en las bases de datos *Scopus* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Fecha de búsqueda: 21 de enero de 2009 (periodo de análisis: 2001-2009).

Observable	SCOPUS		WEB OF SCIENCE	
	<i>Water-soluble vitamins and milk</i>	<i>Water-soluble vitamins and HPLC</i>	<i>Water-soluble vitamins and milk</i>	<i>Water-soluble vitamins and HPLC</i>
No. total de artículos	31	68	32	83
Años con mayor número de publicaciones	2008 (5) 2007 (7) 2006 (3)	2008 (10) 2007 (10) 2006 (7)	2008 (4) 2002 (6) 2001 (10)	2008 (12) 2006 (12) 2005 (12)
Autores con mayor número de publicaciones (o publicaciones más destacadas)	Lu, B. (1) Heudi, O. (1) Zafra-Gómez, A. (1)	Perly, B. (2) Marriott, P.J. (2) Hau Fung Cheung, R. (2)	Gatti, R. (1) Woollard, D. (1) Zafra-Gómez, A. (1)	Ekinci, R. (3) Kadikal, C. (3) Buszewski, B. (3)
Revistas con mayor número de publicaciones	- <i>Food Chemistry</i> (3) - <i>Journal of Chromatography A</i> (3) - <i>Journal of Dairy Science</i> (2)	- <i>Journal of Chromatography A</i> (5) - <i>Journal of Chromatographic Science</i> (3) - <i>European Journal of Nutrition</i> (3)	- <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (4) - <i>Food Chemistry</i> (3) - <i>Journal of Chromatography A</i> (2)	- <i>Journal of Chromatography A</i> (11) - <i>Journal of Agricultural and Chemistry</i> (7) - <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i>

Tabla 7. Continuación.

Observable	SCOPUS		WEB OF SCIENCE	
	<i>Water-soluble vitamins and milk</i>	<i>Water-soluble vitamins and HPLC</i>	<i>Water-soluble vitamins and milk</i>	<i>Water-soluble vitamins and HPLC</i>
Áreas de mayor investigación	<ul style="list-style-type: none"> - Agricultural and Biological Sciences (19) - Medicine (9) - Chemistry (8) 	<ul style="list-style-type: none"> - Chemistry (30) - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (24) - Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics (18) 	<ul style="list-style-type: none"> - Food Science and Technology (14) - Nutrition y Dietetics (10) - Chemistry, Applied (9) 	<ul style="list-style-type: none"> - Chemistry, Analytical (50) - Biochemical Research Methods (24) - Food Science and Technology (20)
No. total de patentes	7886	6883	-	-
Oficinas con sus respectivas patentes	<ul style="list-style-type: none"> - US Patent Office (5055) - European Patent Office (582) - Word Intellectual Property Office (2249) 	<ul style="list-style-type: none"> - US Patent Office (4398) - European Patent Office (461) - Word Intellectual Property Office (2024) 	-	-

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y solventes. Para la realización de este trabajo, se emplearon los siguientes reactivos: ácido ortofosfórico (85%, *Merck*, Darmstadt, Alemania), ácido trifluoroacético ($\geq 99\%$, *Merck*, Hohenbrunn, Alemania), acetonitrilo, agua y metanol (grado HPLC, *J.T. Baker*, México D.F., México), fosfato de potasio monobásico (99%, *J.T. Baker*, México D.F., México), fosfato de potasio dibásico (99,5%, *J.T. Baker*, México D.F., México), fosfato trisódico decahidratado (98%, *J.T. Baker*, Phillipsburg, Estados Unidos) e hidrocloreuro de L-cisteína monohidratado (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Estados Unidos).

3.1.2 Material de referencia certificado. En la **Tabla 8** se reportan las especificaciones comerciales de los patrones de referencia, empleados en este estudio.

3.1.3 Material de laboratorio. Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 y pH-metro MPC227 de Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Suiza), pipetas volumétricas de 10 mL, balones aforados de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mL, vasos de precipitado de 25, 50, 100 mL, embudo Büchner, Erlenmeyers de 10, 50 mL, Erlenmeyer con salida lateral de 500 mL y tubos de ensayos de PYREX (México D. F., México). Frascos plásticos esterilizables de 250 mL, micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 μL , puntas plásticas para micro pipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtros de membrana PVDF de 0,45 μm de Millipore (Sao Pablo, Brasil), microjeringa para inyección de 50 μL de Agilent technologies (Melbourne, Australia).

Tabla 8. Especificaciones del material de referencia certificado.

Sustancia	Pureza (%)	Número de lote*	Fecha de expiración
1. Ácido L-ascórbico	99,9	LB47613	Abril 2010
2. Ácido fólico	~98	126K0753	NA**
3. Ácido nicotínico	≥98	126K0693	NA
4. Cianocobalamina	99,9	LB47607	Abril 2010
5. Hidrocloruro de tiamina	≥99	037K01301	Abril 2010
6. Nicotinamida	99	LB47321	Marzo 2010
7. Piridoxina	≥98	087K1967	NA
8. (-)-Riboflavina	≥98	017K0708	Marzo 2010
9. Sal hemicalcio del ácido (DL)-pantoténico	≥97	038K1865	NA

* Proveedor: *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.), ** NA= No Aparece.

3.2 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LAS WSV POR HPLC/DAD UV-Vis.

La VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂ y VC no se pudieron determinar simultáneamente, por lo tanto, se tuvo que implementar dos métodos independientes, a saber: uno, para determinar VC (AA) y, otro, para determinar las 8 vitaminas restantes (VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂). La explicación para lo anterior, es que el AA se oxida rápidamente a DHAA, debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura. Estas reacciones de oxidación son inducidas por el incremento de la temperatura, pH alcalinos, luz, la presencia de oxígeno, metales pesados y la acción de algunas enzimas. Los factores mencionados anteriormente, sumados al procesamiento y almacenamiento prolongado, que sufren los alimentos, afectan el contenido de AA en éstos, por consiguiente, se implementó una reacción de reducción previa al análisis cromatográfico, para convertir el DHAA en AA, según la metodología descrita en [14, 16, 24, 70-75].

3.2.1 Implementación de la metodología de análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido *Series 1200* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, Estados Unidos) (**Figura 6**), que consta de una bomba cuaternaria G1354A, un inyector manual G1328B y un detector DAD UV-Vis G1315B, con una columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m). El procesamiento de los datos se realizó con el *software Agilent ChemStation LC versión B.04.01*.

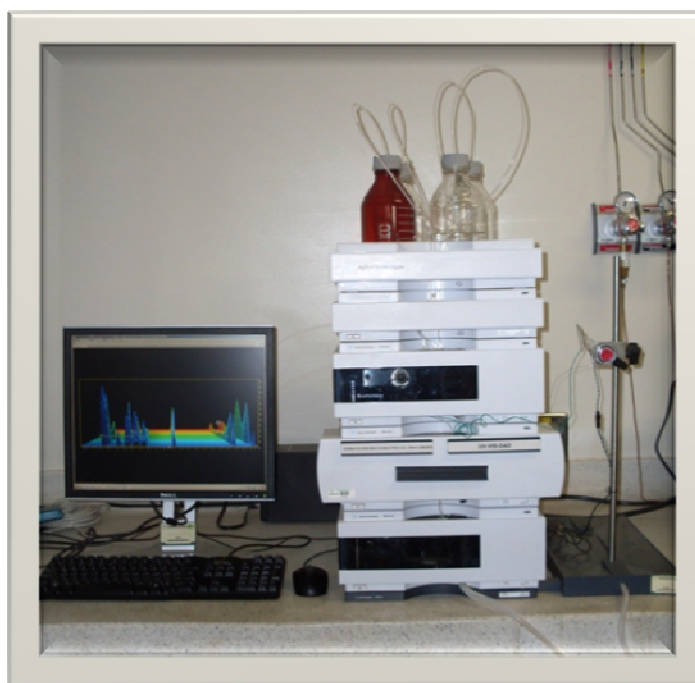


Figura 6. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*.

3.2.1.1 Implementación del método cromatográfico para el análisis simultáneo de las 8 WSV: Para el análisis de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂, se evaluaron las condiciones cromatográficas, a saber: longitud de onda y composición de la fase móvil.

- **Selección de la longitud de onda:** La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de cada una de las

WSV; para ello, se tomaron los espectros UV-Vis de cada vitamina, realizando un barrido en la región de 190 a 800 nm.

- **Selección de la fase móvil:** Debido a que las WSV presentan una naturaleza química variada, se tuvo que probar diferentes mezclas de solventes, a saber: Metanol: ácido trifluoroacético (TFA) (diferentes concentraciones y pH), acetonitrilo: TFA (diferentes concentraciones y pH), metanol: *buffer* de fosfato (diferentes concentraciones y pH), acetonitrilo: *buffer* de fosfato (diferentes concentraciones y pH). Todas las mezclas anteriores se analizaron a diferentes temperaturas (15, 20, 30, 35°C), flujos (0,5, 0,7, 0,8, 1 mL/min) y volúmenes de inyección (5, 10, 20 µL); los análisis se realizaron en modo de elución isocrático o con gradiente [6, 7, 9, 10, 23, 55, 76].

3.2.1.2 Determinación de los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de las 8 WSV. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de las 8 WSV evaluadas, se calcularon: el factor de retención (k'), el factor de selectividad (α), el número de platos teóricos (N) y la resolución (R_s) de los picos cromatográficos [57-60]. Estos parámetros se calcularon con base en las **Ecuaciones 1- 4.**

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$\alpha = \frac{(t_{RA} - t_M)}{(t_{RB} - t_M)} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$$R_S = 1,18 \left(\frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_{0,5B} + W_{0,5A}} \right) \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención de la vitamina de interés (min);

t_M = Tiempo muerto (min);

$W_{0,5}$ = Ancho del pico a la mitad de su altura máxima (min);

*Los subíndices A y B indican los picos correspondientes a dos vitaminas que eluyen seguidamente.

3.2.1.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para el análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis. Se determinaron las figuras de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad), nivel mínimo de detección (NMD), nivel mínimo de cuantificación (NMC), rango dinámico lineal (RDL), sensibilidad, según lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH). Para la determinación de estos parámetros, se obtuvieron curvas de calibración por el método de estándar externo.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas.** La repetibilidad del método se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV) (**Ecuación 5**) de los t_R y de las áreas de cada una de las vitaminas analizadas, para un punto dado de la curva de calibración.

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{S} * 100 \quad \text{Ecuación 5.}$$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots X_n}{n} \quad \text{Ecuación 6.}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

Ecuación 7.

Donde,

\bar{X} = promedio de los datos;

X_i = datos

n = número de datos

S = desviación estándar de los datos.

- Exactitud del método.** La exactitud se evaluó como el porcentaje de recuperación de las WSV analizadas. Según lo reportado en la literatura [10, 23], la variable determinante en el proceso de extracción de las WSV es el pH. Por lo tanto, se escogieron 3 condiciones diferentes de pH (3, 4, 5), se realizó la preparación de la muestra y se determinó a cuál pH se obtuvo el porcentaje de recuperación más alto. Se realizaron 3 réplicas por cada experimento. Los ensayos se realizaron enriqueciendo blancos de matriz. Estos blancos se obtuvieron tomando una alícuota de leche y diluyéndola hasta lograr que en el extracto acuoso, las cantidades de las WSV estuvieran por debajo del NMD del método.
- Evaluación de la reproducibilidad del método.** La reproducibilidad fue evaluada en términos del CV (**Ecuación 5**) representado en los t_R y las áreas de cada una de las WSV analizadas.
- Evaluación del rango dinámico lineal (RDL) y la sensibilidad del método.** El RDL y la sensibilidad del método se calcularon empleando la curva de calibración realizada en el rango de 1 a 64 ppm (soluciones *stock* de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ppm). El RDL se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el coeficiente de correlación de la curva de calibración. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

- **Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC).** Con la mínima señal analítica distinguible, y_L , que pueda ser medida y no corresponda a una fluctuación estadística de la señal del blanco, se puede determinar el NMD, que se define así:

$$y_L = \overline{y_B} + kS_B \quad \text{Ecuación 8.}$$

Donde,

$\overline{y_B}$ = Es el promedio de las medidas del blanco;

S_B = La desviación estándar del blanco;

k = es un valor que se obtiene de acuerdo con el nivel de confianza que se escoja, generalmente 3.

Entonces el NMD es una función de y_L :

$$NMD = \frac{(y_L - \overline{y_B})}{m} \quad \text{Ecuación 9.}$$

Donde m es la pendiente de la recta. Sustituyendo la ecuación (8) en la (9) se obtiene que:

$$NMD = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 10.}$$

Por lo tanto el límite de detección puede encontrarse dividiendo kS_B por la pendiente obtenida por regresión lineal de la curva de calibración. El nivel mínimo de cuantificación (NMC) se definió para un valor de $k=10$ como [77, 78]:

$$NMC = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 11.}$$

3.2.2 Implementación de la metodología de análisis de la VC (AA) por HPLC/DAD UV-Vis. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido *Series 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.)* (**Figura 6**), que consta de una bomba cuaternaria G1354A, un inyector

manual G1328B y un detector DAD UV-Vis G1315B, con una columna apolar ZORBAX 300SB-C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m). El procesamiento de los datos se realizó a través del *software Agilent ChemStation LC versión B.04.01*.

- **Implementación de la reacción de reducción de DHAA a AA.** Como el contenido de VC se determinó como la cantidad de AA presente en una muestra y éste compuesto debido a la influencia del medio, sufre una reacción de oxidación, un porcentaje de éste se transforma al DHAA. Como consecuencia de lo anterior se tuvo que implementar una reacción de reducción para reconvertir el DHAA al AA. Este procedimiento se realizó según la metodología descrita por la norma española UNE-EN 14130, la cual establece el uso de la L-cisteína como agente reductor [79].

3.2.2.1 Implementación del método cromatográfico para el análisis de la VC: Para el análisis de VC se evaluaron las condiciones cromatográficas, a saber: longitud de onda y composición de la fase móvil.

- **Selección de la longitud de onda:** La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de la VC; para ello, se tomó el espectro UV-Vis de la vitamina, realizando un barrido en la región de 190 a 800 nm.
- **Selección de la fase móvil:** Como la Norma UNE-EN 14130 establece la utilización de la L-cisteína como agente para llevar a cabo la reducción del DHHA, se presentó un problema de coelución entre el agente reductor y el AA, por lo tanto, para separar estos compuestos se probaron diferentes mezclas de solventes, entre las cuales tenemos: Metanol: agua a diferentes pH, Acetonitrilo: TFA a diferentes concentraciones y pH, Metanol: *Buffer* de fosfato a diferentes concentraciones y pH. Todas las mezclas anteriores se evaluaron a diferentes temperaturas (20, 25, 30°C), flujos (0,3,

0,5, 0,7, 1 mL/min) y volúmenes de inyección de (5, 10, 20 μ L) y se realizaron en modo de elución isocrático o con gradiente [70-75].

3.2.2.2 Determinación de los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de la vitamina C. Una vez establecidos las condiciones cromatográficas para la determinación de la VC, se determinaron los mismos parámetros de eficiencia establecidos en la **Sección 3.2.1.2**.

3.2.2.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para el análisis de la vitamina C por HPLC/DAD UV-Vis. La determinación de las figuras de mérito para el análisis de VC se realizó de la misma manera, que para el análisis simultáneo de las 8 WSV (**Sección 3.2.1.3**), excepto para la exactitud del método donde se evaluó el porcentaje de recuperación de la VC según el procedimiento descrito en la Norma UNE-EN 14130 [79] para la preparación de la muestra.

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS WSV EN LAS MUESTRAS POR HPLC/DAD UV-Vis.

3.3.1 Determinación de las 8 WSV en las muestras. Se realizó la identificación y cuantificación por HPLC/DAD UV-VIS de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂ en una muestra de leche semidescremada ultrapasteurizada, enriquecida con vitaminas, de leche deslactosada semidescremada ultrapasteurizada, de leche en polvo (para niños), adquiridas en el mercado local y de leche materna.

3.3.1.1 Identificación: Se realizó comparando los t_R y los espectros ultravioleta de los picos cromatográficos correspondientes a cada una de las WSV de referencia, con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de las muestras, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

3.3.1.2 Cuantificación: Para la cuantificación de cada una de las WSV, se empleó el método de estandarización externa. Para ello, se prepararon soluciones patrón de las WSV en diferentes concentraciones (**Tabla 9**) y se obtuvo la curva de calibración para cada vitamina. Usando esta curva, se interpolaron las concentraciones del analito de interés presente en las muestras.

Tabla 9. Preparación de las soluciones patrón de las WSV en diferentes concentraciones.

Volumen (μL) de la solución <i>stock</i> de 100 $\mu\text{g/mL}$	Concentración de las soluciones patrón ($\mu\text{g/mL}$)
10	1
20	2
40	4
80	8
160	16
320	32
640	64

3.3.2 Determinación de la vitamina C en las muestras. Se realizó la identificación y cuantificación por HPLC/DAD UV-VIS de la VC en una muestra de leche semidescremada ultrapasteurizada enriquecida con 11 vitaminas, de jugo de naranja y de un suplemento de VC adquiridos en el mercado local. La identificación y cuantificación de la VC se llevó a cabo según lo establecido en la **Sección 3.3.1.1** y **3.3.1.2** respectivamente.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS 8 WSV POR HPLC/DAD UV-VIS.

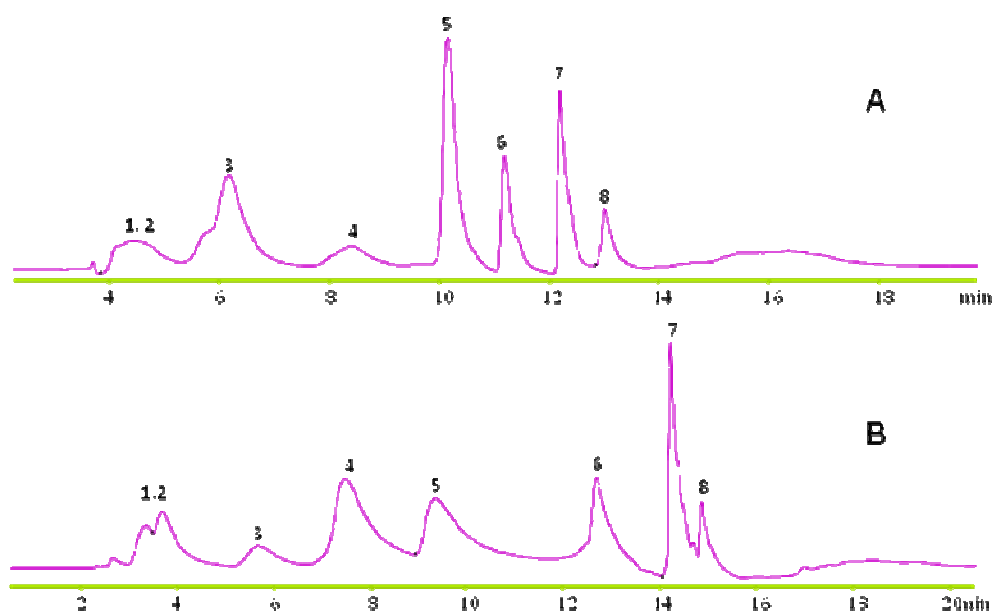
4.1.1. Método cromatográfico para el análisis simultáneo de las 8 WSV.

Para el análisis de las 8 WSV se realizaron varias pruebas preliminares, que permitieron seleccionar la longitud de onda de trabajo y la composición de la fase móvil.

- **Selección de la longitud de onda:** En el espectro UV-Vis tomado en el rango de 190 a 800 nm de cada una de las vitaminas, se observaron las longitudes de máxima absorción (**Anexo 1**) y se seleccionaron 4 longitudes de onda para realizar el análisis simultáneo de las 8 WSV (**Tabla 10**)

Selección de la fase móvil: Teniendo en cuenta las propiedades químicas de las WSV y con base en lo reportado en la literatura, se probaron diferentes mezclas de solventes, a saber: Metanol: TFA (diferentes concentraciones y pH), acetonitrilo: TFA (diferentes concentraciones y pH), metanol: *buffer* de fosfato (diferentes concentraciones y pH), acetonitrilo: *buffer* de fosfato (diferentes concentraciones y pH) [3, 7, 9, 10, 11, 23, 53, 76]. Los mejores resultados se presentan a continuación:

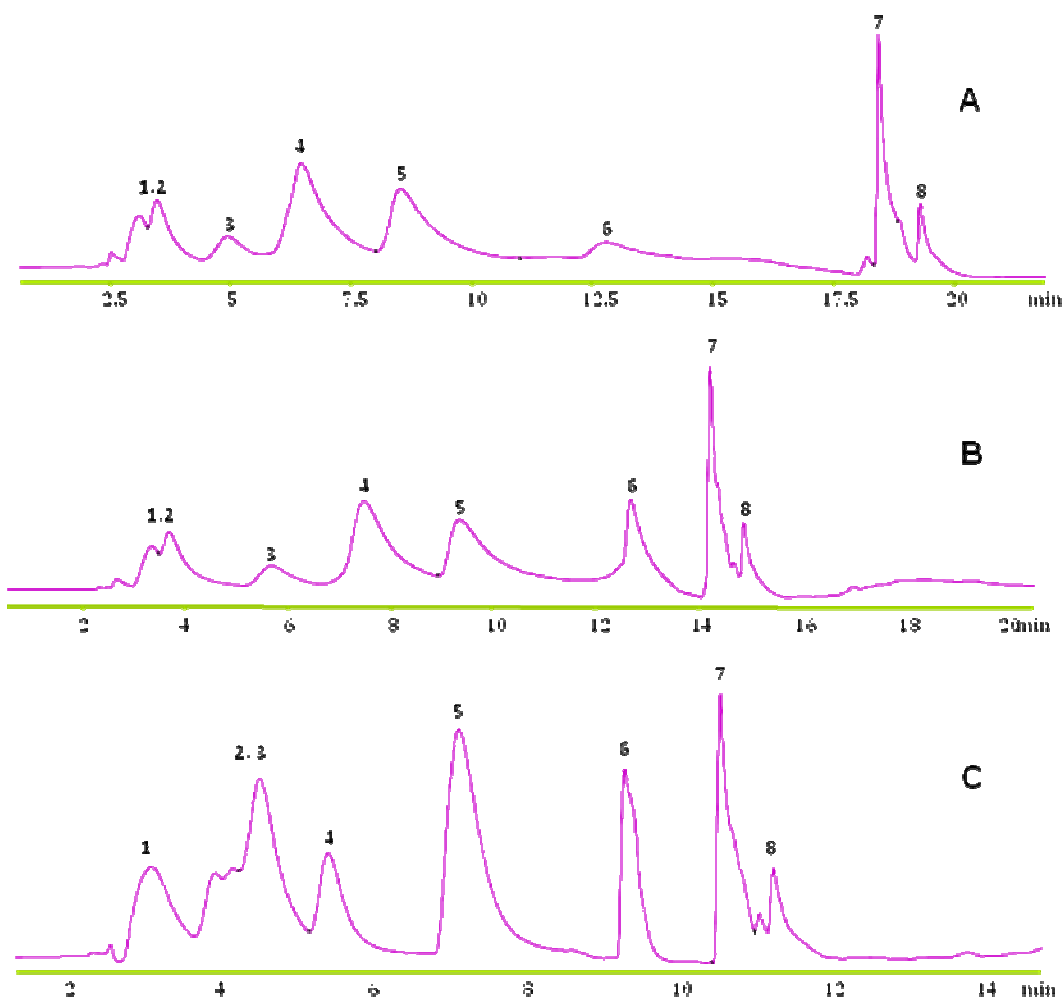
En primer lugar, se evaluaron diferentes concentraciones de TFA (0,001 y 0,005%) a pH 4. Se observó que al aumentar la concentración del TFA se presenta una mejor resolución entre los picos 1,2 (**Figura 7**).



Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. 0,001% TFA. B. 0,005% TFA. Flujo: 0,7 mL/min, temperatura 20°C, gradiente de elución: 0-4 min (100:0) TFA: metanol, 4-10 min (98:2), 10-20 min (98:2), 20-25 min (100:0). 1. VB₁, 2. VB₃₋₁, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 5. VB₅, 6. VB₁₂, 7. VB₉, 8. VB₂.

Figura 7. Variación de la concentración del TFA en la fase móvil para la separación de las WSV.

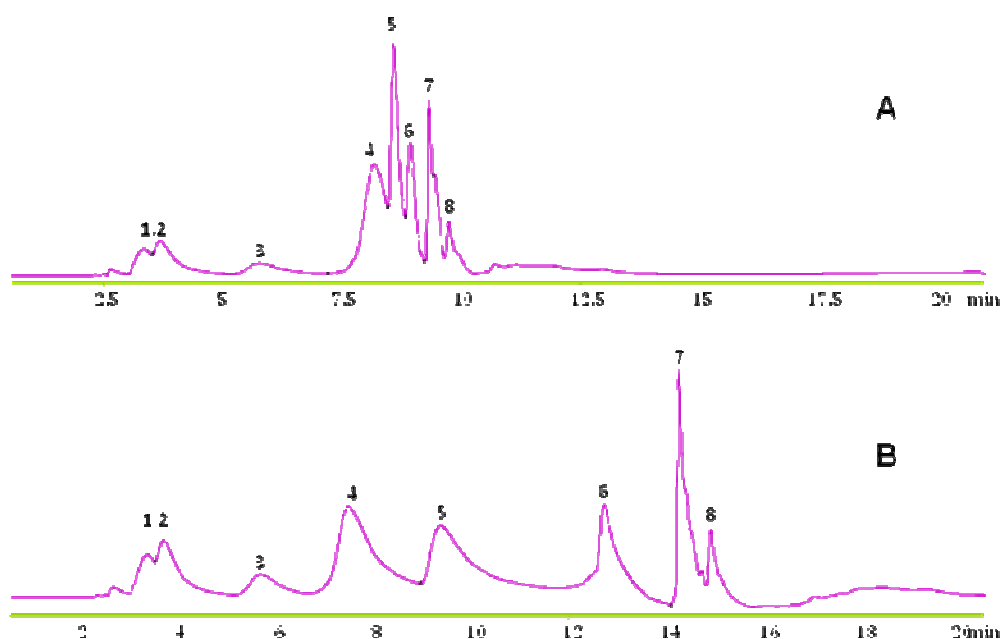
Posteriormente, se fijó la concentración de TFA a 0,005% y se probaron diferentes valores de pH (3, 4 y 5). Con el incremento del pH, se observó una disminución de los tiempos de análisis (**Figura 8**).



Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. pH=3, B. pH=4, C. pH=5. Flujo: 0,7 mL/min, temperatura 20°C, gradiente de elución: 0-4 min (100:0) 0,005% TFA: metanol, 4-10 min (98:2), 10-20 min (98:2), 20-25 min (100:0). 1. VB₁, 2. VB₃₋₁, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 5. VB₅, 6. VB₁₂, 7. VB₉, 8. VB₂.

Figura 8. Variación del pH del TFA en la fase móvil para la separación de las WSV.

Una vez establecidas la concentración y el pH del TFA, y con el propósito de reducir los tiempos de análisis, se evaluó el uso de un modificador orgánico (acetonitrilo) con mayor fuerza de elución que el metanol. Aunque, se lograron menores tiempos de análisis, la resolución disminuyó drásticamente (**Figura 9**).

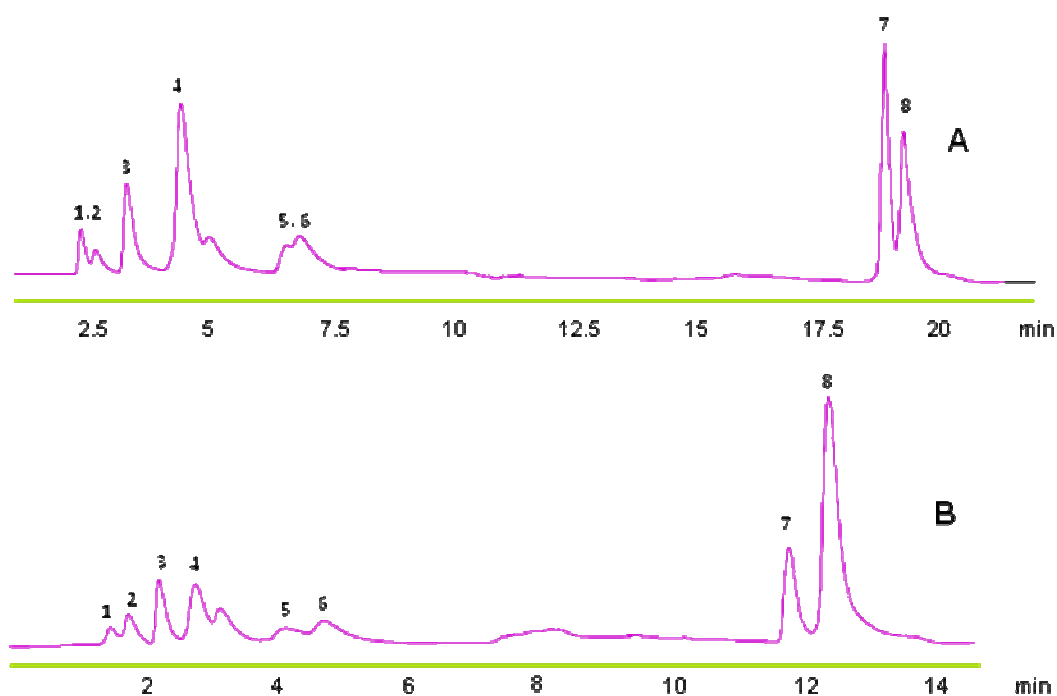


Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. Acetonitrilo, B. Metanol. Flujo: 0,7 mL/min, temperatura 20°C, gradiente de elución: 0-4 min (100:0) 0,005% TFA: modificador orgánico, 4-10 min (98:2), 10-20 min (98:2), 20-25 min (100:0). 1. VB₁, 2. VB₃₋₁, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 5. VB₅, 6. VB₁₂, 7. VB₉, 8. VB₂.

Figura 9. Variación del modificador orgánico en la fase móvil para la separación de las WSV.

Después de realizar las pruebas respectivas con TFA y no encontrar un resultado satisfactorio (baja resolución y asimetría en los picos cromatográficos), se realizaron pruebas usando *buffer* de fosfato con los modificadores orgánicos mencionados anteriormente.

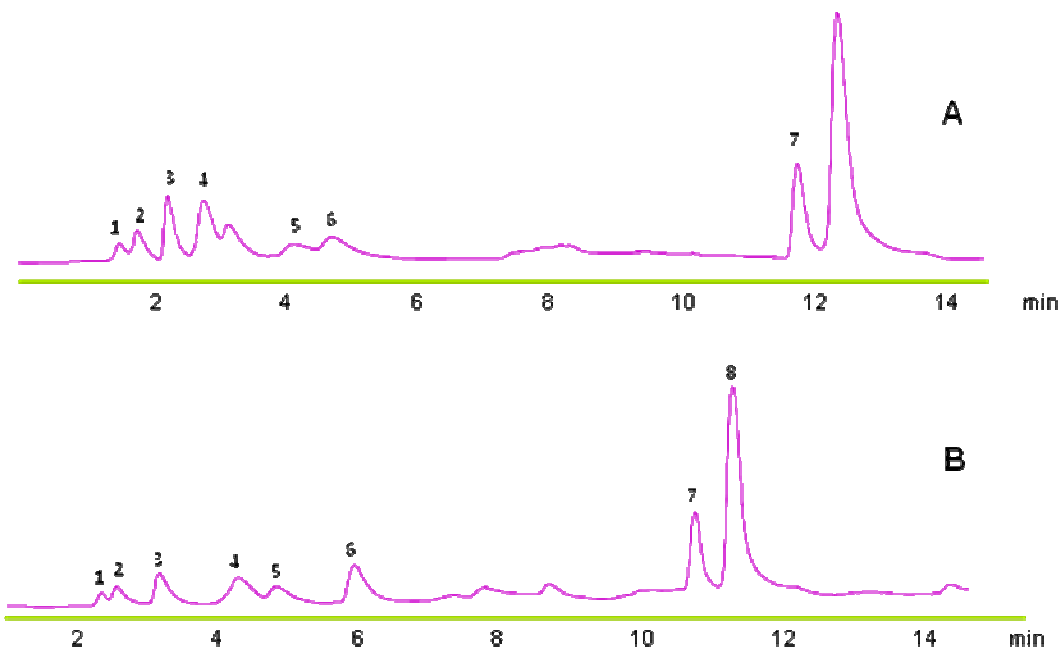
En lo reportado en la literatura para el análisis de las WSV con *buffer*, el solvente orgánico más utilizado es el acetonitrilo. De igual manera que con el TFA, se evaluaron dos concentraciones de *buffer* de fosfato a pH 6. Se observó que con el *buffer* de fosfato de 50 mM, se mejoró la resolución de los picos 1, 2 y 5, 6 y se disminuyó el tiempo de análisis (**Figura 10**).



Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. 20 mM *buffer*, B. 50 mM *buffer*. Flujo: 1 mL/min, temperatura 35°C, gradiente de elución: 0-5 min (99:1) *buffer* de fosfato: acetonitrilo, 5-20 min (70:30), 20-25 min (70:30), 25-35 min (99:1). 1. VB₃₋₁, 2. VB₅, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 5. VB₁, 6. VB₉, 7. VB₁₂, 8. VB₂.

Figura 10. Variación de la concentración del *buffer* en la fase móvil para la separación de las WSV.

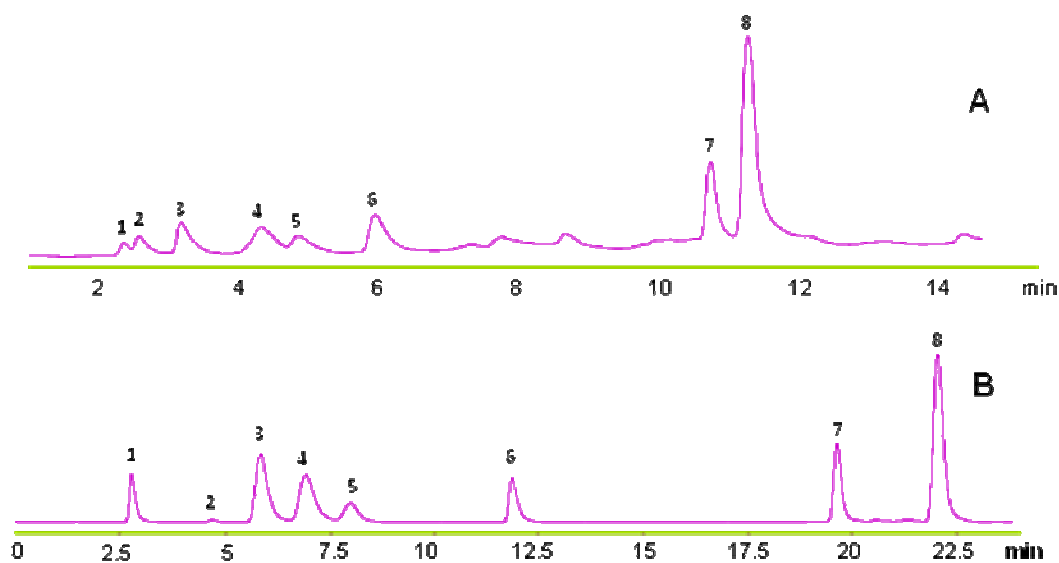
Otro parámetro importante en la separación de las WSV fue el pH. Empleando *buffer* de fosfato 50 mM y el mismo gradiente de elución, se evaluaron dos pH diferentes (pH= 6 y 7). En la **figura 11**, se observó que al incrementar el pH, aumentó la resolución y disminuyeron los tiempos de retención de las WSV.



Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. pH= 6, B. pH= 7. Flujo: 1 mL/min, temperatura 35°C, y gradiente de elución: 0-5 min (99:1) 50 mM *buffer* de fosfato: acetonitrilo, 5-20 min (70:30), 20-25 min (70:30), 25-35 min (99:1).

Figura 11. Variación del pH del *buffer* en la fase móvil para la separación de las WSV.

Con el objetivo de mejorar la resolución de los picos cromatográficos, se cambió el modificador orgánico por metanol, para evaluar el efecto de éste en la separación de las WSV (**Figura 12**). Como resultado se obtuvo una mayor resolución pero se aumentaron los tiempos de análisis.



Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a 220 nm, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. A. Acetonitrilo, B. Metanol. Flujo: 1 mL/min, temperatura 35°C, y gradiente de elución: 0-5 min (99:1) 50 mM *buffer* de fosfato: modificador orgánico, 5-20 min (70:30), 20-25 min (70:30), 25-35 min (99:1).

Figura 12. Variación del modificador orgánico en la fase móvil para la separación de las WSV.

Una vez analizados los resultados de las pruebas, se seleccionó la fase móvil de 50 mM *buffer* de fosfato (ajustado a pH=7 con ácido ortofosfórico) y metanol, con el siguiente gradiente: de 0 a 5 min 99:1 (*buffer*:metanol), de 5 a 20 min se llevó hasta 70:30 (*buffer*:metanol), de 20 a 25 min se mantuvo 70:30 (*buffer*:metanol) y de 25 a 35 min se retornó a 99:1 (*buffer*:metanol). Con esta fase móvil a un flujo de 1 mL/min y una columna de C-18 a 35°C, se determinó la resolución más alta de las 8 WSV. En la **Tabla 11** se muestran los parámetros cromatográficos para el análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/ DAD UV-Vis.

Tabla 10. Selección de la longitud de onda de absorción para las 8 WSV analizadas.

Vitamina	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Longitud de onda establecida (nm)
VB ₃₋₁	210	
VB ₅	210	210
VB ₁₂	210	
VB ₆	224	
VB ₃₋₂	215	220
VB ₁	230	
VB ₂	268	268
VB ₉	282	282

Tabla 11. Parámetros cromatográficos establecidos para el análisis de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.

Parámetro	Especificaciones
Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)
Fase móvil	50 mM <i>buffer</i> de fosfato (pH=7):metanol
Modo de elución	Gradiente: 0 a 5 min 99:1 (<i>buffer</i> : metanol), de 5 a 20 min llevar hasta 70:30 (<i>buffer</i> : metanol), de 20 a 25 min mantener 70:30 (<i>buffer</i> : metanol) y de 25 a 35 min regresar a 99:1 (<i>buffer</i> : metanol).
Flujo	1 mL/min
Temperatura	35°C
Volumen de inyección	20 µL

En la **Figura 13** se muestra un perfil cromatográfico de la mezcla del MRC de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉ y VB₁₂, a 4 longitudes de onda

establecidas y obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 11**.

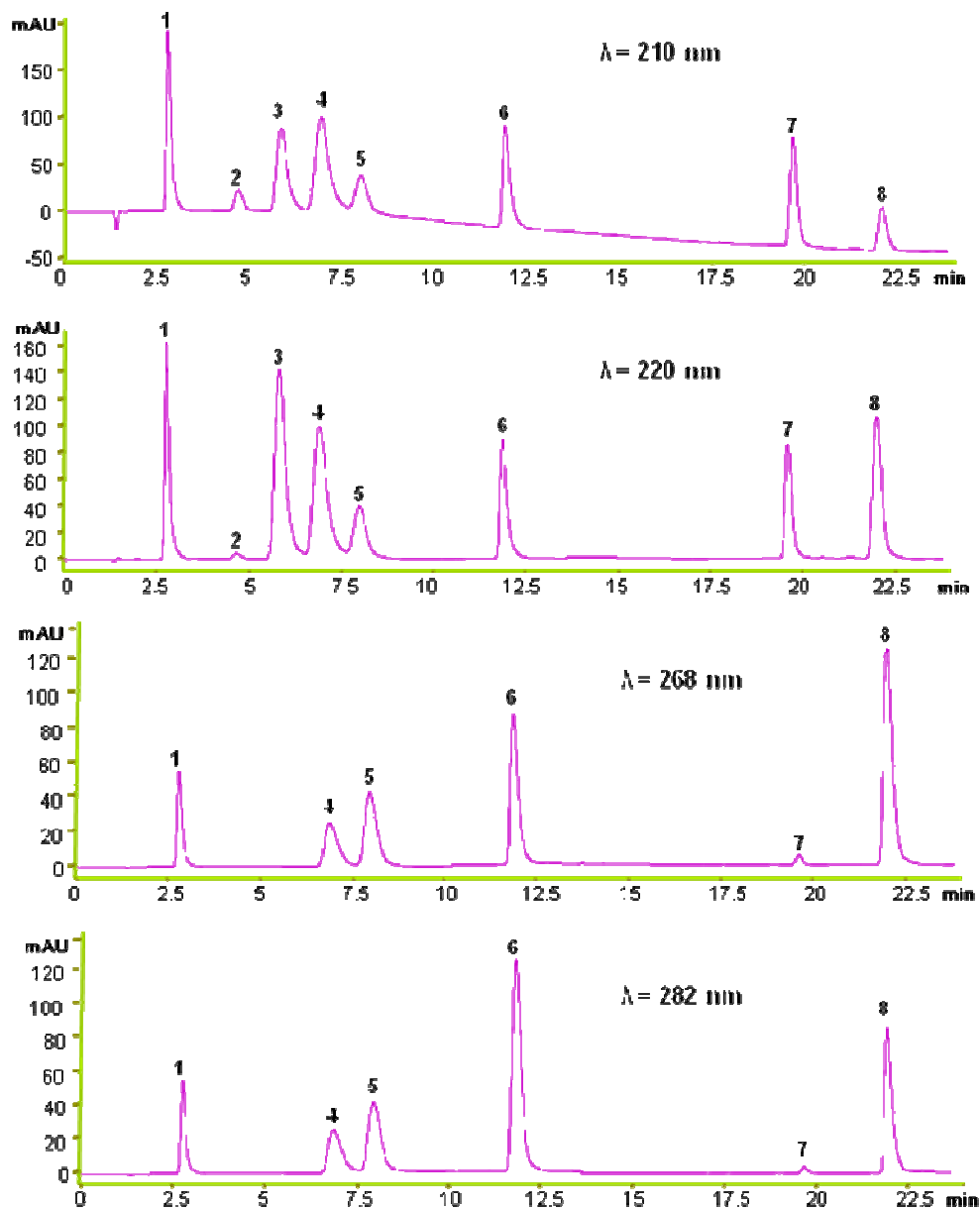


Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de la mezcla de las 8 WSV, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis, a diferentes longitudes de onda, λ , en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. 1. VB₃₋₁, 2. VB₅, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 5. VB₁, 6. VB₉, 7. VB₁₂, 8. VB₂.

Una vez determinada la metodología de trabajo, se inyectó cada una de las WSV, para determinar su tiempo de retención (**Tabla 12**).

Tabla 12. Tiempos de retención de las vitaminas hidrosolubles analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	$t_R, \text{min} \pm S (n = 3)$
1. VB ₃₋₁	2,758 ± 0,005
2. VB ₅	4,70 ± 0,01
3. VB ₆	5,88 ± 0,01
4. VB ₃₋₂	7,00 ± 0,01
5. VB ₁	7,94 ± 0,02
6. VB ₉	11,83 ± 0,02
7. VB ₁₂	19,49 ± 0,04
8. VB ₂	22,01 ± 0,03

4.1.2 Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de las 8 WSV. En la **Tabla 13** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, determinados bajo las condiciones de análisis establecidas. También se observa, que los parámetros de eficiencia son aceptados y acordes con lo reportado en la literatura [57, 58, 77, 78]. Los parámetros cromatográficos seleccionados son apropiados para la separación de las WSV.

Tabla 13. Parámetros de eficiencia de la separación de las 8 WSV analizadas utilizando los parámetros cromatográficos reportados en la **Tabla 11**.

Vitamina	t_R , min	$W_{0,5}$, min	Factor de capacidad, k'	Factor de selectividad, α	Número de platos teóricos, N	Resolución, R_s
VB₃₋₁	2,748	0,099	1,05	-	4295	-
VB₅	4,71	0,15	2,52	2,39	5699	9,41
VB₆	5,88	0,19	3,39	1,35	5118	4,06
VB₃₋₂	7,01	0,22	4,24	1,25	5406	3,21
VB₁	8,04	0,21	5,01	1,18	8034	2,79
VB₉	11,93	0,26	7,91	1,58	12069	9,84
VB₁₂	19,58	0,18	13,62	1,72	63946	20,61
VB₂	22,08	0,18	15,49	1,14	83323	8,14

4.1.3 Figuras analíticas de mérito para el análisis simultáneo de las 8 WSV por HPLC/DAD UV-Vis.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas.** Al inyectar 4 veces 20 μ L de una solución de 4 ppm de las 8 WSV (punto de la curva de calibración), se determinó la repetibilidad del método.

Los resultados de la evaluación del método, que se establecieron, en cuanto a los t_R y áreas de picos cromatográficos, se reportan en las **Tablas 14 y 15**, respectivamente. Se observó, que entre mediciones, el t_R y el área, no presentaron una desviación considerable (0,005-0,04 y 0,13-2 respectivamente), entonces se puede concluir que el método implementado es preciso. Para los tiempos de retención los coeficientes de variación estuvieron entre 0,1 y 0,2% y para las áreas, entre 0,09 y 2,32 %. En ambos casos, el CV no superó el 3%, indicando que el método es repetible.

- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Después de realizar los experimentos a los diferentes pH, se estableció que a un pH=4 se obtiene la recuperación más alta de las WSV. El procedimiento para la extracción simultánea de las WSV se resume en el diagrama de flujo que aparece a continuación (**Figura 14**).

En el procedimiento de extracción de las vitaminas, se utilizó una leche enriquecida con las WSV en una concentración determinada. Los resultados obtenidos para la recuperación, a pH=4, se reportan en la **Tabla 16**.

Tabla 14. Repetibilidad de los t_R de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	t_R , min				$\langle X \rangle$ (n=4)	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
VB₃₋₁	2,761	2,760	2,751	2,761	2,758	0,005	0,2
VB₅	4,71	4,69	4,69	4,704	4,70	0,01	0,2
VB₆	5,89	5,86	5,86	5,88	5,87	0,01	0,2
VB₃₋₂	7,01	6,99	6,99	6,99	6,99	0,01	0,2
VB₁	7,95	7,92	7,96	7,94	7,94	0,02	0,2
VB₉	11,84	11,81	11,86	11,82	11,83	0,02	0,2
VB₁₂	19,47	19,54	19,48	19,47	19,49	0,04	0,2
VB₂	21,99	22,00	22,05	22,00	22,00	0,03	0,1

Tabla 15. Repetibilidad de las área de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	Área, mAU*s				<X> (n=4)	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
VB₃₋₁	180,4	179,2	179,4	178,0	180	2	1,0
VB₅	15,0	14,9	14,7	15,0	14,9	0,1	0,9
VB₆	138,9	138,7	138,9	138,7	138,7	0,1	0,1
VB₃₋₂	113,6	115,1	114,1	114,3	114,3	0,6	0,6
VB₁	48,7	49,9	49,3	49,3	49,3	0,5	1,0
VB₉	85,2	83,2	80,7	84,2	80	2	2,3
VB₁₂	79,9	81,9	81,4	80,9	81,0	0,9	1,1
VB₂	155,8	154,5	154,3	155,2	154,9	0,7	0,4

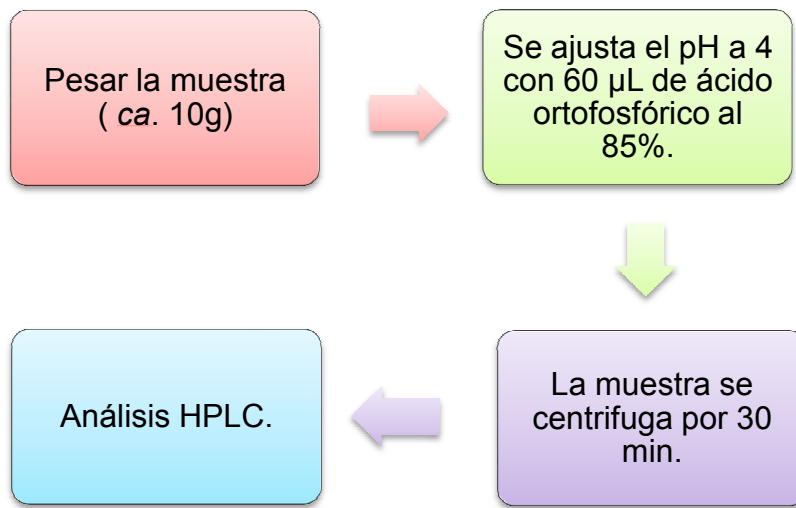


Figura 14. Procedimiento para la extracción de las 8 WSV en leche.

Como se observa en la **Tabla 16**, los porcentajes de recuperación de las WSV fueron aceptables (89,8 - 100%), excepto para la VB₉ (<60%), sin embargo, es importante resaltar, que durante este procedimiento se realizó la extracción simultánea de las WSV.

- **Evaluación del RDL y la sensibilidad del método.** Mediante la curva de calibración para cada una de las WSV (**Anexo 2**), se evaluaron el RDL y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 17**.

Tabla 16. Porcentaje de recuperación de la mezcla de WSV, que se adicionaron a un blanco de matriz.

Vitamina	Área, mAU*s		Recuperación, % ± S (n=3)
	Cantidad inicial	Cantidad recuperada	
VB ₃₋₁	965,7	867,3	89,8 ± 0,9
VB ₅	270,3	278,8	100 ± 3
VB ₆	757,9	734,1	96,9 ± 0,6
VB ₃₋₂	750,0	698,4	90 ± 1
VB ₁	454,2	446,0	98 ± 3
VB ₉	170,7	76,0	43 ± 2
VB ₁₂	497,8	464,7	93 ± 5
VB ₂	825,0	806,5	98 ± 1

El RDL del método fue evaluado para el rango de concentraciones entre 1 – 64 ppm, en el cual se observó buena linealidad (coeficientes de determinación $R^2= 0,9999$), lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Las pendientes de la curva de calibración ($b= 12,40 - 45,57$) muestran una buena sensibilidad del método (excepto para VB₅) y sus desviaciones estándar (0,04 -0,1), confirman la precisión alta de las curvas de calibración. Por consiguiente, se puede concluir que el método es aplicable dentro del nivel de concentraciones examinadas.

- **Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC).** Para la determinación del NMD y NMC se siguieron los criterios descritos en la **Sección 3.2.1.3**. En la **Tabla 18** se observan los NMD y NMC para cada una de las WSV estudiadas.

Tabla 17. Ecuación de la curva de calibración; coeficiente de correlación lineal, pendiente y su desviación estándar, obtenidos en la determinación simultánea de las vitaminas hidrosolubles, a partir de la curva de calibración (1– 64 ppm), obtenida por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	Ecuación	R ²	b	S _b	b ± t S _b
VB₃₋₁	y = 45,57x-10,716	0,9999	45,6	0,2	45,6 ± 0,5
VB₅	y = 3,63x-0,0264	0,9999	3,63	0,06	3,6 ± 0,15
VB₆	y = 35,26x-2,733	0,9999	35,25	0,09	35,3 ± 0,23
VB₃₋₂	y = 29,9x-6,494	0,9999	29,9	0,1	29,9 ± 0,3
VB₁	y = 12,40x-2,410	0,9999	12,40	0,04	12,4 ± 0,10
VB₉	y = 19,53x+1,830	0,9999	19,52	0,04	19,5 ± 0,10
VB₁₂	y = 21,13x-4,804	0,9999	21,13	0,09	21,1 ± 0,23
VB₂	y = 37,33x+0,827	0,9999	37,33	0,09	37,3 ± 0,23

b: Pendiente, S_b: Desviación estándar de la pendiente, t: 2,57, para un nivel de confianza del 95%, R²: Coeficiente de correlación lineal.

Tabla 18. Niveles mínimos de detección y de cuantificación de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉ y VB₁₂, obtenidos por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	NMD, µg/mL	NMC, µg/mL
VB₃₋₁	0,25	0,29
VB₅	0,11	0,36
VB₆	0,13	0,27
VB₃₋₂	0,26	0,36
VB₁	0,22	0,29
VB₉	0,02	0,29
VB₁₂	0,26	0,35
VB₂	0,01	0,10

- **Determinación de la reproducibilidad de t_R y áreas.** Para evaluar la reproducibilidad del método de extracción, se realizó un análisis por triplicado de una muestra de leche enriquecida con una mezcla de las 8 WSV. A cada réplica, se le realizaron la extracción y el análisis cromatográfico. Los resultados obtenidos para t_R y áreas se muestran en las **Tablas 19 y 20**.

Los coeficientes de variación para las áreas cromatográficas estuvieron entre 0,09-2,02% y para los t_R no superaron el 0,7%. Estos valores son aceptados por las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por consiguiente, muestran que el método es altamente reproducible.

4.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VC (AA) POR HPLC/DAD UV-VIS.

4.2.1 Método cromatográfico para el análisis de VC. Para el análisis de la VC se realizaron varias pruebas preliminares, que permitieron seleccionar la longitud de onda de trabajo, λ , y la composición de la fase móvil.

- **Selección de la longitud de onda:** En el espectro UV-Vis tomado en el rango de $\lambda = 190$ a 800 nm de VC, se observó que la longitud de onda de máxima absorción correspondió a 245 nm, por tanto, ésta se seleccionó para realizar todos los análisis (**Anexo 1**).
- **Selección de la fase móvil:** Después de evaluar las diferentes mezclas de solventes, descritas en la **Sección 3.2.2.1**, se seleccionó la fase móvil de $0,1\%$ TFA, con elución isocrática. Usando esta fase móvil, a un flujo de $0,5$ mL/min, y una columna de C-18 a 25°C , se logró detectar y cuantificar la VC. En la **Tabla 21**, se muestran los parámetros cromatográficos para el análisis de la VC por HPLC/ DAD UV-Vis.

Tabla 19. Reproducibilidad de los t_R de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	t_R , min			$\langle X \rangle$ (n=3)	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
VB₃₋₁	2,190	2,187	2,194	2,190	0,004	0,16
VB₅	3,469	4,479	3,479	3,476	0,006	0,17
VB₆	4,242	4,252	4,259	4,251	0,009	0,20
VB₃₋₂	5,011	5,021	5,013	5,015	0,005	0,11
VB₁	5,857	5,919	5,908	5,90	0,03	0,56
VB₉	10,475	10,530	10,388	10,46	0,07	0,68
VB₁₂	18,647	18,648	18,648	18,6485	0,0013	0,003
VB₂	20,532	20,530	20,527	20,530	0,003	0,01

Tabla 20. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de las 8 WSV analizadas por HPLC/DAD UV-Vis.

Vitamina	Área, mAU*s			<X> (n=3)	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
VB₃₋₁	867,9	866,6	868,6	867,6	0,9	0,10
VB₅	275	282	280	280	3	1,12
VB₆	734,0	734,3	735,2	734,5	0,6	0,09
VB₃₋₂	697	670	699	700	1	0,17
VB₁	449	443	446	450	3	0,68
VB₉	72	74	74	73	2	2,02
VB₁₂	460	470	468	470	5	1,18
VB₂	808	805	807	810	1	0,17

Tabla 21. Parámetros cromatográficos establecidos para el análisis de vitamina C por HPLC/DAD UV-Vis.

Parámetro	Especificaciones
Columna	ZORBAX 300SB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 3,5 μ m)
Fase móvil	0,1% TFA
Modo de elución	Isocrático
Flujo	0,5 mL/min
Temperatura	25°C
Volumen de inyección	20 μ L

A continuación, en la **Figura 15** se muestra un perfil cromatográfico del MRC de VC (AA), a una longitud de onda de 245 nm y obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 21**.

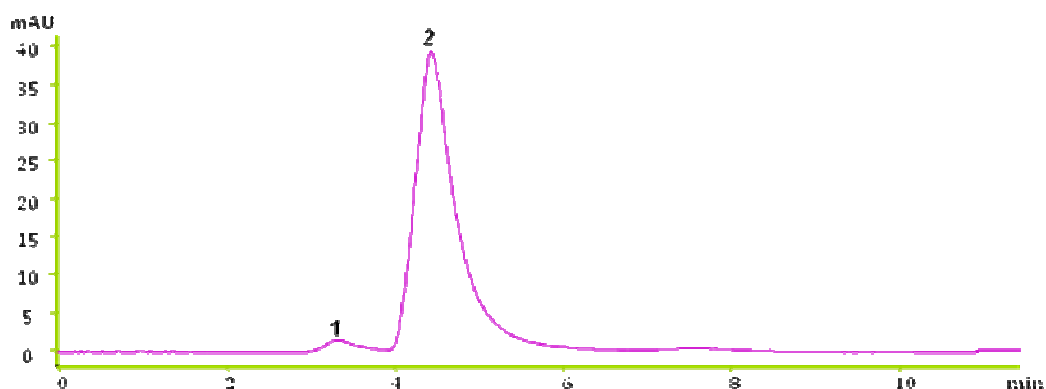


Figura 15. Perfil cromatográfico típico de la VC obtenido por HPLC/DAD UV-Vis, a una longitud de onda de 245 nm, en una columna apolar ZORBAX 300SB-C18, bajo los parámetros cromatográficos establecidos (**Tabla 21**). 1. L-Cisteína, 2. VC.

El tiempo de retención [$t_R \pm S$ (n=3)] para la VC fue $4,4268 \pm 0,0008$ min.

4.2.2 Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de la VC.

En la **Tabla 22** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, determinados bajo las condiciones de análisis cromatográfico establecidas. Se observa, que los parámetros de eficiencia son aceptados según lo reportado en la literatura [57, 58, 77, 78], y adecuados para la determinación de la VC.

Tabla 22. Parámetros de eficiencia de la separación de la VC analizada utilizando los parámetros cromatográficos reportados en la **Tabla 21**.

Vitamina	t_R , min	$W_{0,5}$, min	k	α	N
VC	4,43	0,460	0,92	1,34	513

4.2.3 Figuras analíticas de mérito para el análisis de la VC, por HPLC/DAD UV-Vis.

- **Evaluación de la repetitividad del método para los tiempos de retención (t_R) y áreas cromatográficas.** Al inyectar 5 veces una solución de VC (20 μ L), se determinó la repetibilidad del método. Los resultados de la repetitividad de los t_R y áreas cromatográficas del pico, se observan en las **Tablas 23** y **24**, respectivamente.

Tabla 23. Repetitividad de los t_R de la VC, analizada por HPLC/DAD UV-Vis.

t_R , min				$\langle X \rangle$ (n=4)	S	CV, %
Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
4,4270	4,4270	4,4260	4,4270	4,4266	0,0005	0,02

Tabla 24. Repetitividad de las áreas cromatográficas de la VC, analizada por HPLC/DAD UV-Vis.

Área, mAU*s				<X> (n=4)	S	CV, %
Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
1225	1233	1223	1218	1230	6	0,51

Se observó, que las mediciones, de t_R y áreas, no presentaron una desviación estándar considerable, entonces, se puede concluir que el método implementado es preciso. Para los tiempos de retención el coeficiente de variación estuvo en 0,02% y para las áreas, en 0,51%. En ambos casos, el CV no superó el porcentaje, indicando que el método es altamente repetible.

- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Para hallar este porcentaje se realizaron la extracción y la reducción establecidas en la norma [79]. Este procedimiento se resume en el diagrama de flujo que aparece a continuación (**Figura 16.**)

Para este procedimiento, se utilizó una leche enriquecida con la VC en una concentración determinada. Los resultados del porcentaje de recuperación obtenidos para esta vitamina se reportan en la **Tabla 25.**

Tabla 25. Porcentaje de recuperación de la VC.

Área, mAU*s		Recuperación, % \pm S (n= 3)
Cantidad inicial	Cantidad recuperada	
2923	3081	110 \pm 2

Como se observa en la **Tabla 25**, el porcentaje de recuperación de la VC se encuentra dentro del rango de valores aceptados (> 60%).

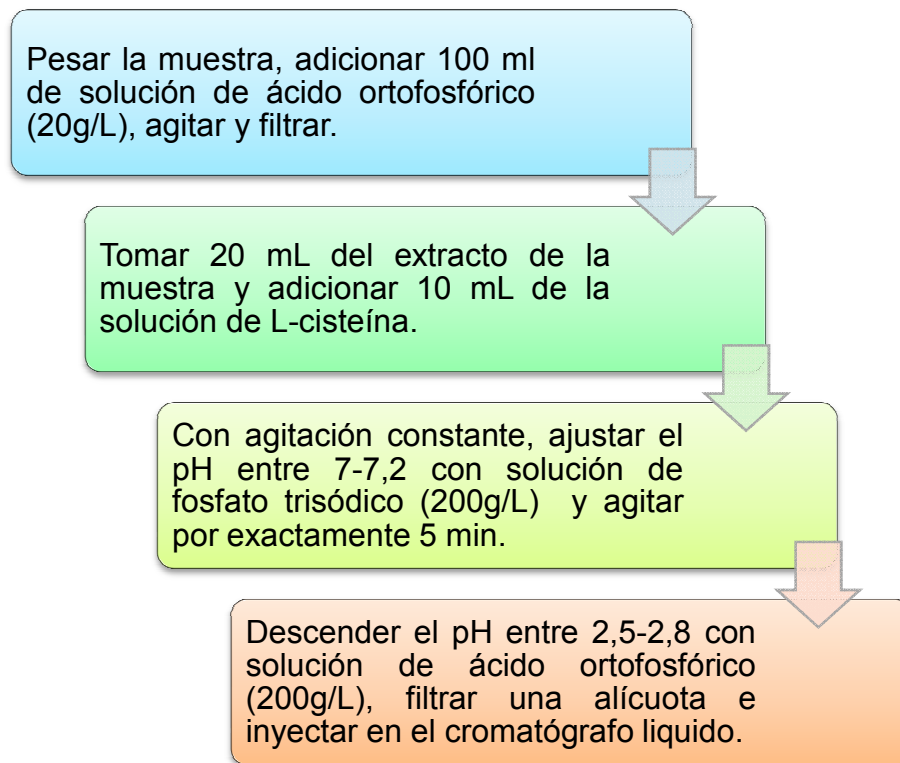


Figura 16. Procedimiento para la extracción y reducción de la VC en leche.

- **Evaluación del RDL y la sensibilidad del método.** Mediante la curva de calibración para la VC (**Anexo 2**), se evaluaron el RDL y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Ecuación de la curva de calibración: coeficiente de correlación lineal, pendiente y su desviación estándar, obtenidos en la determinación de la VC, a partir de la curva de calibración (1– 64 ppm), por HPLC/DAD UV-Vis.

Ecuación	R ²	b	S _b	b ± t S _b
y = 36x-8,317	0,9994	36	1	36 ± 3

b: Pendiente, S_b: Desviación estándar de la pendiente, t: 2,57, para un nivel de confianza del 95%, R²: Coeficiente de correlación lineal.

El RDL del método fue evaluado en el rango de 1 – 64 ppm, dentro del cual se observó buena linealidad (coeficiente de determinación R²=0,9994), lo que indica un ajuste bueno de los parámetros. La pendiente de la curva de

calibración ($b=36$) muestra una sensibilidad alta del método y su desviación estándar ($S_b=1$), la precisión de la curva de calibración alta. Por lo tanto, se puede concluir que el método es aplicable reproduciblemente y con exactitud dentro del nivel de concentraciones de la VC examinadas.

- **Determinación de los NMD y NMC para la VC.** Para calcular los NMD y NMC de esta vitamina, se empleó el método de análisis descrito en la **Sección 3.2.1.3**. Los NMD y NMC para esta vitamina fueron 0,26 y 0,31 mg/L, respectivamente.
- **Determinación de la reproducibilidad de t_R y áreas.** Para evaluar la reproducibilidad del método, se realizó un cuadruplicado de una muestra de leche enriquecida con VC. A cada réplica, se le realizaron la extracción, la reducción y el análisis cromatográfico. Los resultados obtenidos para t_R y áreas cromatográficas se muestran en las **Tablas 27 y 28**.

Tabla 27. Reproducibilidad de los t_R de la VC, analizada por HPLC/DAD UV-Vis.

t_R , min				$\langle X \rangle$ (n=4)	S	CV, %
Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
4,416	4,414	4,418	4,416	4,416	0,001	0,032

Tabla 28. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de la VC, analizada por HPLC/DAD UV-Vis.

Área, mAU*s				$\langle X \rangle$ (n=4)	S	CV, %
Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4			
3211	3250	3238	3226	3230	17	0,5

En las **Tabla 27** y **28** se observan los coeficientes de variación, que se encuentran en el rango de 0,032 - 4 % y cumplen con la Buenas Practicas de Laboratorio.

4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS WSV.

4.3.1 Extracción y cuantificación de las 8 WSV en leche. Una vez implementada y validada la metodología de extracción y análisis simultáneo de las 8 WSV, ésta se aplicó a diferentes muestras de leche reales, tales como (1) leche semidescremada ultrapasteurizada, enriquecida con vitaminas, (2) leche deslactosada semidescremada ultrapasteurizada, (3) leche en polvo (para niños), todas las muestras fueron adquiridas en el mercado local y también se realizó una muestra de (4) leche materna.

En las **Figuras 17-20**, se observan los perfiles cromatográficos de las WSV, extraídas de diferentes muestras de leche, analizadas por HPLC/DAD UV-VIS en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18. Las condiciones cromatográficas y el procedimiento de preparación de la muestra están descritos en la **Tabla 11** y en la **Figura 14**, respectivamente. En las **Tablas 29-32** se reportan las concentraciones de las WSV presentes en las muestras analizadas, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación, establecidos para cada vitamina.

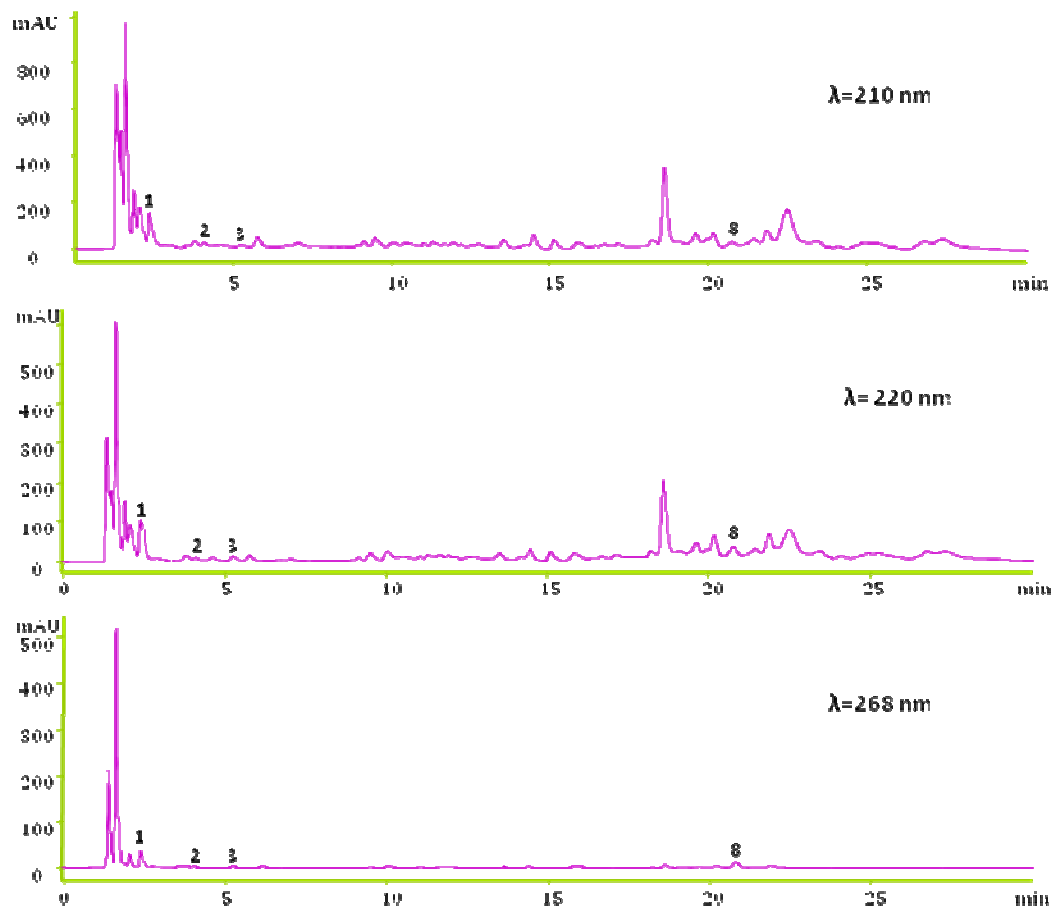


Figura 17. Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche semidescremada enriquecida con vitaminas. 1. VB₃₋₁, 2. VB₅, 3. VB₆, 8. VB₂.

Tabla 29. Concentración de vitaminas hidrosolubles ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en una muestra comercial de leche semidescremada, enriquecida con vitaminas.

Vitamina	$\mu\text{g/g}$ muestra \pm S (n=3)
1. VB ₃₋₁	26,5 \pm 0,3
2. VB ₅	10,6 \pm 0,4
3. VB ₆	3,1 \pm 0,1
4. VB ₃₋₂	< 0,26
5 VB ₁	< 0,22
6. VB ₉	< 0,02
7. VB ₁₂	< 0,26
8. VB ₂	4,2 \pm 0,1

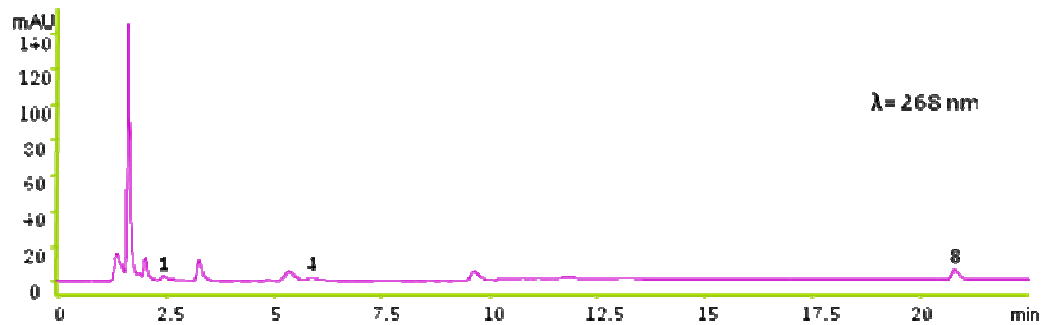
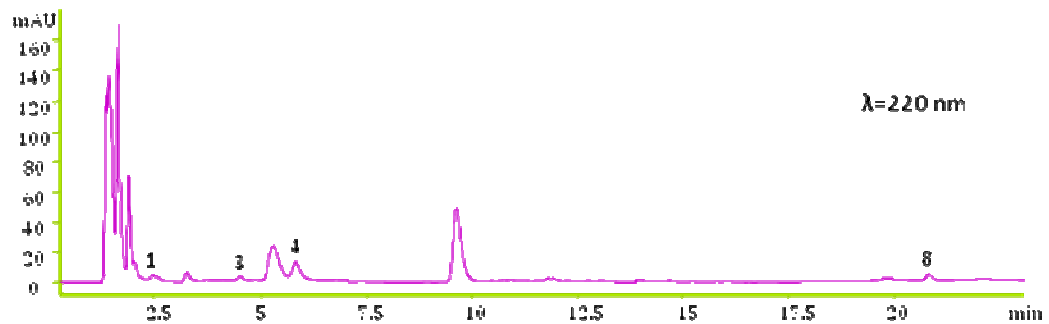
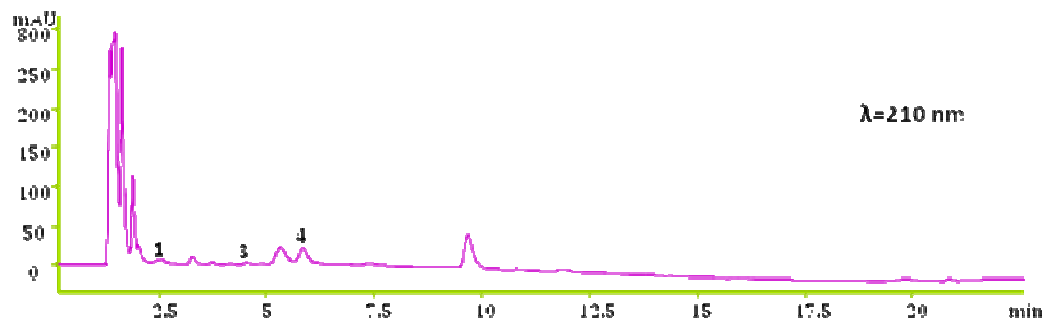


Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche en polvo (para niños). 1. VB₃₋₁, 3. VB₆, 4. VB₃₋₂, 8. VB₂.

Tabla 30. Concentración de vitaminas hidrosolubles (µg/g de muestra) en una muestra comercial de leche en polvo (para niños).

Vitamina	µg/g muestra ± S (n=3)
1. VB ₃₋₁	14,7 ± 0,3
2. VB ₅	< 1,09
3. VB ₆	97 ± 4
4. VB ₃₋₂	112 ± 2
5. VB ₁	< 2,18
6. VB ₉	< 0,20
7. VB ₁₂	< 2,58
8. VB ₂	92 ± 3

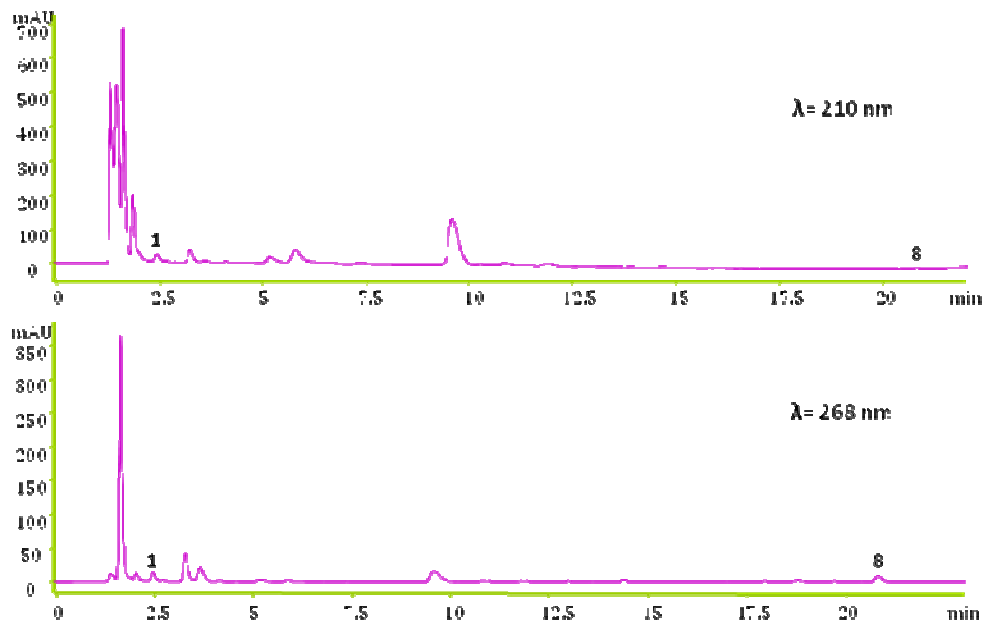


Figura 19. Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 a diferentes longitudes de onda de las WSV de leche deslactosada semidescremada ultrapasteurizada. 1. VB₃₋₁, 8. VB₂.

Tabla 31. Concentración de vitaminas hidrosolubles (µg/g de muestra) en una muestra comercial de leche semidescremada deslactosada ultrapasteurizada.

Vitamina	µg/g muestra ± S (n=3)
1. VB ₃₋₁	3,3 ± 0,1
2. VB ₅	< 0,11
3. VB ₆	< 0,13
4. VB ₃₋₂	< 0,25
5. VB ₁	< 0,22
6. VB ₉	< 0,02
7. VB ₁₂	< 0,25
8. VB ₂	2,4 ± 0,1

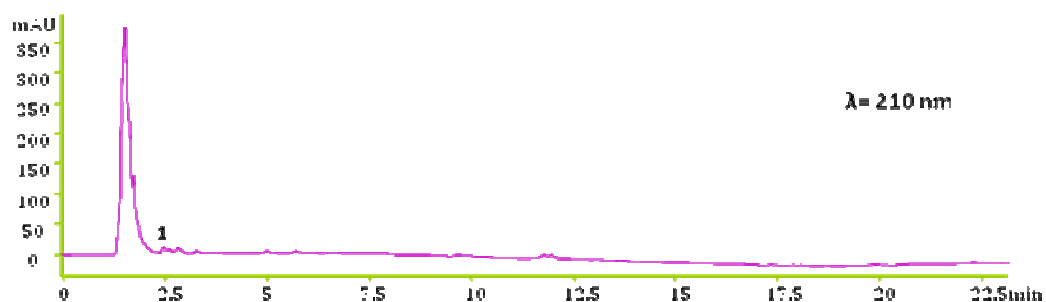


Figura 20. Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-Vis en columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 de las WSV de leche materna. 1. VB₃₋₁.

Tabla 32. Concentración de vitaminas hidrosolubles ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en leche materna.

Vitamina	$\mu\text{g/g}$ muestra \pm S (n=3)
1. VB ₃₋₁	1,3 \pm 0,1
2. VB ₅	< 0,11
3. VB ₆	< 0,13
4. VB ₃₋₂	< 0,26
5. VB ₁	< 0,22
6. VB ₉	< 0,02
7. VB ₁₂	< 0,26
8. VB ₂	< 0,01

4.3.2 Extracción y cuantificación de la VC. Después de implementar la metodología de extracción y análisis de la VC, ésta se aplicó para analizar una muestra de leche semidescremada ultrapasteurizada enriquecida con vitaminas y un jugo de naranja comercial. Infortunadamente en las muestras comerciales analizadas no se detectó la vitamina por encima de su límite de detección (**Figuras 21 y 22**), por ello, se decidió realizar su cuantificación en una matriz con un alto contenido de este analito, *i.e.*, un suplemento vitamínico (**Figura 23**). Las condiciones cromatográficas y el procedimiento de preparación de la muestra están descritos en la **Tabla 21** y en la **Figura 16**, respectivamente.

En la **Tabla 33** se reportan las concentraciones de la VC presente en las muestras analizadas, teniendo en cuenta el porcentaje de su recuperación, previamente establecido.

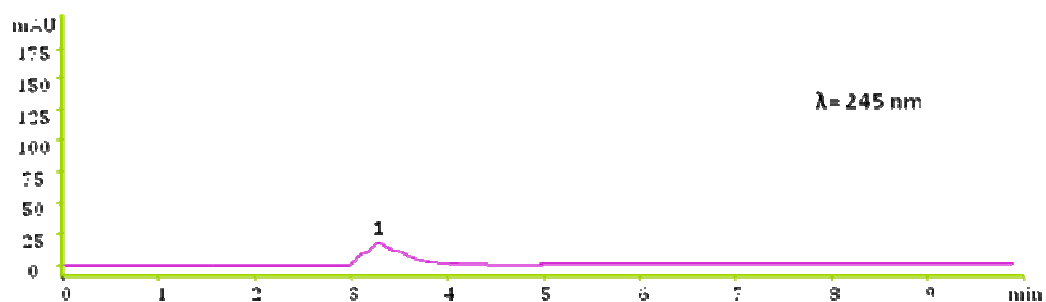


Figura 21. Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-VIS en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de leche semidescremada enriquecida con vitaminas. 1. L-Cisteína.

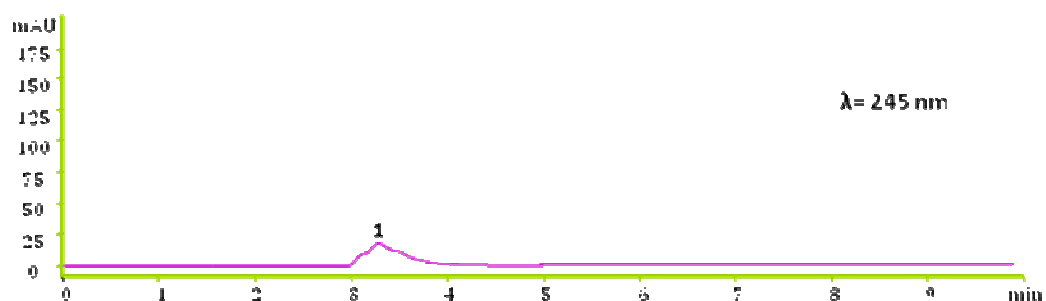


Figura 22. Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-VIS en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de un jugo de naranja comercial. 1. L-Cisteína.

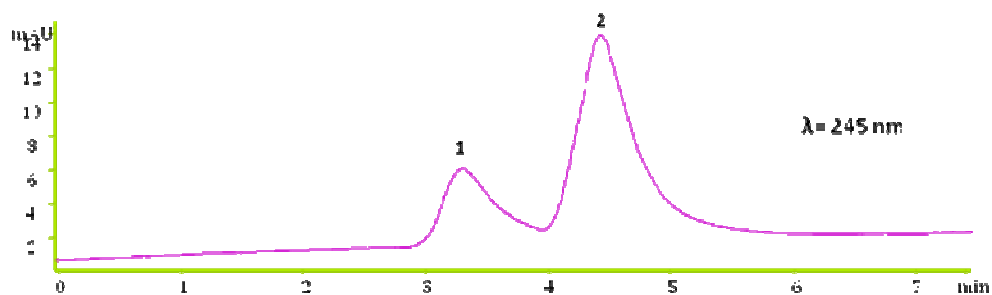


Figura 23. Perfil cromatográfico típico obtenido por HPLC/DAD UV-VIS en la columna ZORBAX 300SB-C18 de la VC de un suplemento vitamínico. 1. L-Cisteína, 2. VC.

Tabla 33. Concentraciones de la VC (mg/g de muestra) en diferentes muestras analizadas.

Muestras comerciales	mg/g muestra \pm S (n=3)
Leche semidescremada enriquecida con vitaminas	< 0,001
Jugo de naranja comercial	< 0,001
Suplemento vitamínico	874,9 \pm 0,1

5. CONCLUSIONES

- Se implementó y validó un método por HPLC/DAD UV-Vis para la determinación simultánea de las vitaminas VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉ y VB₁₂ y para la determinación de VC por reducción del DHAA para su conversión a AA con L-Cisteína como agente reductor. Los métodos implementados presentaron un coeficiente de correlación $R^2 > 0,999$; con porcentajes de recuperación entre 89 % y 110%, excepto para la VB₉ (<60%); y NMC entre 0,01 µg/g y 10 µg/g.
- El ajuste de pH empleado para precipitar las proteínas en el proceso de extracción de las muestras lácteas, mostró una variación en la recuperación de las 8 WSV. Se determinó que a pH 4 se obtuvieron los mejores resultados para la extracción simultánea de las WSV.
- El análisis de las muestras de leche comerciales, tales como leche semidescremada ultrapasteurizada enriquecida con vitaminas, leche deslactosada semidescremada ultrapasteurizada, leche en polvo (para niños), adquiridas del mercado local y de una muestra de leche materna, mostró la presencia de las vitaminas VB₃₋₁, VB₅, VB₆, VB₃₋₂ y VB₂, en un rango de 1,3 a 112 µg/g.
- En las muestras analizadas de leche semidescremada ultrapasteurizada enriquecida con vitaminas, jugo de naranja y suplemento vitamínico adquiridas en el mercado local, se determinó una concentración de $874,9 \pm 0,1$ mg/g de VC para el suplemento. El análisis de las muestras de leche semidescremada ultrapasteurizada enriquecida con vitaminas y jugo de naranja no reporta VC por encima del NMD del método empleado.

6. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que el porcentaje de recuperación de la VB₉ (43%) está por debajo de los parámetros establecidos por las Buenas Practicas de Laboratorio (>60%), se recomienda buscar otra alternativa para su extracción más eficiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. WILCHES, M.; Bioingeniería. Principios Básicos de Bioquímica. Medellín, Colombia: **1987**, 2, pp. 451-469.
2. WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E.; Principios de Bioquímica. México, D.F., México: McGraw-Hill, 2ª Ed., **1970**, pp. 1018-1960.
3. VIÑAS, P.; LÓPEZ, C.; BALSALOBRE, N.; HERNÁNDEZ, M.; Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *J. Chromatogr. A.*, **2003**, 1007, 77-84.
4. MARINÉ, A.; ALBALA, S.; VECIANA, M.; IZQUIERDO, M.; Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 778, 247-253.
5. LESZEK, M.; LEBIEDZIŃSKA, A.; CZARNOWSKI, W.; SZEFER, P.; Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B1 (thiamine), B6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B12 in animal and plant foods. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1173, 71-80.
6. MORENO, P.; SALVADO, V.; Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870, 207–215.
7. LEPORATI, A.; CATELLANI, D.; SUMAN, M.; ANDREOLI, R.; MANINI, P.; NIESSEN, W.; Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. *Anal. Chim. A*, **2005**, 531, 87-95.
8. ZAFRA-GÓMEZ, A.; GARBALLO, A.; MORALES, J.; GARCÍA, L.; Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in

- supplemented foods by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 4531-4536.
9. HEUDI, O.; KILINC, T.; FONTANNAZ, P.; Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1070, 49-56.
 10. KUBÁN, V.; KLEJDUS, B.; PETRLOVÁ, J.; POTRESIL, D.; ADAM, V.; MIKELOVÁ, R.; VACEK, J.; KIZEK, R.; Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. *Anal. Chim. A*, **2004**, 520, 57-67.
 11. LESZEK, M.; LEBIEDZINSKA, A.; CZARNOWSKI, W.; SZEFER, P.; High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *J. Chromatog. A*, **2005**, 1094, 91–98.
 12. BOLET, M.; Aspectos de la historia del descubrimiento de algunas vitaminas. *Rev Cubana Med Gen Integr.*, **2004**, 20(4). [Online]: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864. [Consultado: 18 de Agosto de 2007].
 13. LENINGHER, A.; Bioquímica. Barcelona, España: Ediciones Omega, 2^a Ed., **1995**, pp. 343-370.
 14. HURST, W.; Methods of Analysis for Functional Food and Nutraceuticals. Florida, United States of America: CRC Press, **2002**, 7.
 15. CAMPBELL, M., FARRELL, S.; Bioquímica. México, D.F., México: Internacional Thomson Editores, 4^a Ed., **2004**, pp. 693-694.
 16. RUÍZ, J.; ALDAZ, A.; DOMINGUEZ, M.; Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium. *Can. J. Chem.*, **1977**, 55, 2799-2806.

17. BENDER, D.; Nutritional Biochemistry of the Vitamins. Cambridge, United Kingdom: 2^a Ed. **2003**, pp. 172-378.
18. EITENMILLER, R.; LANDEN, W.; Vitamins Analysis for Health and Food Sciences. Florida, United States of America: CRC Press, 2^a Ed., **1999**, pp. 325-570.
19. BALL, G.; Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability. CRC Press, Taylor & Francis Group. Florida, United States of America, 2^a Ed., **2006**, pp. 149-303.
20. VANDERSLICE, J.; BROWNLEE, S.; MAIRE, C.; REYNOLDS, R.; POLANSKY, M.; Forms of vitamin B₆ in human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1983**, 37, 867-871.
21. ZEMPLINI, J.; RUCKER, J.; McCORMICK, D.; SUTTIE, J.; Handbook of Vitamins. Florida, United States of America: CRC Press, Taylor & Francis Group, 4^a Ed., **2007**, pp. 191-489.
22. LATHAM, M.; Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia, **2002**, 29, pp. 119-130.
23. JEDLICKA, A.; KLIMES, J.; Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Different Matrices Using High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Papers*, **2005**, 59(3), 202-222.
24. ROSE-SALLIN, C.; BLAKE, C.; GENOUD, D.; TAGLIAFERRI, E.; Comparison of microbiological and HPLC – fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chem.*, **2001**, 73(4), 473-480.
25. GONTHIER, A.; FAYOL, V.; VIOLLET, J.; HARTMANN, D.; Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chem.*, **1998**, 63(2), 287-294.
26. AKHTAR, M.; KHAN, M. A.; AHMAD, I.; Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 19(3), 269-275.
27. MAIAA, A.; ROLIM BABY A.; YASAKA W.; SUENAGA E.; KANEKO T.; VELASCO, M.; Validation of HPLC stability-indicating method for

- Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. *Talanta*, **2007**, 71, 639-643.
28. CRC Handbook of Chemistry and Physics. Florida, United States of America: Taylor & Francis Group, 87^a Ed., **2006-2007**, pp. 3-522.
29. KUMAR, S.; AALBERSBERG, B.; Nutrient retention in foods after earth-oven cooking compared to other forms of domestic cooking 2. Vitamins. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, 19, 311-320.
30. FRÍAS, J., PEÑAS, E., VIDAL-VALVERDE, C., Changes in vitamin content of powder enteral formulas as a consequence of storage. *Food Chem.*, **2009**, 115, 1411-1416.
31. GUERRA, E.; LEÓN, C.; CORZO, N.; GARCÍA, B.; ROMERA, J.; Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *Int. J. Dairy Technol.*, **2002**, 55(4), 171-176.
32. VIDOVIC, S.; STOJANOVIC, B.; VELJKOVIC, J.; PRAZIC-ARSIC, L.; ROGLIC, G.; MANOJLOVIC, D.; Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *J. Chromatogr. A.*, **2008**, 1202, 155-162.
33. PARRA, M.; PELÁEZ, L.; LONDOÑO, J.; PÉREZ, N.; RENGIFO, G.; Los residuos de medicamentos en la leche, problemática y estrategias para su control. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria "CORPOICA", Manual técnico código 2-1-10-06-02-03. Colombia, 2003. [Consultado: 20 de febrero de 2010]. [On-line]: http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf.
34. RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y.; Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Res.*, **2008**, 79, 57-72.

35. VARGAS, T.; Calidad de la leche. Fundación INLACA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Venezuela. **2006**, pp. 1-9. [Consultado: 13 de noviembre de 2007]. [On-line]: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/jornada_leche_III/calidad_de_la_leche_vargas.pdf.
36. RAMÍREZ, A.; VEGA Y LEÓN, S.; GUTIÉRREZ, R.; PÉREZ, N.; Avances en la investigación de las características fisicoquímicas y de composición de la leche cruda. Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. México. pp. 1-7. [Consultado: 13 de noviembre de 2007]. [On-line]: <http://www.alfaeditores.com/carnilac/Agosto%20Sep%2004/INVESTIGACI%D3N%20Avances%20en%20la%20Investigaci%F3n.pdf>.
37. PATIÑO, E.; Factores que afectan la composición físico-química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes, Argentina. Cátedra tecnología de la leche y derivados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. **2004**. [On-line]: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/4-Veterinaria/V-001.pdf>. [Consultado: 13 de noviembre de 2007].
38. KONDYLI, E.; KATSIARI, M.; VOUTSINAS, L.; Variations of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chem.*, **2007**, 100, pp. 226-230.
39. WATTIAUX, M.; Composición de la leche y valor nutricional. Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la industria lechera, Universidad de Wisconsin-Madison. Estados Unidos. **1998**, pp. 73-76. [Consultado: 13 de noviembre de 2007]. [On-line]: http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/babkoc/19_s.pdf.
40. CARMUEGA, E.; Los beneficios de la leche para la dieta del ser humano. Trabajo presentado en el VIII Congreso Panamericano de Lechería. Miami, Estados Unidos, **2004**, junio 23-25.
41. MORALES, F.; Producción de leche y competitividad: Hay mercado, pero no ható. Economía, ganadería y cifras. Carta FEDEGAN N°107.

- Colombia, pp. 80-81. [Consultado: 27 de febrero de 2010]. [on-line]: http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/FNG_PORTLETS/PUBLICACIONES/CARTAAFEDEGAN/EDICIONESANTERIORES/EDICION_107/CF_107%20ECONOMIA_NOHATO.PDF.
42. DUQUE, J.; Informe lácteos, derivados y huevos. Catering. Colombia, año 5, 22, pp. 32-39. [Consultado: 27 de febrero de 2010]. [on-line]:
43. SCHKOLINK, M.; Enfoque estadístico-producción de leche. Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística. Chile, **2006**, pp. 1-4. [on-line]: <http://www.ine.cl/canales/menu/boletines/enfoques/2006/pdf/leche210806.pdf>. [Consultado: 27 de febrero de 2010].
44. LÓPEZ, M.; SIMAL, G.; PASEIRO, L.; SIMAL, L.; Variaciones mensuales y estadísticas anuales de los parámetros de calidad en muestras de leche de la provincia de Coruña en relación con el sistema de pago por calidad. *Cienc. Technol. Aliment.* **1998**, 2, 74-78.
45. KLEI, L.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; OLTENACU, P.; LEDNOR, A.; BANDLER, D.; Influence of milking three times a day on milk quality. *J. Dairy Sci.*, **1997**, 80, 427-436.
46. ABELLÁN, P.; FARRÉ, R.; ALEGRÍA, A.; FERRER, E.; ROMERO, F.; Indicators of damage of protein quality and nutritional value of milk: Review. *Food Sci. Technol. Int.*, **1999**, 5(6), 447-461.
47. VALBUENA, E.; CASTRO, G.; LRIÑEIMA, K.; ACOSTA, W.; BRIÑEZ, W.; TOVAR, A.; Calidad microbiológica de las principales marcas de leche distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Veterinaria*, **2005**, 14(1), pp. 1-14.
48. SHARMA, R.; LAL, D.; Stability of different water-soluble vitamins during preparation and subsequent storage of spray dried buffalo skim milk powder. *J. Food Sci. Technol.*, **2002**, 39, 439-441.
49. KOUNDOURELLIS J., MARKOPOULOU C., KAGKADIS K.; An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B₁,

- B₆, B₁₂, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 30, 1403-1410.
50. HE, H.; LI, H.; CHEN, F.; Determination of vitamin B₁ in seawater and microalgal fermentation media by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem.*, **2005**, 383, 875–879.
51. IVANOVIĆ, D.; POPOVIĆ, A.; RADULOVIĆ, D.; MEDENICA M.; Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 18, 999–1004.
52. AUGUSTIN, J.; KLEIN, B.; BECKER, D.; VENUGOPAL, P.; Methods of Vitamins Assay. New York, United States of America: A Wiley-Interscience, 4^a Ed., **1985**, pp. 403-468.
53. EKINCI, R.; KADAKAL, C.; Determination of Seven Water-Soluble Vitamins in Tarhana, a Traditional Turkish Cereal Food, by High-Performance Liquid Chromatography. *Acta Chromatogr.*, **2005**, 15, 289-297.
54. LÓPEZ M.; ROMEO M.; MORERA S., CASTELLOTE A.; Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J. Chromatogr. B.*, **2006**, 830, 41-46.
55. BRUBACHER, G.; MULLER W.; Methods for the determination of vitamins in food. London, England: Elsevier Applied Science Publishers, **1985**, p. 66.
56. SHI, D.; LAI, L.; YU F.; MIN L.; Study on the chromatographic behavior of water-soluble vitamins on *p-tert-butyl-calix[8]arene*-bonded silica gel stationary phase by HPLC. *Talanta.*, **2004**, 64, 373–379.
57. SKOOG, D.; LEARY J.; Análisis Instrumental. Madrid, España: McGraw Hill, 5^a Ed., **1994**, pp. 786-801.
58. RUBINSON, J.; RUBINSON, K.; Análisis Instrumental. Madrid, España: Prentice Hall, 1^a Ed., **2001**, pp. 636 – 674.

59. SHINTNI, H.; POLONSKY, J.; Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic & Professional. Florida, United States of America: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2^a Ed., **1997**, pp. 1-3.
60. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, R.; Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro S.A., **1992**, pp. 27, 301-324.
61. CHEN, Z.; CHEN, B.; YAO, S.; High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Anal. Chim. A*, **2006**, 569, 169-175.
62. LUTTSEVA, L.; MASLOV, L.; Structure of chemical compounds methods of analysis and process control. *J. Pharm. Chem.*, **1999**, 33(9), 30-37.
63. SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH, J.; Practical HPLC Method Development. New York, United States of America: Wiley-Interscience, 2^a Ed., **1997**, pp. 60-77.
64. SCOTT, R.; Chromatographic detectors: Design, function, and operation. New York, United States of America: Marcel Dekker, **1996**, pp. 192-194.
65. ROSSI, J.; DELFINO, J.; Cienciometría: instrumentos de evaluación y crítica. *Ciencia hoy en línea*, **2005**, 15(89). [On-line]: <http://www.med.uchile.cl/noticias/2006/agosto/cienciometria.html>. [Consultado: 11 de agosto de 2007].
66. GARCÍA, P.; LÓPEZ, P.; Análisis bibliométrico y literatura de patentes. *Revista General de Información y Documentación*. Universidad Complutense. Madrid, **1997**, 7(2). [On-line]: [Consultado: 13 de agosto de 2007]
67. SPINAK, E.; Indicadores Cienciométricos. Seminario sobre Evaluación de la Producción Científica. Sao Paulo. **1998**. [On-line]: <http://scielo.sld.cu/pdf/aci/v9s4/aci24100.pdf>. [Consultado: 13 de agosto de 2007].

68. SPINAK, E.; Indicadores cuantitativos de patentes: aplicaciones y limitaciones. Madrid, **2003**. [Consultado: 13 de agosto de 2007]. [Online]: http://www.riicyt.edu.ar/interior/normalizacion/III_bib/Spinak.pdf.
69. PÉREZ, M.; Usos y abusos de la cuantimetría. *Cinvestav*, **2006**. [Online]: <http://www.cinvestav.mx/Portals/0/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Cinvestav/enemar%202006/6%20usos.pdf>. [Consultado: 12 de agosto de 2009].
70. NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D.; HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends Anal. Chem.*, **2008**, 27(10), 942-958.
71. HEUDI, O.; KILINC, T.; FONTANNAZ, P.; HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem.*, **2006**, 94, 626-631.
72. ODRIÓZOLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; MARTÍN, O.; Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.*, **2007**, 105, 1151-1158.
73. IWASE, H.; ONO, I.; Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in juices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using L-cysteine as precolumn reductant. *J. Chromatogr. A.*, **1993**, 654, 215-220.
74. ESTEVE, M.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; LÓPEZ, J.; ROMERA, J.; RAMÍREZ, M.; GIL, A.; Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem.*, **1995**, 52, 99-102.
75. BURINI, G.; Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1154, 97-102.
76. HÖLLER, U.; BRODHAG, C.; KNÖBEL, P.; VOLKER, H.; Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a

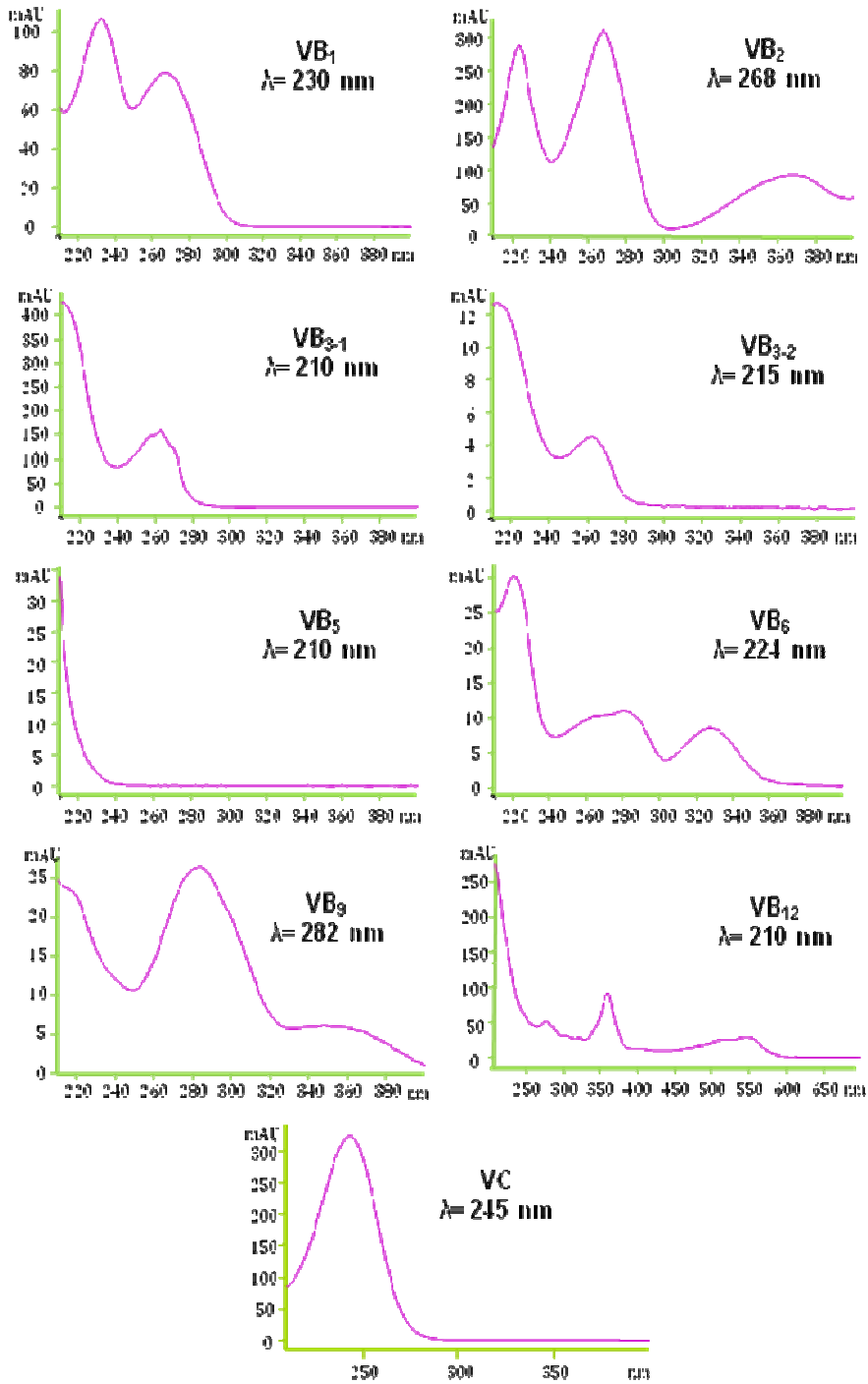
bench-top robotic system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 151-158.

77. MILLER, J.; MILLER, J.; Estadística para química analítica. Wilmington, United States of America: Addison-Wesley Iberoamerican, 2ª Ed., **1993**, pp. 100-103.
78. MILLER, J.; MILLER, J.; Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid, España: Pearson educación, 4ª Ed., **2002**, pp. 125-127.
79. UNE-EN 14130: Productos alimenticios: Determinación de vitamina C mediante HPLC; *Asociación Española de Normalización y Certificación* (AENOR), Madrid, España, **2003**.

ANEXOS

ANEXO 1. Espectros UV-Vis de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉
VB₁₂ y VC

Figura 1-1. Espectros UV-Vis de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉, VB₁₂ y VC.



Anexo 2. Curvas de calibración de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉
VB₁₂ y VC

Figura 2-1. Curvas de calibración de la VB₁, VB₂, VB₃₋₁, VB₃₋₂, VB₅, VB₆, VB₉ VB₁₂ y VC.

