

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/DAD)
PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS
LIPOSOLUBLES EN LECHE**

FREYS JULIO SERRANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/DAD)
PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS
LIPOSOLUBLES EN LECHE**

FREYS JULIO SERRANO

Directores:

ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2008

Dedicatoria

*A mí esposa, Lady Marcela Castro Rodríguez, el
amor de mi vida,
y a mi hijo, David Santiago, la luz que llegó a mi
vida para iluminar mi camino.*

Agradecimientos

A la Dra. ELENA STASHENKO y al profesor JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, que más que profesores han sido dos grandes amigos, a William, Deyanira, Adriana, Deyny y a todos aquellos que de una u otra intervinieron para hacer realidad esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1 ESTADO DEL ARTE	3
1.1 LAS VITAMINAS	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.1.1 Vitamina A	10
1.1.1.2 Vitamina E	12
1.1.1.3 Vitamina D	14
1.1.1.4 Vitamina K	15
1.2 LA LECHE	16
1.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS	18
1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	21
2. CIENCIOMETRÍA	23
2.1 PUBLICACIONES POR AÑOS, PAÍSES Y CATEGORÍAS	23
2.2 PATENTES	24
2.3 PUBLICACIONES O FUENTES NO-FORMALES EN <i>INTERNET</i>	25
2.4 REVISTAS CIENTÍFICAS	26
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	30
3.1.1 Reactivos y solventes	30
3.1.2 Material de referencia certificado	30
3.1.3 Material de laboratorio	31
3.2 MATERIAL LÁCTEO	31
3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC/DAD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES	31
3.3.1 Método cromatográfico	32

3.3.1.1 Selección de la longitud de onda	32
3.3.1.2 Selección de la fase móvil	32
3.3.2 Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica	33
3.3.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC	34
3.3.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas	34
3.3.3.2 Evaluación del rango dinámico lineal (RDL) la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico	34
3.3.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC)	35
3.3.3.4 Selección del método	35
3.3.3.5 Exactitud del método	36
3.3.3.6 Evaluación de la reproducibilidad	38
3.4 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC/DAD DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN MUESTRAS DE LECHE	39
3.4.1 Determinación	39
3.4.2 Cuantificación	39
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
4.1 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES POR HPLC/DAD	40
4.1.1 Método cromatográfico	40
4.1.1.1 Selección de la longitud de onda	40
4.1.1.2 Selección de la fase móvil	41
4.1.2 Parámetros de eficiencia de la separación	44
4.1.3 Figuras analíticas de mérito para HPLC/DAD	44
4.1.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas	44

4.1.3.2 Evaluación del RDL y la sensibilidad del método	48
4.1.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC)	49
4.1.3.4 Selección del método	50
4.1.3.5 Exactitud del método	50
4.1.3.6 Determinación de la reproducibilidad de la extracción	58
4.2 EXTRACCIÓN DE VITAMINAS EN MUESTRAS COMERCIALES	59
4.3 COSTOS DEL ENSAYO	65
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química del retinol	10
Figura 2. Reacción química primaria de la visión	11
Figura 3. Estructura de los tocoferoles y tocotrienoles	13
Figura 4. Mecanismo de reacción del α -tocoferol con peróxidos	14
Figura 5. Producción de la vitamina D ₃ en la piel	15
Figura 6. Número de publicaciones sobre vitaminas liposolubles en leche, según los años	24
Figura 7. Número de publicaciones, por países, sobre vitaminas liposolubles en leche	24
Figura 8. Publicaciones en revistas sobre vitamina A	26
Figura 9. Publicaciones en revistas sobre vitamina E	27
Figura 10. Publicaciones en revistas sobre vitamina D	27
Figura 11. Publicaciones en revistas sobre vitamina K	28
Figura 12. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i>	32
Figura 13. Diseño experimental factorial 2 ³	36
Figura 14. Perfiles cromatográficos de la mezcla de las 10 vitaminas liposolubles, a diferentes longitudes de onda	44
Figura 15. Interacciones entre las variables temperatura y solvente para el retinol	54
Figura 16. Interacciones entre las variables temperatura y	55

	solvente para la vitamina D ₂	
Figura 17.	Interacciones entre las variables solvente y antioxidante para la vitamina D ₂	55
Figura 18.	Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche entera aisladas y analizadas por HPLC-DAD	60
Figura 19.	Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche cruda (cantina) aisladas y analizadas por HPLC-DAD	61
Figura 20	Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche <i>light</i> aisladas y analizadas por HPLC-DAD	62
Figura 21	Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche en polvo (para niños) aisladas y analizadas por HPLC-DAD	63
Figura 22	Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en <i>Yogurt</i> aisladas y analizadas por HPLC-DAD	64

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Vitaminas liposolubles	5
Tabla 2. Composición de la leche de vaca (por cada 100 g)	16
Tabla 3. Composición de minerales y vitaminas en la leche de vaca	17
Tabla 4. Comparación de las diferentes técnicas cromatográficas para el análisis de vitaminas liposolubles	18
Tabla 5. Patentes sobre vitaminas liposolubles	25
Tabla 6. Publicaciones en <i>internet</i> sobre vitaminas liposolubles	26
Tabla 7. Resumen análisis cuantitativo	29
Tabla 8. Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas	30
Tabla 9. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados en presente trabajo	37
Tabla 10. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial	38
Tabla 11. Preparación de las concentraciones de trabajo para realizar la curva de calibración	39
Tabla 12. Selección de longitud de onda para las vitaminas liposolubles analizadas	40
Tabla 13. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis simultáneo de vitaminas liposolubles por HPLC/DAD	44
Tabla 14. Parámetros de eficiencia de la separación de las 10 vitaminas liposolubles analizadas	45
Tabla 15. Repetibilidad de los t_R de las 10 vitaminas liposolubles	47

	analizadas por HPLC/DAD	
Tabla 16	Repetibilidad de áreas de picos de las 10 vitaminas liposolubles analizadas por HPLC/DAD	48
Tabla 17	Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación simultánea de 10 vitaminas liposolubles, a partir de la curva de calibración (0,5 – 50 ppm), por HPLC/DAD	49
Tabla 18	Niveles mínimos de detección y de cuantificación del DAD de las vitaminas K_3 , retinol, acetato de retinilo, D_2 , (+) – γ -tocoferol, (+) – α -tocoferol, K_2 , acetato de α - tocoferilo, K_1 y palmitato de retinilo	50
Tabla 19	Resultados del diseño experimental factorial 2^3	52
Tabla 20	Resultados de los efectos principales de las variables estudiadas sobre las vitaminas retinol, D_2 , α -tocoferol, K_1	54
Tabla 21	Resumen de los efectos principales e interacciones con efectos significativos	54
Tabla 22	Porcentaje de recuperación de la mezcla de vitaminas liposolubles adicionada a una leche sin vitaminas	57
Tabla 23	Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de leche enriquecida	58
Tabla 24	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche entera adquirida del mercado local	60
Tabla 25	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche cruda (cantina) adquirida del mercado local	61
Tabla 26	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche <i>light</i> adquirida del mercado local	62
Tabla 27	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche en polvo	63

	(para niños) adquirida del mercado local	
Tabla 28	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en <i>yogurt</i> adquirido del mercado local	64
Tabla 29	Resultados generales de los contenidos vitamínicos, de las diferentes matrices evaluadas y concentraciones reportadas en las tablas nutricionales de los productos	66

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1.** Espectros de ultravioleta-visible de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, filoquinona, menadiona, menaquinona, γ -tocoferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferilo y ergocalciferol.
- Anexo 2.** Curvas de calibración de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, γ -tocoferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferilo, filoquinona (K_1), menaquinona (K_2), menadiona (K_3) y ergocalciferol (D_2).
- Anexo 3.** Resultados, obtenidos por el *software* MINITAB 15, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción de las vitaminas: Retinol, D_2 , α -Tocoferol, K_1 .
- Anexo 4.** Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación de las vitaminas: retinol, D_2 , α -tocoferol y K_1 .
- Anexo 5.** Resumen general de costos

DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Procedimiento para la extracción de vitaminas en leche	56

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AT	<i>Agilent Technologies</i>
ca.	Cantidad aproximada
D ₂	Ergocalciferol
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)
e.g.	Por ejemplo
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas prácticas de laboratorio)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
K ₁	Filoquinona
K ₂	Menaquinona
K ₃	Menadiona
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Nivel mínimo de detección)
LQD	<i>Limit of Quantitation</i> (Nivel mínimo de cuantificación)
ODS	Octadecilsiloxano
UHT	Leche ultrapasteurizada
UI	Unidades internacionales
UV-Vis	Ultravioleta – visible
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina)
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i> (Organización mundial de la propiedad intelectual)

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/DAD) PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN LECHE *

Autor: Freys Julio Serrano**

Palabras clave: Vitaminas liposolubles, leche, HPLC, Fase reversa, arreglo de diodos.

En el presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Cromatografía, se desarrolló una metodología analítica para determinar simultáneamente 10 vitaminas liposolubles (menadiona, retinol, acetato de retinilo, ergocalciferol, γ -tocoferol, α -tocoferol, menaquinona, acetato de α -tocoferilo, filoquinona y palmitato de retinilo) en matrices lácteas, adicionalmente para establecer las mejores condiciones de extracción simultánea, se empleó un diseño experimental 2^3 con las variables de temperatura, tipo de solvente y efecto antioxidante, en dos niveles. Los resultados se evaluaron determinando los efectos primarios y las interacciones de las variables estudiadas.

Para evaluar la repetibilidad de la metodología se evaluaron dos parámetros: tiempo de retención y área, hallándose el coeficiente de variación (CV, %) entre 0,1-1,7 %. En la linealidad se obtuvo un coeficiente de determinación $r=0,99$. La reproducibilidad del método, se evaluó en términos de recuperación mediante la adición de vitamina: menadiona, retinol, ergocalciferol, γ -tocoferol, α -tocoferol, menaquinona y filoquinona; para un nivel mínimo de detección (NMD) en un rango 1 - 53 ppb y el nivel mínimo de cuantificación (NMQ) en un rango de 176 - 8702 ppb. Con los resultados obtenidos se demuestra que el método en estudio es preciso, exacto, lineal y altamente sensible para ser utilizado en el control de calidad de las diferentes marcas de leche del mercado local, para la determinación de vitaminas liposolubles.

* Trabajo de grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION OF A CHROMATOGRAPHIC (HPLC/DAD) METHOD FOR THE DETERMINATION OF FAT-SOLUBLE VITAMINS IN MILK

Authors: Freys Julio Serrano**

Keywords: Fat-soluble vitamins, milk, HPLC, reverse phase, diode array detector.

An analytical methodology for the simultaneous determination of 10 soluble vitamins (menadione, retinol, retinyl acetate, ergocalciferol, α -tocopheryl acetate, α -tocopherol, menaquinone, α -tocopherol, γ - tocopherol, phylloquinone and retinyl palmitate) in dairy products was implemented. A 2^3 experimental design was used to establish the combination of temperature, solvent type and antioxidant addition that improved the simultaneous extraction yield. The results were evaluated by determining both main effects and interactions.

Retention time and area were evaluated during methodology repeatability assessment (CV = 0,1-1,7%). Method linearity was represented by a determination coefficient $R^2 = 0.99$. The method accuracy was evaluated in terms of recovery by adding vitamin: γ -tocopherol, α -tocopherol, menadione, retinol ergocalciferol, menaquinone, and phylloquinone. Minimum levels of detection of 1 - 53 ppb and minimum levels of quantitation of 176 - 8702 ppb were obtained for the various vitamins studied. The results achieved prove that the method under study is accurate, precise, linear and sufficiently sensitive to be used in fat-soluble vitamins determination for quality control purposes.

* Undergraduate project.

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

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza hay una gran variedad de compuestos esenciales para nuestro subsistir, entre ellos figuran vitaminas. La forma para adquirirlas, es básicamente a través de fuentes exógenas [1].

La palabra “vitamina” proviene del latín *vita* (vida) mas el griego *ammoniakuós* (producto libio, amoníaco), con el sufijo latino *ina* (sustancia). En general, las vitaminas se caracterizan por ser moléculas grandes, cuya estructura química se basa en combinaciones de grupos alifáticos lineales o cíclicos y en algunos casos grupos aromáticos con alto grado de sustitución; los átomos presentes en estas estructuras son carbono (C), oxígeno (O), e hidrógeno (H) [1], por ejemplo: la vitamina A posee fórmula molecular $C_{20}H_{30}O$ [2].

Las vitaminas se clasifican en dos grupos dependiendo de su solubilidad: hidrosolubles y liposolubles; la solubilidad, determina su estabilidad, presencia en alimentos, la distribución en líquidos corporales y su capacidad de almacenamiento en los tejidos [1,3 -13].

En la actualidad el consumo de estas sustancias ha tenido gran aumento, lo que representa el 10% de los productos farmacéuticos de venta libre [14]. Sin embargo, la ingesta de vitaminas en cantidades mayores de las requeridas, superiores a 4800 UI (Unidades Internacionales) [15] por el organismo, puede originar un síndrome tóxico conocido como hipervitaminosis. Por otra parte, la avitaminosis, debida a una dieta escasa en determinadas vitaminas o a dificultades en su absorción, ocasiona un conjunto de trastornos que pueden llegar hacer letales para el ser vivo [1, 5, 7, 11 -15].

En alimentos como la leche, es relevante identificar y cuantificar el contenido vitamínico, para cumplir con los requerimientos de consumo; en Colombia se sacan al mercado mensualmente entre 170 y 200 millones de litros de leche [16], que tienen diferentes fines pero, al fin y al cabo, terminan en manos del consumidor. Para ello, se requiere contar con las herramientas analíticas que permitan determinar los niveles de vitaminas de forma confiable, exacta y reproducible.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una herramienta que ha otorgado un aporte muy importante para la determinación de estos compuestos [8-10,17].

En el presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Cromatografía, se desarrolló una metodología analítica para determinar simultáneamente 10 vitaminas liposolubles (menadiona, retinol, acetato de retinilo, ergocalciferol, (+)- γ -tocoferol, (+)- α -tocoferol, menaquinona, acetato de α -tocoferilo, filoquinona y palmitato de retinilo) en matrices lácteas. Para establecer las mejores condiciones de extracción simultánea, se empleó un diseño experimental 2^3 con las variables de temperatura, tipo de solvente y efecto antioxidante, en dos niveles. Los resultados se evaluaron determinando los efectos primarios y las interacciones de las variables estudiadas.

Los niveles mínimos de cuantificación del detector de arreglo de diodos (DAD) para las vitaminas se encuentran en el rango de $\mu\text{g/mL}$.

El método seleccionado para la extracción de las 10 vitaminas fue la saponificación de la muestra y la posterior extracción de los analitos de interés. La validación del método se realizó en las matrices de *yogurt*, leche

entera, leche cruda (de cantina), leche en polvo (para niños), y leche *Light* UHT adquiridas en el mercado local.

Este trabajo de grado, presenta un marco teórico sobre los analitos bajo estudio (vitaminas liposolubles) y la técnica de análisis (HPLC). Luego, se describe la metodología empleada (diseño experimental factorial 2^3), los resultados obtenidos y, por último, se presentan las conclusiones y recomendaciones pertinentes. Con los resultados del presente trabajo, se espera que el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander incursione en nuevos de servicios a la empresa privada y a la comunidad en general. El presente trabajo consta de 68 páginas, distribuidas en 6 capítulos.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 LAS VITAMINAS

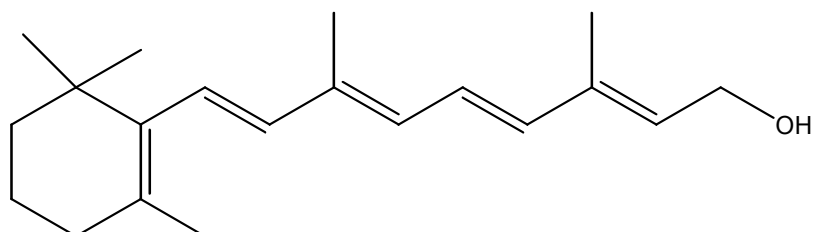
1.1.1 Generalidades. El término “*vitamina*” fue ideado en 1912 por *Casimir Funk* [2,12] para denominar los factores de los alimentos necesarios para la vida. La teoría original de que estas sustancias eran aminas vitales se ha desacreditado, pero quedó la costumbre de nombrarlas vitaminas. A estos compuestos orgánicos; que los humanos requieren en pequeñas cantidades, se les reconoció su existencia antes de identificar su naturaleza química. Se designaron por letras y, en ocasiones, por una nomenclatura que describía su función. El nombre asignado en la actualidad es basado en la estructura química (nomenclatura IUPAC); sin embargo, aún se utiliza ampliamente la terminología alfabética más familiar y con frecuencia más conveniente [1,3-7, 13, 18-27]. A continuación, se mencionan algunas vitaminas junto con ciertos aspectos de sus propiedades y origen (**Tabla 1**).

Tabla 1. Vitaminas liposolubles

Vitamina	Retinol, C ₂₀ H ₃₀ O, (Vitamina A)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 68-26-8; peso molecular: 286.45 g/mol; Color: amarillo; punto de ebullición: 122.5 °C; punto de fusión: 63 °C; soluble en: metanol acetona y cloroformo.
Fuentes	Alimentos de origen animal como la leche, la mantequilla, el queso, la yema de huevo, el hígado y el aceite de hígado de pescado.
Referencias bibliográficas	1-5,12,18-27

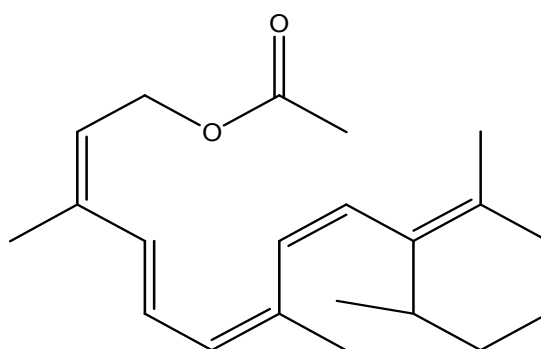
Continuación **Tabla 1.**

Retinol



Vitamina	Acetato de retinilo, $C_{22}H_{32}O_2$ (Acetato de Vitamina A)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 127-47-9; peso molecular: 328.49 g/mol; color: amarillo; punto de ebullición: no reportado; punto de fusión: 58 °C; soluble en: etanol y cloroformo.
Fuentes	Se fabrican sintéticamente, como aditivo fortificante de alimentos, esta sustancia es más estable y menos susceptible a la oxidación, producida por la luz y el aire.
Referencias bibliográficas	1-5,12,18 - 28

Acetato de retinilo

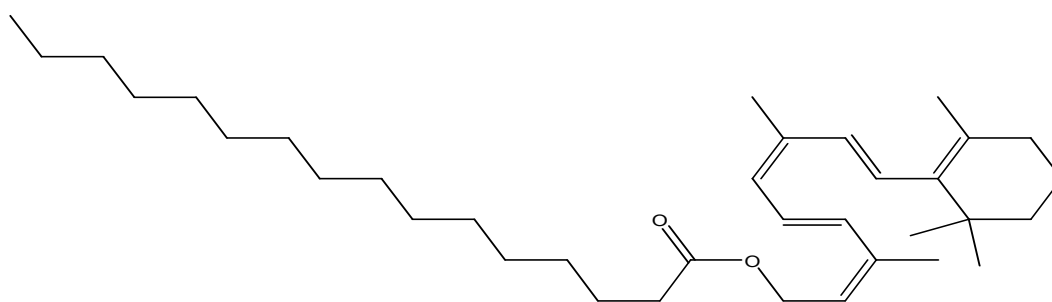


Vitamina	Palmitato de retinilo, $C_{36}H_{60}O_2$ (Palmitato de Vitamina A)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 79-81-2; peso molecular: 524.87 g/mol; color: amarillo oro; punto de ebullición: no reportado; punto de fusión: 28.5 °C; soluble en: éter etílico.

Continuación **Tabla 1.**

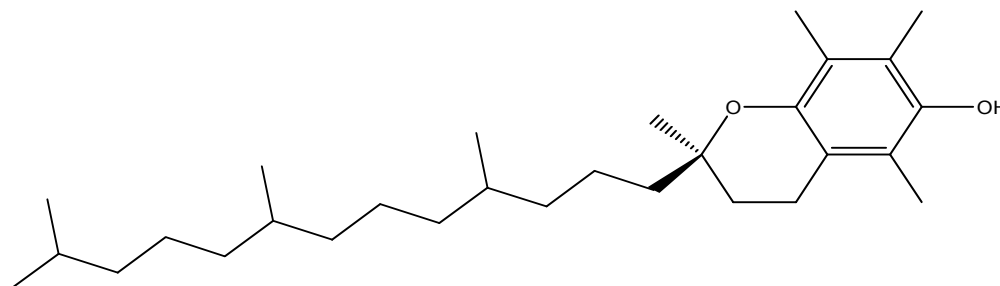
Fuentes	Forma natural: en el pescado y aceite de hígado. Sintética: La molécula se transesterifica con palmitato de metilo para obtener una configuración más estable.
Referencias bibliográficas	1-5,12,18- 27, 29

Palmitato de retinilo



Vitamina	(+)- α -Tocoferol, $C_{29}H_{50}O_2$ (Vitamina E)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 59-02-9; peso molecular: 430.71 g/mol; Color: amarillo claro; punto de ebullición: no reportado; punto de fusión: 3 °C; soluble: éter etílico; acetona.
Fuentes	Se encuentra en muchos alimentos, principalmente, de origen vegetal; entre ellos, en el brócoli, las espinacas, el germen de trigo y la levadura de cerveza.
Referencias bibliográficas	1-5,12,18 - 27,30

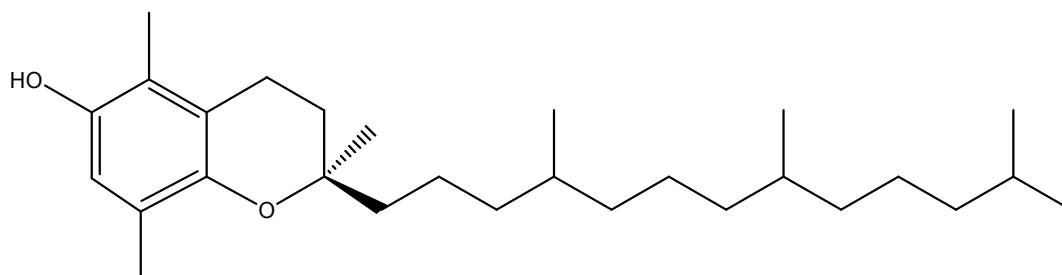
(+)- α -Tocoferol



Continuación **Tabla 1.**

Vitamina	(+)- γ -Tocoferol $C_{28}H_{48}O_2$ (Vitamina E)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 54-28-4, peso molecular: 416.68 g/mol, color: marrón claro, punto de ebullición: no reportado, solubilidad en: no reportado.
Fuentes	La fuente es la misma que la del (+)- α -tocoferol.
Referencias bibliográficas	1-5,12,18 - 27,31

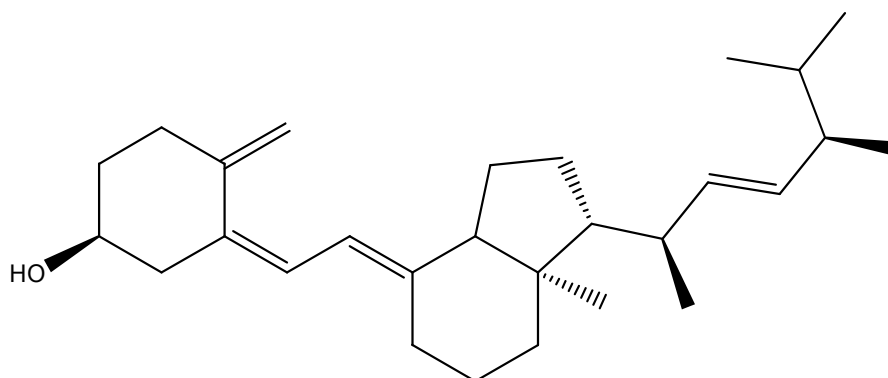
(+)- γ -Tocoferol



Vitamina	Ergocalciferol, $C_{28}H_{44}O$ (Vitamina D_2)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 50-14-6, peso molecular 396.65 g/mol, color: blanco- amarillo claro, punto de ebullición: no reportado, punto de fusión: 115°C, soluble: acetona.
Fuentes	Se encuentra de modo natural sólo en la grasa de ciertos productos animales, por ejemplo: los huevos, el queso, la leche, la mantequilla y aceites de pescado. Los cereales, hortalizas y frutas no tienen vitamina D.
Referencias bibliográficas	1-5,12, 13,18- 27,31, 32

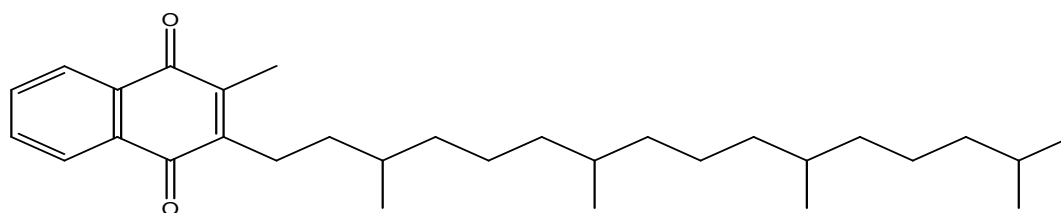
Continuación **Tabla 1.**

Ergocalciferol



Vitamina	Filoquinona, C ₃₁ H ₄₆ O ₂ (Vitamina K ₁)
Propiedades fisicoquímicas	CAS : 84-80-0, peso molecular: 450.70 g/mol, color: Amarillo verdoso muy oscuro, punto de fusión: -20°C Punto de ebullición: no reportado, soluble en: no reportado.
Fuentes	Las principales fuentes son aceites vegetales como: soya, canola y de oliva; aceites de cacahuete, maíz y girasol.
Referencias bibliográficas	1-5,12, 13,18 - 27

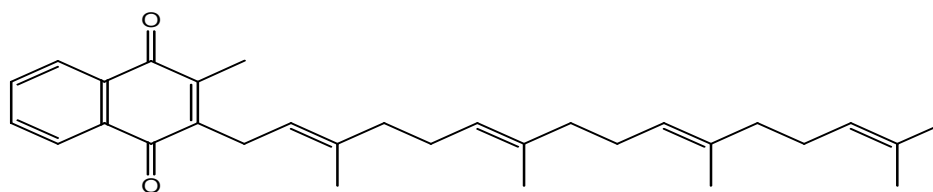
Filoquinona



Continuación **Tabla 1.**

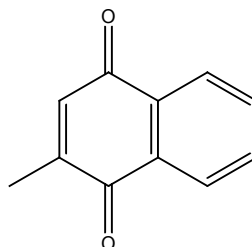
Vitamina	Menaquinona (menatetreona), $C_{31}H_{40}O_2$ (Vitamina K_2)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 863-61-6 peso molecular: 444.65 g/mol, color: no reportado, punto de fusión: $-20\text{ }^\circ\text{C}$, punto de ebullición no reportado, soluble en: no reportado.
Fuentes	Se ha encontrado en el hígado de animales y en alimentos fermentados, como el queso. Una parte es producida por bacterias en el intestino.
Referencias bibliográficas	1-5,12, 13,18 - 27

Menaquinona



Vitamina	Menadiona, $C_{11}H_8O_2$, (Vitamina K_3)
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 58-27-5, peso molecular: 172.18 g/mol, color: amarillo, punto de fusión: $102\text{ }^\circ\text{C}$.
Fuentes	Se encuentra en fuentes de origen vegetal, canola y aceites de oliva; se usa para enriquecer los alimentos.
Referencias bibliográficas	1-5,12, 13,18 - 27

Menadiona



1.1.1.1 Vitamina A: se descubrió casi simultáneamente en 1903 por dos grupos de investigadores, *McCollum y Davis* en la Universidad de Wisconsin, y *Osborne y Mendel* en la Universidad de Yale, cuando los investigadores encontraron que ciertos animales de laboratorio dejaban de crecer si la manteca (hecha con grasa de cerdo) era la única forma de grasa presente en la dieta, pero, si se les suministraba mantequilla, en vez de manteca (la dieta en otros aspectos permanecía igual), los animales crecían y se desarrollaban bien [7, 13, 15, 18].

La vitamina A es el término genérico que se utiliza para describir a todos los retinoides que tienen actividad biológica. Es un alcohol cristalino ligeramente amarillo, que se denominó “retinol” por su función específica en la retina del ojo. La vitamina A tienen un anillo de β -ionona enlazado a una cadena isoprenoide [1-5, 12, 18 - 27, 29] (**Figura 1**).

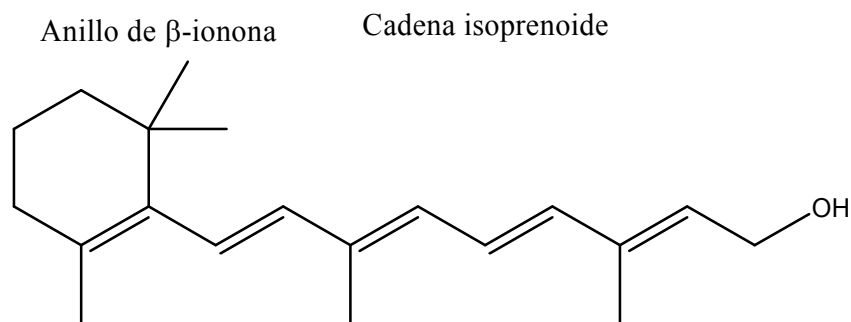


Figura 1. Estructura química del retinol.

Los carotenoides provitamínicos, de color amarillo-naranja-rojo, que se convierten en vitamina A en el cuerpo con eficiencia variable, se describen en términos de β -caroteno, que es el compuesto más activo. De cientos de carotenoides naturales, sólo 50 tienen una actividad biológica importante [19].

En la ruta metabólica del retinol se encuentra una cantidad significativa de isómeros. Los más destacados son 11-*cis*-retinal, todo-*trans* retinal, que sobresalen en el metabolismo de la visión, en la que ocurre la isomerización tipo *cis-trans* de la vitamina A, enlazada a la proteína llamada *opsin*, mecanismo mediante el cual se recibe energía luminosa para generar la imagen visual (**Figura 2**) [3, 4, 45, 18 - 27].

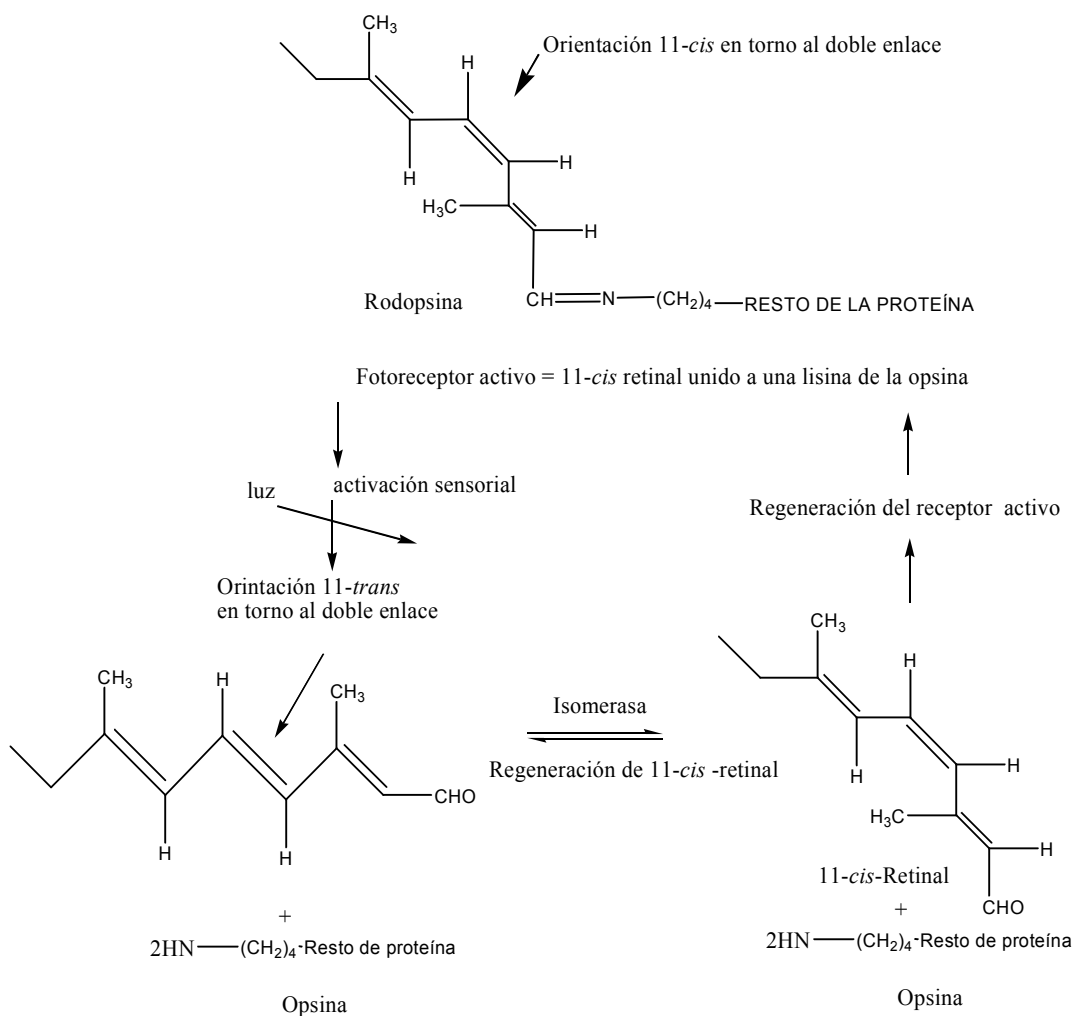
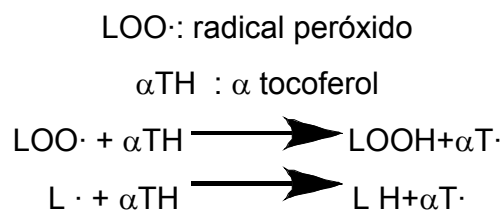


Figura 2. Reacción química primaria que ocurre en el ojo durante el proceso de la visión.

1.1.1.2 Vitamina E: Esta vitamina fue descubierta en el año de 1922, en la Universidad de California por *Evans y Bishop*, durante la investigación sobre la reproducción; en este estudio, se observó que las ratas hembra requerían un principio en la dieta, no identificado entonces, para tener un embarazo normal; se encontró que las hembras con deficiencia de esta sustancia presentaban ovulación y concepción normales, pero al mismo tiempo, durante el periodo de gestación, ocurría muerte y resorción de los fetos [18, 27, 31] la sustancia resultó ser la vitamina E.

La vitamina E se encuentra en la naturaleza en ocho diferentes formas a saber: α -, β -, γ -, δ -tocoferoles o α -, β -, γ -, δ -tocotrienoles. Este grupo de lípidos estrechamente relacionados, contiene sustituciones sobre el 2H-1-benzopiran-6-ol y la cadena de hidrocarburos con unidades isoprenoides (**Figura 3**).

Estas sustancias son antioxidantes en virtud del hidrógeno fenólico. Por ejemplo, el α -tocoferol funciona como un rompedor de cadena al intervenir en las siguientes reacciones:

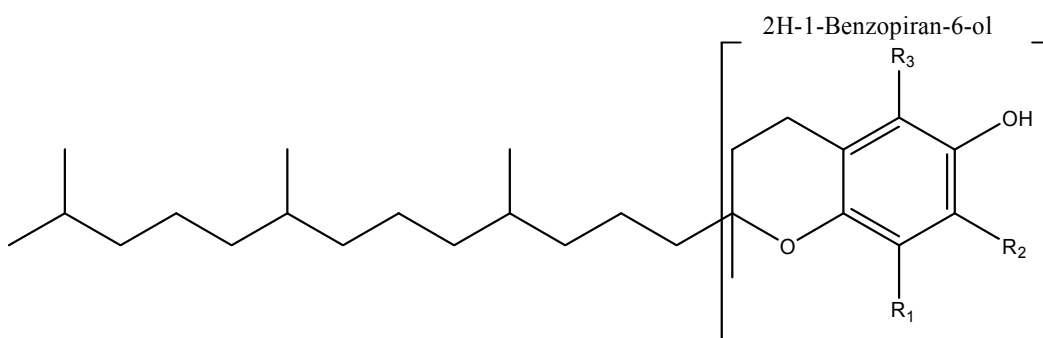


Químicamente, el α -tocoferol puede experimentar una secuencia de reacciones con el radical peróxido, que lo llevan a la formación de quinona de α -tocoferol (**Figura 4**). El α -tocoferol funciona como un interruptor de las

reacciones en cadena de radicales libres e inhibe con ello la peroxidación oxidativa de los ácidos grasos [5, 6, 25, 27, 31].

	Sustituyentes			
		R ₁	R ₂	R ₃
TOCOFEROLES	α-	CH ₃	CH ₃	CH ₃
y	β-	CH ₃	H	CH ₃
TOCOTRIENOLES	γ-	H	CH ₃	CH ₃
	δ-	H	H	CH ₃

Tocoferoles:



Tocotrienoles:

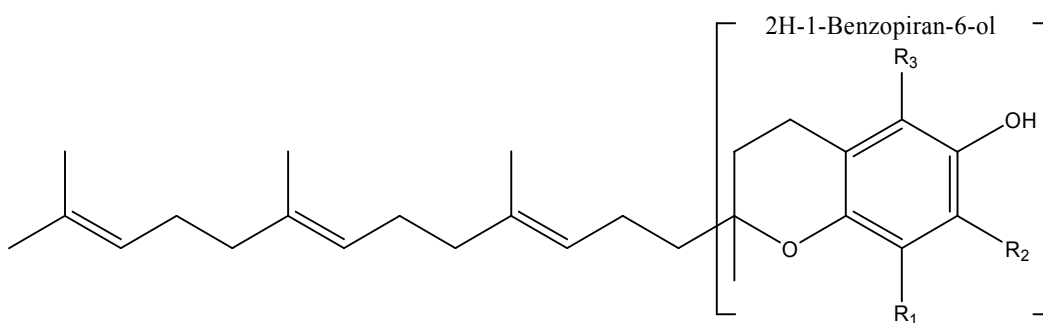


Figura 3. Estructura de los tocoferoles y tocotrienoles.

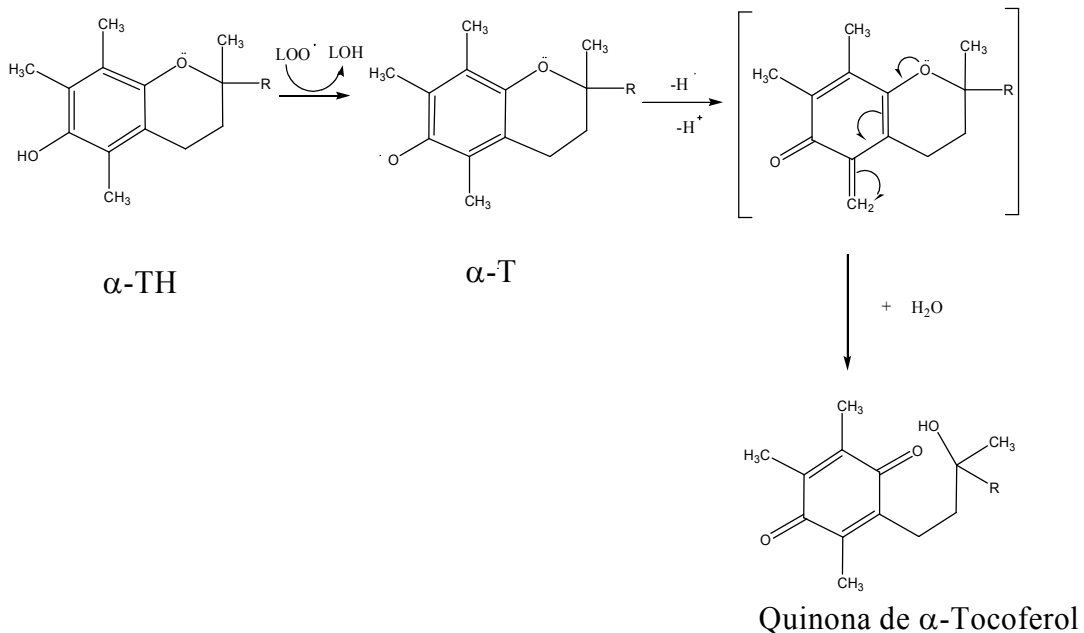


Figura 4. Mecanismo de reacción del α -tocoferol con peróxidos. [15].

1.1.1.3 Vitamina D: Es un hidrocarburo alifático descubierto por el profesor Emérito de Bioquímica, *Elmer Verner McCollum* en 1929, al observar que tratando con oxígeno el aceite de hígado de bacalao se destruía una sustancia esencial (el llamado entonces "factor A"), pero quedaba otra, la que tenía efecto antirraquítico, que, al resultar la cuarta vitamina conocida, se le designó la letra D [15, 18, 32, 33].

Los dos isómeros más destacados de la vitamina D son ergocalciferol, conocido como la vitamina D₂, y colecalciferol, vitamina D₃. Esta última se produce en la piel por acción de la luz, a partir del 7-dehidrocolesterol (**Figura 5**). Por tal argumento y las funciones que desempeña en el metabolismo del calcio, la vitamina D no es considerada estrictamente una vitamina [1, 3-7, 12, 13, 15, 22-27, 32-36]. Además este compuesto requiere una activación; el metabolito activo primario de esta sustancia

es el calcitriol (1,25-dihidroxitamina D), producto de dos hidroxilaciones sucesivas de la vitamina D [15, 21-28].

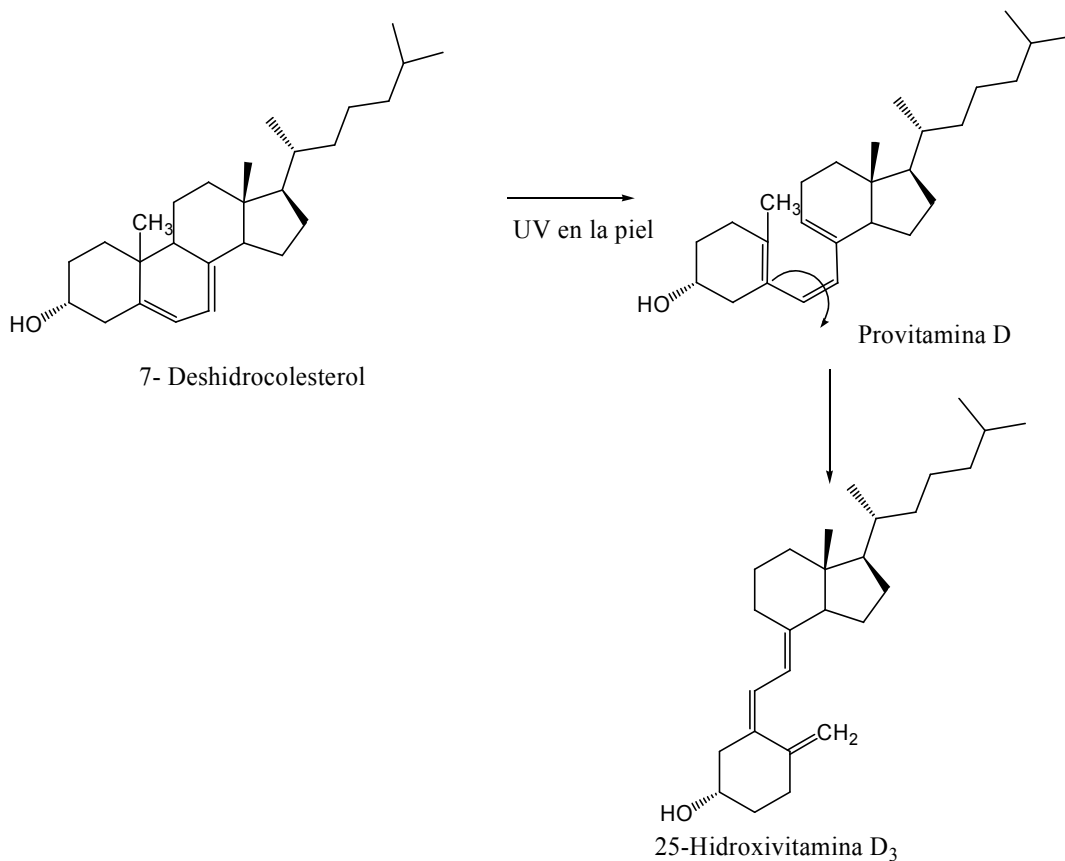


Figura 5. Producción de la vitamina D₃ en la piel.

1.1.1.4 Vitamina K: Descubierta en el año de 1935 por el danés *Henrik Dam*, tras haber sometido a pollos a un régimen sin vegetales, quien demostró que la carencia de estos alimentos provocaba hemorragias espontáneas debido a la ausencia de un factor que después el investigador bautizó con el nombre de la vitamina K ("*Koagulation*" en alemán) [15,18]. Es una serie de compuestos, que tienen en común la metilación de un anillo *naftoquinona* y que se caracterizan por la larga cadena lateral de hidrocarburos, que constan

de unidades isopreno repetidas y cuyo número determina la forma exacta de este compuesto (ver **Tabla 1**) [1, 3, 12, 13, 15, 18, 21-27, 37, 38].

La vitamina K es necesaria para una coagulación normal de la sangre en seres vivos. Específicamente, se requiere la vitamina K para que el hígado produzca los factores que necesita la sangre para su apropiada coagulación [3, 4-7, 12, 13, 18, 24-26, 39-42].

1.2 LA LECHE

La leche se define como un producto de la secreción de la glándula mamaria, con un alto porcentaje de agua (**Tabla 2**). Desde el punto de vista nutritivo es una buena fuente de proteínas, vitaminas y minerales (**Tabla 3**), particularmente, calcio, así como de carbohidratos y grasas [43-45].

Tabla 2. Composición de la leche de vaca (por cada 100 g) [45]

Nutriente	Cantidad, g
Agua	88
Proteína	3,2
Grasa	3,4
Lactosa	4,7
Minerales	0,72

Tabla 3. Composición de minerales y vitaminas en la leche de vaca [45]

Minerales y vitaminas	Concentración mg/100 mL
Potasio	138
Calcio	125
Cloro	103
Fósforo	96
Sodio	8
Azufre	3
Magnesio	12
Minerales trazas ^a	<0,1
Vitaminas	400,18 ^b

a. Incluye cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, iodo y otros.

b. µg/100mL

La vaca lechera aporta una de las principales fuentes de alimento en el mundo, ya que además de proporcionar un producto altamente nutritivo, es una de las especies que presenta una muy alta eficiencia de conversión de alimentos. Especial importancia tiene el hecho de que, por ser rumiante, tiene la capacidad de transformar forrajes toscos en un producto final de muy alta calidad [43, 44].

Existe un gran número de factores que afectan y por ende modifican, la composición de la leche. Entre ellos, se encuentran factores raciales, genéticos, sanitarios, ambientales, de manejo y dietarios. Aún así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizadas para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche. Este producto es altamente perecedero y debe ser enfriado a 4°C lo más rápido posible, luego de su colección. Las temperaturas altas, la acidez o la contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente [42-45].

1.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS

Al mismo tiempo que evoluciona el análisis instrumental, aparecen nuevas técnicas para la determinación de vitaminas. En la **Tabla 4** aparecen referenciadas algunas de ellas, con algunos aspectos relevantes para el análisis de vitaminas liposolubles.

Tabla 4. Comparación de las diferentes técnicas cromatográficas para el análisis de vitaminas liposolubles

Técnica	Cromatografía de papel [17, 46-48].
Principio	El analito asciende por un papel absorbente que actúa como soporte o fase estacionaria y una fase móvil que sube por capilaridad.
Propiedad que mide	La polaridad de los analitos; confrontando con un analito de referencia.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	La exposición a la luz las isomeriza. No se puede realizar la determinación de los diferentes isómeros. No se puede identificar todas las vitaminas simultáneamente.

Técnica	Cromatografía de Capa fina [17, 47 - 50].
Principio	Un sólido actúa como fase estacionaria, se extiende en una capa delgada sobre una placa, de soporte.
Propiedad que mide	La polaridad de los analitos; confrontando con un analito de referencia.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	Produce la formación de isómeros. No se puede realizar la determinación de los diferentes isómeros. No se puede identificar simultáneamente todas las vitaminas.

Continuación **Tabla 4.**

Técnica	Cromatografía de gases [17, 46 - 50]
Principio	La muestra se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte que transporta el analito a través de la fase estacionaria.
Propiedad que mide	La polaridad y temperatura de ebullición de los analitos, reflejados en el tiempo de retención y áreas.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	La vitamina A se descompone al ser expuesta a altas temperaturas. Las vitaminas liposolubles son compuestos termolábiles y de relativamente alto peso molecular; no pueden ser analizados por esta técnica cromatográfica.
Técnica	Métodos colorimétricos [17, 46-50].
Principio	Incorporación de un indicador en la matriz que reacciona con el analito.
Propiedad que mide	El cambio de color.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	Interferencia de otros compuestos que reaccionan con el indicador.
Técnica	Espectrometría de fluorescencia [17, 49-50].
Principio	Utiliza una lámpara para la excitación de la fluorescencia y una serie de tubos fotomultiplicadores que sirven como detectores.

Continuación **Tabla 4.**

Propiedad que mide	Mide un determinado tipo de radiación que emiten algunas partículas al ser excitadas o irradiadas por una luz ultravioleta.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	Los problemas que presenta la determinación son: La influencia del disolvente, la temperatura, la influencia del pH, el oxígeno disuelto y el efecto de la concentración sobre la intensidad de la fluorescencia.
Técnica	HPLC [17, 46 - 56]
Principio	La sustancia pasa a través de una columna con una fase estacionaria y por el bombeo de un líquido a alta presión.
Propiedad que mide	La elución depende de la polaridad del analito y del tipo de columna que se utiliza, así como el tipo de detector.
Dificultad en el análisis de las vitaminas	El elevado costo de la técnica

Según la información contenida en la **Tabla 4**, para el análisis de vitaminas liposolubles en la leche existen diversas técnicas, e.g. cromatografía de papel, en capa fina, de gases, métodos colorimétricos y espectrofotométricos, pero es indudable que la HPLC, es la técnica cromatográfica más adecuada, específica y rápida, para el análisis de vitaminas liposolubles, a pesar de su costo alto.

La ventaja que ofrece la HPLC se manifiesta en que es posible separar los derivados de cada vitamina de las sustancias interferentes. Tienen aplicación tanto la cromatografía en fase reversa como la de fase normal [52 - 55]. La mayoría de los extractos se suelen evaporar y redissolver para incrementar la

concentración de las vitaminas antes de realizar su inyección al sistema HPLC.

1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia

HPLC representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos, debido a que permite el análisis de una gran variedad de moléculas, de alto peso molecular, elevados puntos de ebullición y termolábiles, propiedades que son de restricción para el uso la cromatografía gaseosa. En HPLC, cuando se trata de cromatografía líquida en fase reversa, se refiere a la fase estacionaria, que es menos polar que la fase móvil. La fase estacionaria más utilizada está compuesta por sílice, a la cual se une el grupo octadecilsiloxano (ODS), un grupo no polar conformado por 18 carbonos que constituyen un ambiente con características no polares; esta fase retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares, ocasionando que el orden de elución sea del compuesto más polar al menos polar. Otro tipo de fase usada es la fase normal, en la cual se realiza la elución en orden inverso a la fase reversa; este último tipo de fase estacionaria es el más utilizado para el análisis de vitaminas liposolubles [9, 10, 17, 56 - 72].

En cuanto a la fase móvil, en general, está compuesta por agua y modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros. Éstos pueden ser utilizados cada uno por aparte o como mezclas, dando la opción de utilizar una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable, con el fin de proporcionar a la fase móvil diferentes grados de polaridad (elución en gradiente) durante el tiempo en el que eluyen los analitos; estas mezclas pueden realizarse gracias al uso de la bomba que además de permitir trabajar con altas presiones, se encarga de tomar diferentes solventes con proporciones predeterminadas por el analista y,

luego, preparar la mezcla en una cámara especial de mezclado. Análogo a la temperatura en cromatografía de gases, la variación de la polaridad de la fase móvil a lo largo de la separación, es uno de los parámetros que se aplica para mejorar la eficiencia de separación [48-53].

En cuanto a la detección de los analitos, los detectores utilizados en HPLC deben ser dispositivos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (fase móvil) y un sólido (analitos disueltos). Uno de los detectores más utilizados es de arreglo de diodos, ultravioleta-visible (DAD UV-Vis). Este tipo de detector mide la absorbancia del analito. Además, posee buena sensibilidad y rango lineal, que permiten detectar analitos en el orden de los nanogramos y en amplio rango de concentraciones. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes; permite trabajar en el rango de longitudes de onda entre 190 - 700 nm, y obtener tanto el respectivo cromatograma, como el espectro UV-Vis de cada uno de los picos observados en el cromatograma [48 - 53].

2. CIENCIOMETRÍA

La bibliometría es un instrumento que permite cuantificar la actividad científica. Los análisis bibliométricos evalúan a la ciencia como una disciplina o actividad económica. Los resultados del análisis bibliométrico permiten analizar y trazar las políticas de investigación. Algunos de los elementos utilizados para realizar la bibliometría son las bases de datos de artículos y patentes [73,74].

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre las vitaminas liposolubles en la leche, se realizó un estudio bibliométrico de la producción científica existente, según las bases de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)* y *Scopus*.

2.1 PUBLICACIONES POR AÑOS, PAÍSES Y CATEGORÍAS.

En la **Figura 6**, se observa la comparación evolutiva de las publicaciones sobre vitaminas liposolubles en leche. La figura muestra, que el número de las publicaciones comprendido entre el año 2001 - 2008 ha fluctuado y para este periodo de tiempo, no se puede especificar con exactitud la tendencia. Se observa que en los años 2003, 2004, y 2006 el número de publicaciones ha decrecido.

Los países que tienen mayor número de publicaciones (**Figura 7**) sobre vitaminas liposolubles son Estados Unidos (12 artículos), seguido de España (11 artículos), durante los años 2001 - 2008.

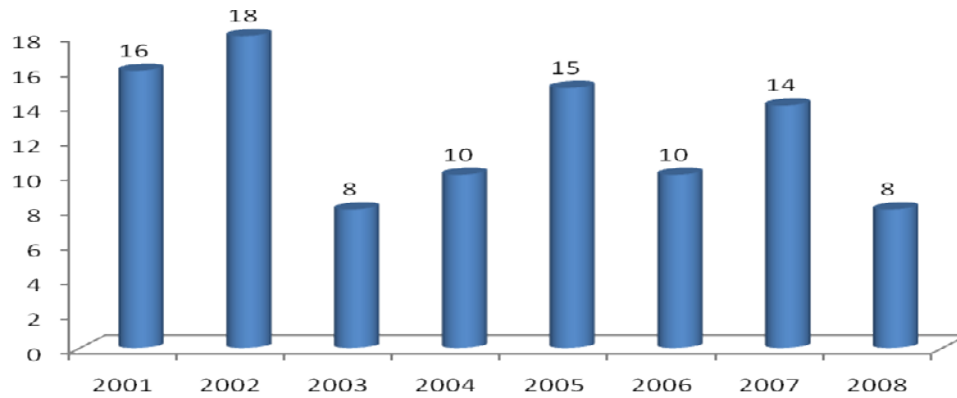


Figura 6. Número de publicaciones sobre vitaminas liposolubles en leche, según los años. Fuente: *ISI Web of Science (WOS)*. Intervalo de búsqueda: de 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de búsqueda: TS=(*vitamins fat soluble milk*).

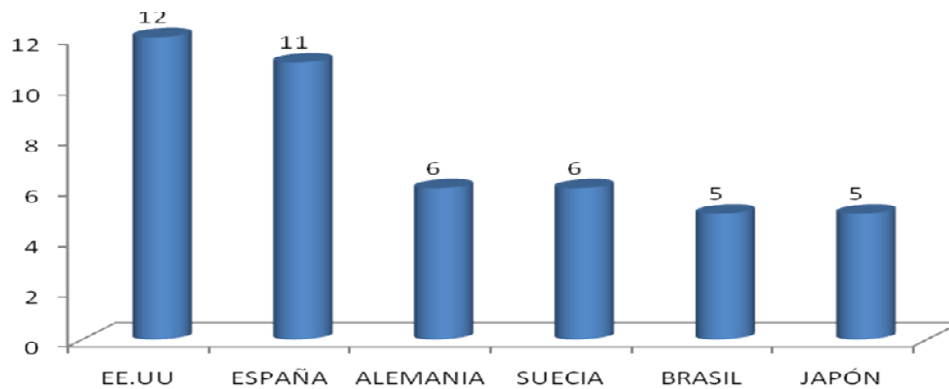


Figura 7. Número de publicaciones, por países sobre vitaminas liposolubles en leche. Fuente: *ISI Web of Science (WOS)*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de búsqueda: TS=(*vitamins fat soluble milk*).

2.2 PATENTES

La información recopilada por la base de datos *SCOPUS* muestra que la vitamina que presenta una mayor cantidad de patentes es la vitamina D

(**Tabla 5**). Estos resultados sugieren que hay un mayor interés comercial y científico por este compuesto. Las últimas patentes reportadas en los Estados Unidos están enfocadas en sintetizar análogos de la vitamina D, para producción de nuevos medicamentos y para otras aplicaciones [75 - 77].

Tabla 5. Patentes sobre vitaminas liposolubles. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: *(TITLE (vitamin) AND TITLE(A))*, *(TITLE (vitamin) AND TITLE (E))*, *(TITLE (vitamin) AND TITLE (D))* y *(TITLE (vitamin) AND TITLE (K))*.

VITAMINA	Nº DE REGISTROS EN OFICINAS DE PATENTES			
	EE.UU	WIPO*	EUROPA	JAPÓN
D	555	343	287	147
A	360	128	156	68
E	178	74	85	98
K	49	39	29	51

**World Intellectual Property Organization (WIPO)*

2.3 PUBLICACIONES O FUENTES NO-FORMALES EN INTERNET

En la gráfica se observa que la vitamina con mayor número de publicaciones es la vitamina E (**Tabla 6**); muchas de estas publicaciones tratan sobre las interacciones metabólicas, entre estas sustancias y los ácidos grasos poliinsaturados y sobre nuevas fuentes de adquisición de esta vitamina [78, 79].

Tabla 6. Publicaciones en *internet* sobre vitaminas liposolubles. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: *(TITLE (vitamin) AND TITLE (A))*, *(TITLE (vitamin) AND TITLE (E))*, *(TITLE (vitamin) AND TITLE (D))* y *(TITLE (vitamin) AND TITLE (K))*.

PUBLICACIONES O FUENTES NO-FORMALES EN <i>INTERNET</i>	VITAMINA			
	K	A	D	E
<i>General Scientific Web</i>	1151	3584	4198	4970
<i>Medicine & Old Medicine</i>	474	2620	798	1006
<i>NDLTD: Theses & Dissertations</i>	5	37	28	36
<i>T-Space: University of Toronto</i>	1	12	3	6

2.4 REVISTAS CIENTÍFICAS

Las vitaminas A y E aparecen con mayor número de artículos en la siguiente revista: *Journal of Nutrition* (**Figura 8 y 9**); las vitaminas D y K, en las revistas *Calcified Tissue Internacional* y *Journal of Biological Chemistry*, respectivamente (**Figura 10 y 11**).

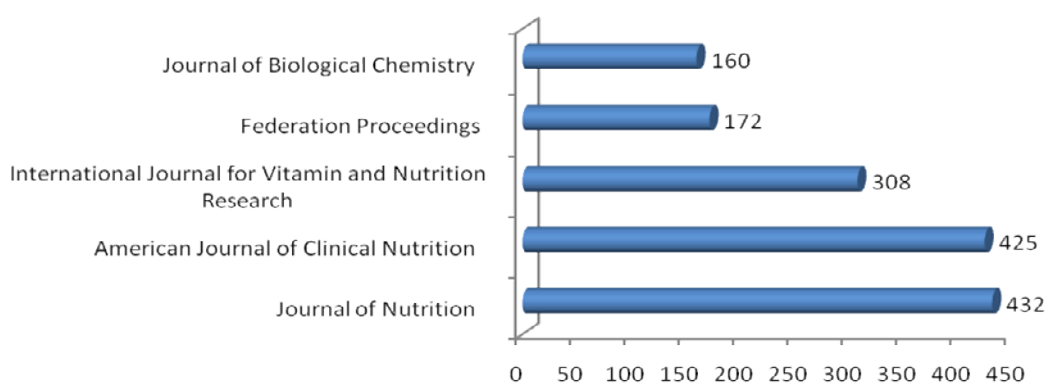


Figura 8. Publicaciones en revistas sobre vitamina A. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: *(TITLE (vitamin) AND TITLE(A))*.

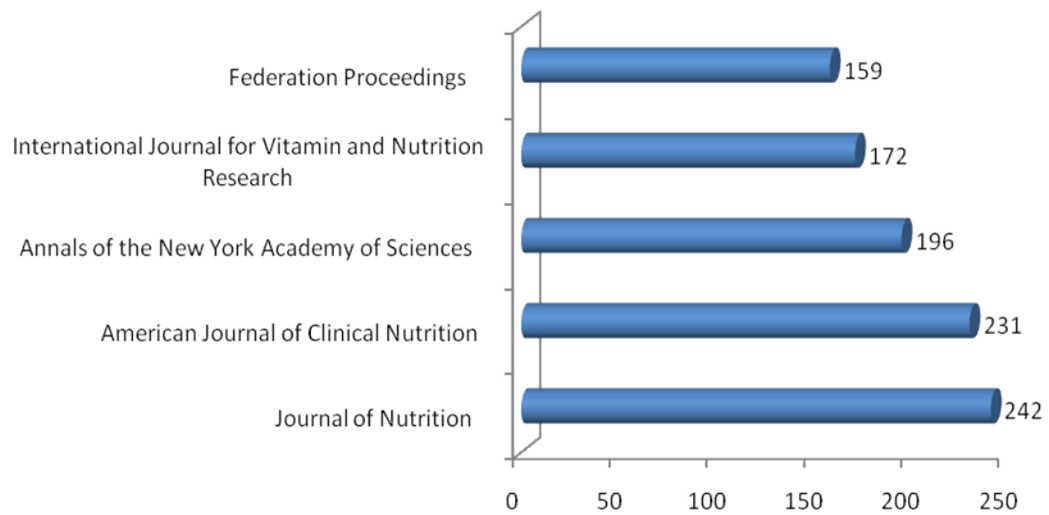


Figura 9. Publicaciones en revistas sobre vitamina E. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: (TITLE (*vitamin*) AND TITLE (*E*)).

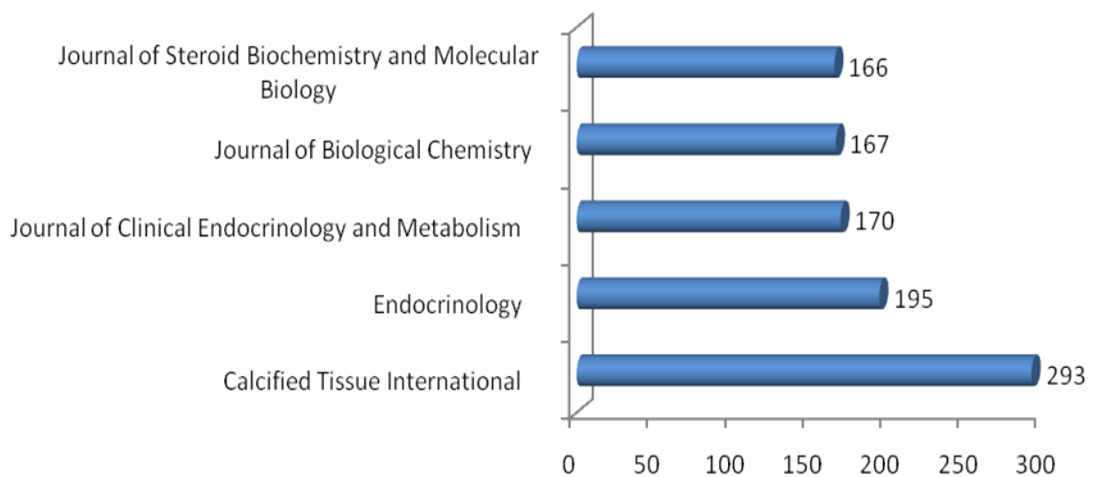


Figura 10. Publicaciones en revistas sobre vitamina D. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: (TITLE (*vitamin*) AND TITLE (*D*)).

En *Journal of Nutrition* se encuentra el artículo con mayor número de citas, sobre vitaminas, el realizado por *Ascherio, A.* y colaboradores [80]. En el trabajo se establecen correlaciones entre vitaminas A y E y la ingesta y las concentraciones plasmáticas de carotenoides y tocoferoles, en hombres y mujeres.

En la revista *Calcified Tissue International* se encuentra el artículo con mayor número de citas sobre la vitamina D, realizado por *Heikinheimo* y colaboradores, en el trabajo se hace la correlación entre la vitamina D y las fracturas de los huesos [81].

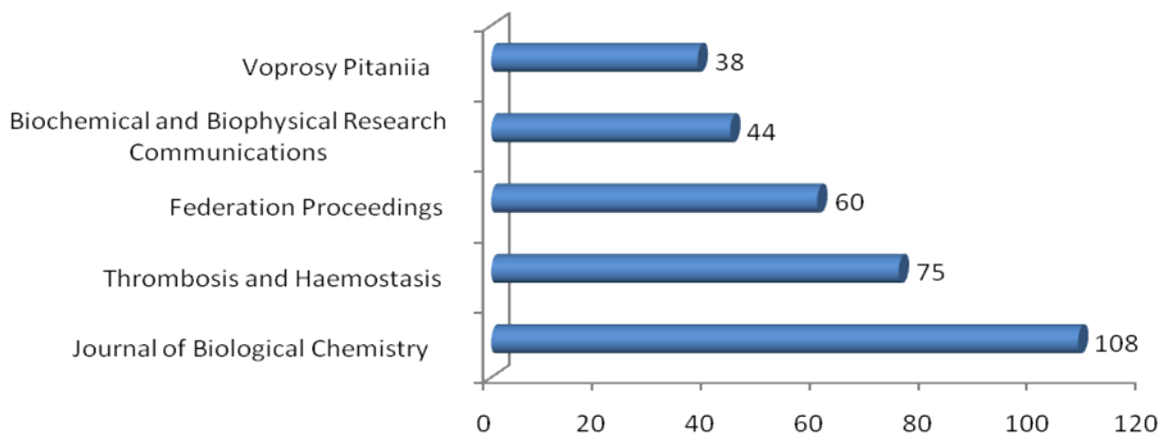


Figura 11. Publicaciones en revistas sobre vitamina K. Fuente: Base de datos *Scopus*. Intervalo de búsqueda: 2001 - 2008. Fecha de consulta: 07/06/2008. Ecuación de Búsqueda: (TITLE (vitamin) AND TITLE (K)).

En la revista *Calcified Tissue International* se encuentra el artículo con mayor número de citas sobre la vitamina K, realizado por *Heikinheimo* y colaboradores; en el trabajo trata sobre el origen de la proteína en los huesos que depende de la vitamina K, que se encuentra en el plasma [82].

En la **Tabla 7**, se muestra un resumen de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre vitaminas en leche. En general; se observa, que existe una posibilidad de incursionar en la determinación simultánea de vitaminas liposolubles, puesto que la cantidad de artículos referentes al tema no es elevada. Además los estudios que se realizan; se efectúan, para cada vitamina en particular y no en conjunto, como se realizó en esta investigación.

Tabla 7. Resumen análisis cuantitativo.

OBSERVABLE	VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN LECHE
PUBLICACIONES POR AÑO	Mayor número: 18 en el 2002
PUBLICACIONES POR PAÍSES	Mayor número: 12 en EE.UU.
PATENTES	555 sobre vitamina D, <i>US Patent Office</i>
EN FUENTES NO-FORMALES EN <i>INTERNET</i>	4970 publicaciones sobre vitamina E
REVISTAS CIENTÍFICAS	Vitamina A y E <i>Journal of Nutrition</i> . Vitamina D <i>Calcified Tissue International</i> . Vitamina K <i>Journal of Biological Chemistry</i>

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 gálico (98%, Sigma Aldrich, Madrid, España), agua, metanol, grado HPLC (*J.T. Baker*, México, D.F., México).

3.1.2 Material de referencia certificado. En la **Tabla 8** se muestran las sustancias de referencia certificadas, empleadas en este estudio.

Tabla 8. Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.

Sustancia	Pureza (%)	Nº de Lote	Fabricante
Acetato de retinilo	99	46958	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Acetato de α -tocoferol	96	T3376	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Ergocalciferol	99	47768	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Filoquinona, k1	98	47773	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Menadiona, k3	99	47775	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Palmitato de retinilo	99	46959-U	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Menaquinona	98	V9378	Sigma-Aldrich (Missouri, EE.UU.)
α -Tocoferol	99	T1782	Sigma-Aldrich (Missouri, EE.UU.)
γ -Tocoferol	99	258024	Sigma-Aldrich (Missouri, EE.UU.)
Retinol	99	121065	Riedel de Haën(Buchs, Suiza)

3.1.3 Material de laboratorio. Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 de Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), balones aforados de 200 mL, vasos de precipitado de 100 mL, embudo de decantación y tubos de ensayos de Schott (Texas, EE.UU.), micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micropipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtros de membrana PVDF de 0.45 μ m de Millipore (Sao Pablo, Brasil), microjeringa para inyección de 50 μ L de Agilent Technologies (Melbourne, Australia).

3.2 MATERIAL LÁCTEO

Se utilizaron muestras de *yogurt*, leche entera, leche cruda (de cantina), leche en polvo (para niños), y leche *Light* UHT adquiridas en el mercado local.

3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC/DAD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido AT 1200 Series (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), que consta de una bomba cuaternaria AT G1354A, un inyector manual AT Series 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B, con una columna AT apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 μ m) (**Figura 12**). El procesamiento de los datos se realizó a través del *software Agilent ChemStation LC*.



Figura 12. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia AT1200 Series.

3.3.1 Método cromatográfico: Para el análisis simultáneo de las vitaminas liposolubles, se evaluaron las condiciones cromatográficas, a saber: longitud de onda y composición de la fase móvil.

3.3.1.1 Selección de la longitud de onda: La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de las vitaminas menadiona, retinol, acetato de retinilo, ergocalciferol, (+)- γ -tocoferol, (+)- α -tocoferol, menaquinona, acetato de α -tocoferilo, filoquinona y palmitato de retinilo. Para ello, se tomó el espectro ultravioleta - visible de cada vitamina, realizando un barrido en la región de 190 a 900 nm.

3.3.1.2 Selección de la fase móvil: Se evaluaron las siguientes proporciones de solventes:

a. Análisis en régimen isocrático, con metanol.

b. 80:20, metanol:agua.

c. 90:10, metanol:agua.

d. Análisis con gradiente, 95:5 (metanol:agua) hasta los 11 min; 100% metanol hasta los 45 min y 95:5 (metanol:agua) hasta los 50 min.

Flujo de 1 mL/min para todas las corridas. Volumen de inyección, $V_{iny}= 10 \mu\text{L}$.

3.3.2 Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica:

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de las 10 vitaminas liposolubles evaluadas, se calcularon: el factor de retención (k'), factor de selectividad (α), número de platos teóricos (N) y la resolución (R_s) de los picos cromatográficos [48-53]. Los parámetros se establecieron según las **Ecuaciones 1- 4**.

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

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{(Ecuación.2)}$$

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

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{w_{bA} + w_{bB}} \quad \text{(Ecuación.4)}$$

Donde:

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

t_M = Tiempo muerto (min);

w_b = Ancho del pico (min) sobre la línea base;

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

3.3.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC: 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 de Requerimientos Técnicos para Registro de Fármacos para uso Humano (ICH) [83].

3.3.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas: La repetibilidad del método cromatográfico se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV, %, **Ecuación.5**) [84, 85] del t_R y del área, para una concentración de 10 ppm de cada una de las vitaminas analizadas.

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

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

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{n=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{(Ecuación.7)}$$

Donde

\bar{X} = promedio de los datos

S = desviación estándar

3.3.3.2 Evaluación del rango dinámico lineal (RDL), la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico: El RDL y la sensibilidad del método se calcularon empleando la curva de calibración realizada en el intervalo de 0,5 a 25 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%.

3.3.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC). A partir de la señal analítica más pequeña discernible, y_L , que pueda ser medida y no corresponda a una fluctuación aleatoria de la medida del blanco, y_B , depende de a cuantas unidades de desviación estándar del blanco (S_B) está y_L de \bar{y}_B (promedio de las medidas del blanco) y para determinar el (NMD), se define que:

$$y_L = \bar{y}_B + kS_B \quad \text{(Ecuación.8)}$$

Donde k es un valor que se elige de acuerdo con el nivel de confianza que se desee, generalmente 3. La concentración límite es una función de y_L y por lo tanto:

$$NMD = \frac{(y_L - \bar{y}_B)}{m} \quad \text{(Ecuación.9)}$$

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 de la curva de calibración. El nivel mínimo de cuantificación (NMC) se definió para un valor de $k=10$ [84, 85].

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

3.3.3.4 Selección del método: para aislar las vitaminas liposolubles presentes en las muestras de la leche, se contemplaron dos métodos, a saber: (1). Extracción directa del material lipídico y (2). Saponificación de la matriz con posterior extracción de los analitos de interés. La saponificación

es una reacción química entre un ácido graso y una base o álcali, en la que se obtiene como principal producto la sal entre dicho ácido y la base [3,4].

3.3.3.5 Exactitud del método: la exactitud se evaluó como el porcentaje de recuperación de las vitaminas analizadas. Se realizó un diseño experimental factorial 2^3 (ver **Figura 13**) que permitió seleccionar las condiciones en la etapa de preparación de la muestra, para obtener la recuperación más alta de las vitaminas. Para ello, se seleccionaron las vitaminas retinol, D₂, α -tocoferol y K₁, debido a que, bajo las condiciones de extracción, la temperatura de hidrólisis, solvente de extracción y uso de un antioxidante (ácido gálico), sus características son semejantes a los isómeros restantes de cada una de ellas. Los ensayos se realizaron enriqueciendo muestras de leche sin vitaminas (blancos de la matriz).

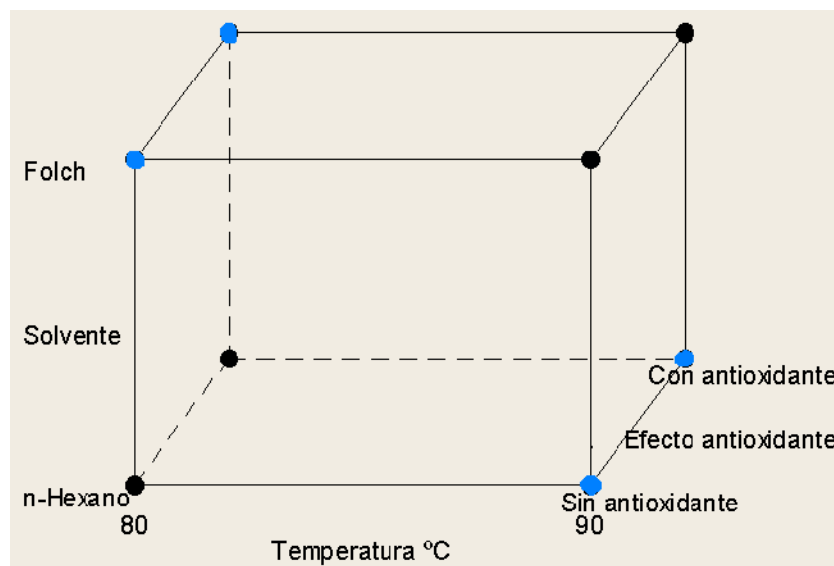


Figura 13. Diseño experimental factorial 2^3 , utilizado en el presente trabajo para establecer las mejores condiciones para la extracción simultánea de vitaminas (en los vértices de color azul se realizaron triplicados).

En la **Tabla 9** se muestran las variables, i.e. temperatura, solvente y el uso de antioxidante (ácido gálico), empleadas en el diseño experimental del presente trabajo.

Tabla 9. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados en el presente trabajo.

Variable	Niveles	
	1	2
Temperatura, °C	80	90
Solvente	Folch	<i>n</i> -Hexano
Efecto antioxidante	Sin antioxidante	Con antioxidante

Los experimentos realizados se muestran en la **Tabla 10**. En el cubo formado (**Figura 15**) se realizaron triplicados de cuatro vértices (color azul), para observar la dispersión del ensayo, correspondiente a los vértices sombreados.

Tabla 10. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial.

Nº de experimentos	Temperatura, °C	Solvente	Efecto antioxidante
1	80	Folch	sin antioxidante
2	90	Folch	sin antioxidante
3	80	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante
4	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante
5	80	Folch	con antioxidante
6	90	Folch	con antioxidante
7	80	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante
8	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante
9	80	Folch	sin antioxidante
10	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante
11	80	Folch	sin antioxidante
12	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante
13	80	Folch	con antioxidante
14	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante
15	80	Folch	con antioxidante
16	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante

El análisis del diseño experimental se realizó usando el *software* estadístico MINITAB, versión 15, desarrollado por MINITAB INC.

3.3.3.6 Evaluación de la reproducibilidad: La reproducibilidad fue evaluada como el CV, % del porcentaje de recuperación, representado en las áreas del cromatograma, de un triplicado del análisis de una muestra de leche enriquecida con 10 ppm de las vitaminas liposolubles retinol, D₂, α -tocoferol, γ -tocoferol, K₁, K₂ y K₃ y analizadas bajo las condiciones obtenidas en el diseño experimental.

3.4 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC/DAD DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN MUESTRAS DE LECHE

Se realizó la determinación y cuantificación por HPLC/DAD de las vitaminas, K₁, K₂, K₃, retinol, D₂, γ -tocoferol y α -tocoferol en muestras de *yogurt*, leche entera, leche cruda (de cantina), leche en polvo (para niños), y leche *Light* UHT, adquiridas en el mercado local.

3.4.1 Determinación: Se realizó comparando los t_R y los espectros ultravioleta de los picos cromatográficos correspondientes a cada una de las vitaminas de referencia, con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de las matrices lácteas, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

3.4.2 Cuantificación: Para la cuantificación de cada una de las vitaminas en las muestras de leche analizadas, se empleó la técnica de estandarización externa. Para ello, se utilizó el factor de respuestas (R_f) establecido del análisis de las soluciones patrón de vitaminas en diferentes concentraciones (ver **Tabla 11**).

Tabla 11. Preparación de las concentraciones de trabajo para realizar la curva de calibración.

V (μ L) de la soluciones <i>stock</i> de 1000 (μ g/mL)	Concentración (μ g/mL) de las soluciones de trabajo
0,5	0,5
1,0	1,0
2,5	2,5
5,0	5,0
10	10
25	25
50	50

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES

4.1.1 Método cromatográfico

4.1.1.1 Selección de la longitud de onda: En el espectro ultravioleta-visible tomado en el rango de 190 a 900 nm de cada una de las vitaminas, se observaron las longitudes de máxima absorción (**Anexo 1**) y se seleccionaron cuatro longitudes de trabajo para realizar el análisis simultáneo de las 10 vitaminas (ver **Tabla 12**).

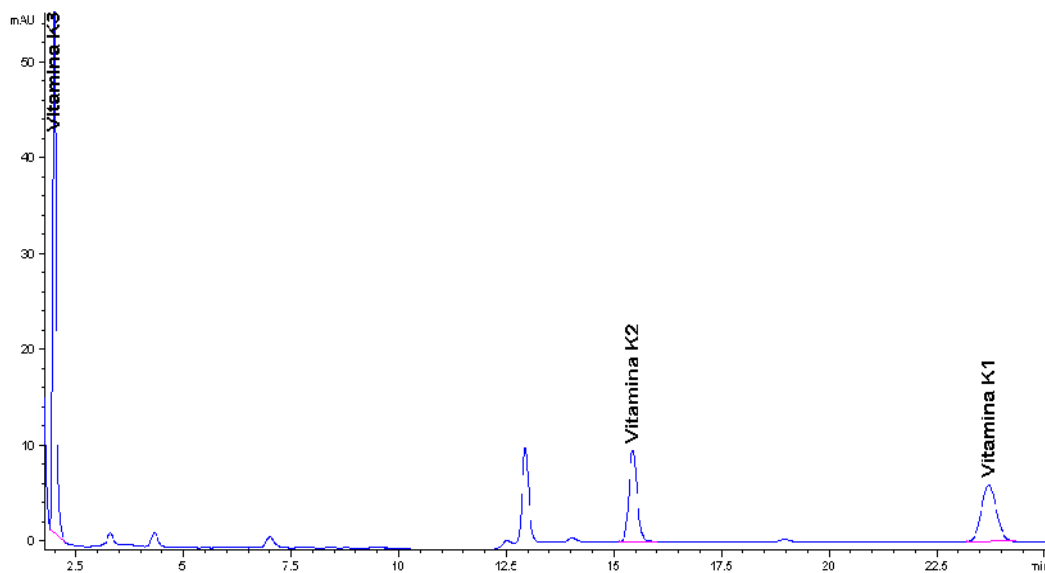
Tabla 12. Selección de longitud de onda para las vitaminas liposolubles analizadas.

Vitaminas	Longitud de onda de máxima absorción, nm	Longitud de onda establecida, nm
Filoquinona (Vitamina K ₁)	247	247
Menaquinona (Vitamina K ₂)	248	247
Menadiona (Vitamina K ₃)	235-255	247
Ergocalciferol (Vitamina D ₂)	265	265
(+)- α -Tocoferol	292	292
Acetato de α -tocoferilo	286	292
(+)- γ -Tocoferol	297	292
Retinol	324	324
Acetato de retinilo	317	324
Palmitato de retinilo	324	324

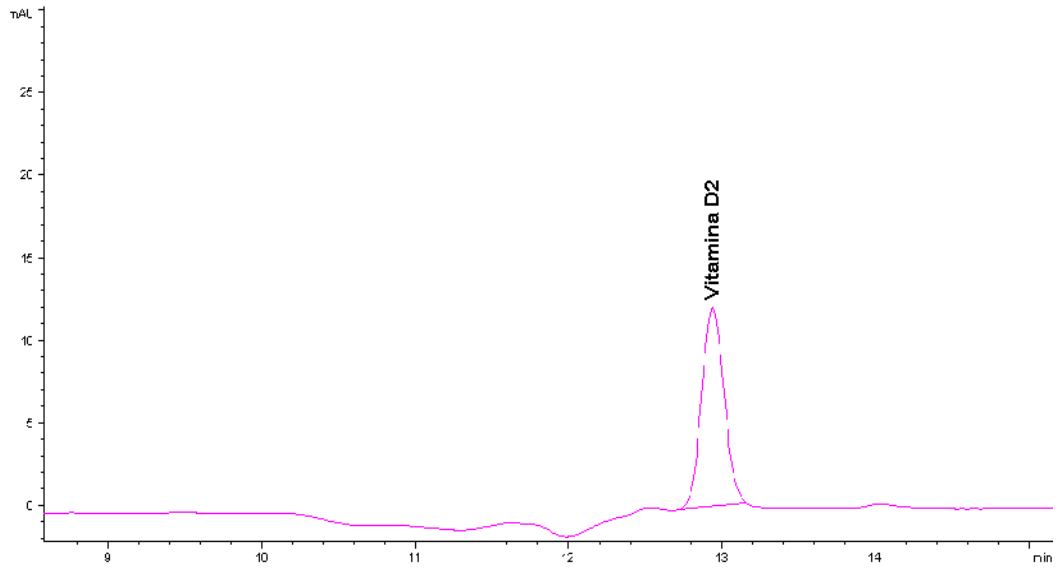
4.1.1.2 Selección de la fase móvil: Se seleccionó la fase móvil, con el siguiente gradiente: 95:5 (metanol:agua) hasta los 11 min; 100% metanol hasta los 45 min y 95:5 (metanol:agua) hasta los 50 min, porque con ello, se observó la mayor resolución de las vitaminas analizadas. En la **Figura 14** se observa el perfil cromatográfico del análisis simultáneo de la mezcla de las 10 vitaminas liposolubles (ca.10 µg/mL de cada una), a 4 longitudes de onda diferentes, en una columna C₁₈ RP. Para las vitaminas K₂ y α-tocoferol, a pesar de presentar tiempos de retención cercanos su absorbancia a la longitud de onda diferente a la seleccionada fue baja (ver **Anexo 1**).

En la **Tabla 13** se presentan los parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis simultáneo por HPLC/DAD, de las 10 vitaminas liposolubles evaluadas.

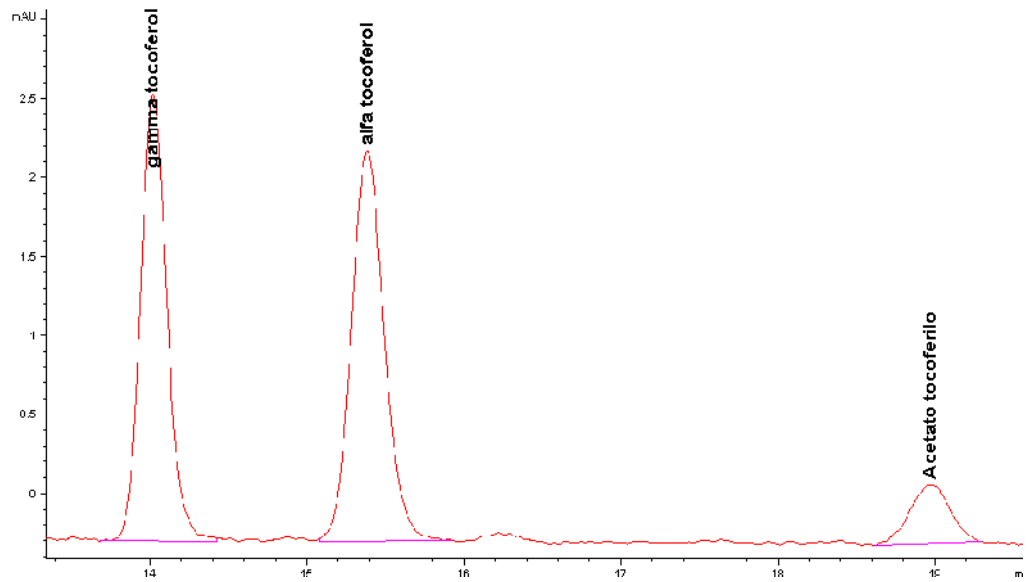
Vitaminas K, 247nm.



Vitamina D₂, 265nm



Vitaminas E, 292nm



Vitaminas A, 324nm

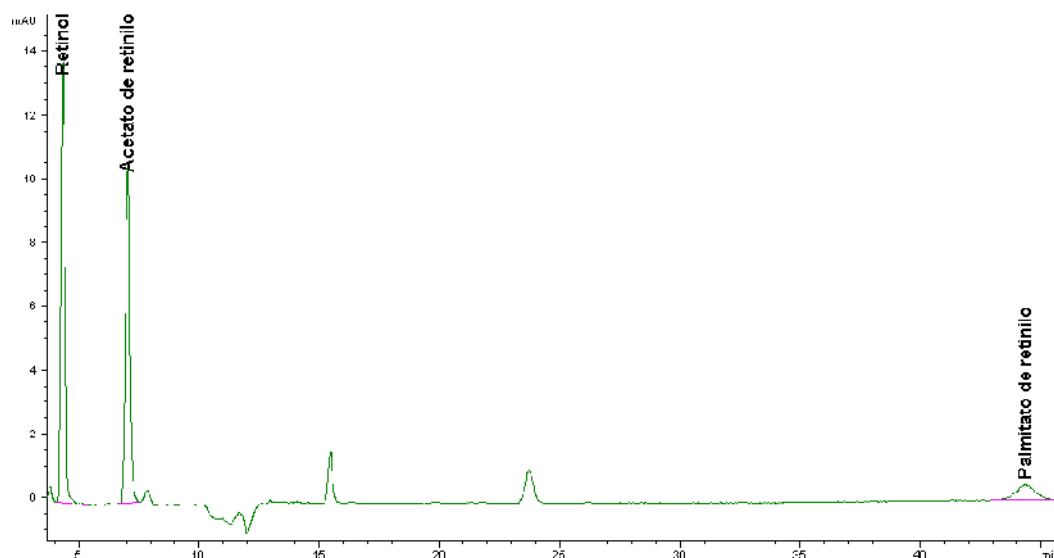


Figura 14. Perfiles cromatográficos de la mezcla de las 10 vitaminas liposolubles a diferentes longitudes de onda. Columna C₁₈ RP. Mezcla de vitaminas de 10 µg/mL, HPLC – DAD.

Tabla 13. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis simultáneo de vitaminas liposolubles por HPLC/DAD.

Parámetros	Especificaciones
Flujo	1 mL/min
Fase móvil	Gradiente, 95:5 (metanol:agua) hasta los 11 min; 100% metanol hasta los 45 min y 95:5 (metanol:agua) hasta los 50 min
Temperatura	25 °C
Volumen de inyección	10 µL
Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm)

4.1.2 Parámetros de eficiencia de la separación. En la **Tabla 14** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, determinados bajo los parámetros de operación establecidas y calculados por separado a diferentes longitudes de onda.

En la **Tabla 14** se observa, que los parámetros de eficiencia están acorde con lo reportado en la literatura [48 - 55]. Los parámetros cromatográficos seleccionados, por ende, fueron apropiados para la separación de las vitaminas liposolubles.

4.1.3 Figuras analíticas de mérito para HPLC/DAD.

4.1.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas. Al inyectar cinco veces una mezcla de vitaminas liposolubles (10 μ L, 10 ppm), se determinó la repetibilidad del método. Los resultados de la evaluación de la repetibilidad de t_R y áreas de los picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 15** y **16**, respectivamente.

En las **Tablas 15** y **16** se observa que los coeficientes de variación, CV, no superan el 3% para la medición de áreas y en t_R , y figuran dentro de lo recomendado por las GLP (*Good Laboratory Practice*) [84].

Tabla 14. Parámetros de eficiencia de la separación de las 10 vitaminas liposolubles analizadas, utilizando parámetros operacionales reportados en la **Tabla 13**.

Longitud de onda	Vitaminas	t_R , min	W_b , min	Número de platos teóricos, N	Factor de selectividad, α	Factor de retención, k'	Resolución, R_s
247nm	Menadiona (Vitamina K ₃)	1,98	0,08	3380	-	0,3	-
	Menaquinona (Vitamina K ₂)	15,36	0,20	31288	27,6	9,4	55,5
	Filoquinona (Vitamina K ₁)	23,63	0,38	21423	1,6	15,0	16,7
265nm	Colecalciferol (vitamina D ₂)	12,86	0,16	35038	-	7,7	-
292nm	(+)- γ -Tocoferol	13,94	0,18	34075	-	8,5	-
	(+)- α -Tocoferol	15,30	0,22	26010	1,1	9,4	4,0
	Acetato de α -tocoferilo	18,88	0,27	26426	1,3	11,8	8,5
324nm	Retinol	4,27	0,16	3787	-	1,9	-
	Acetato de retinilo	6,91	0,20	6471	1,9	3,7	8,5
	Palmitato de retinilo	44,19	0,85	15090	7,8	29,0	41,9

Tabla 15. Repetibilidad de los t_R de las 10 vitaminas liposolubles analizadas por HPLC/DAD.

Vitaminas	t_R , min					— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5			
K ₃	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99	0,01	0,1
Retinol	4,31	4,32	4,32	4,34	4,33	4,32	0,01	0,2
Acetato de retinilo	6,99	7,01	6,99	7,02	7,01	7,00	0,01	0,2
D ₂	12,92	12,94	12,93	12,95	12,95	12,94	0,01	0,1
(+)- γ -Tocoferol	14,01	14,02	14,01	14,03	14,03	14,02	0,01	0,1
(+)- α -Tocoferol	15,37	15,38	15,37	15,39	15,39	15,38	0,01	0,1
K ₂	15,42	15,43	15,43	15,44	15,44	15,43	0,01	0,1
Acetato de α -tocoferilo	18,94	18,97	18,96	18,98	18,99	18,97	0,02	0,1
K ₁	23,67	23,70	23,69	23,71	23,72	23,70	0,02	0,1
Palmitato de retinilo	44,27	44,33	44,33	44,34	44,38	44,33	0,03	0,1

n = 5 réplicas.

Tabla 16. Repetibilidad de áreas de picos de las 10 vitaminas liposolubles analizadas por HPLC/DAD.

Vitaminas	Área, mAU*s					— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5			
K ₃	289	293	294	298	297	294	3	1,2
Retinol	145	148	149	150	149	148	2	1,2
Acetato de retinilo	134	137	138	139	139	137	2	1,5
D ₂	123	124	124	124	125	124	1	0,8
(+)- γ -Tocoferol	32,1	33,3	32,8	33,4	33,3	33,0	0,5	1,7
(+)- α -Tocoferol	35,3	36,3	35,5	36,0	36,7	36,0	0,5	1,5
K ₂	126	128	128	130	130	128	1	1,2
Acetato de α -tocoferilo	6,7	6,9	6,8	6,8	6,7	6,8	0,1	1,1
K ₁	146	148	149	151	150	148	2	1,3
Palmitato de retinilo	26,7	27,1	26,9	26,5	27,1	26,7	0,4	1,5

n = 5 réplicas

4.1.3.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método. El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de la curva de calibración, para cada una de las 10 vitaminas liposolubles analizadas (ver **Anexo 2**). En la **Tabla 17**, se muestra, para cada vitamina, la ecuación de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que mide el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado (0,5 – 50 ppm); la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f) y la desviación estándar de la pendiente (evaluando, el área de respuesta), miden la sensibilidad del método.

Tabla 17. Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación simultánea de 10 vitaminas liposolubles, a partir de la curva de calibración (0,5 – 50 ppm), por HPLC/DAD.

Vitaminas	Ecuación	R^2	R_f	S_{Rf}	$R_f \pm tS_{Rf}$
K_3	$y = 29,95x - 5,243$	0,9992	29,95	0,01	$29,95 \pm 0,02$
Retinol	$y = 17,16x - 10,33$	0,9964	17,16	0,02	$17,16 \pm 0,04$
Acetato de retinilo	$y = 14,32x - 1,634$	0,9994	14,32	0,01	$14,32 \pm 0,02$
D_2	$y = 12,46x + 1,254$	0,9997	12,46	0,01	$12,46 \pm 0,01$
(+)- γ -Tocoferol	$y = 3,221x + 0,614$	0,9990	3,22	0,01	$3,22 \pm 0,02$
(+)- α -Tocoferol	$y = 3,519x + 0,513$	0,9985	3,52	0,01	$3,52 \pm 0,03$
K_2	$y = 12,60x + 1,012$	0,9989	12,60	0,01	$12,60 \pm 0,02$
Acetato de α -tocoferilo	$y = 0,634x + 0,276$	0,9993	0,63	0,01	$0,63 \pm 0,02$
K_1	$y = 14,54x + 1,211$	0,9988	14,54	0,01	$14,54 \pm 0,02$
Palmitato de retinilo	$y = 2,682x + 0,536$	0,9992	2,68	0,01	$2,68 \pm 0,02$

R_f : Pendiente S_{Rf} : Desviación estándar de la pendiente t: 2,57 para un 95% de confianza.

En la **Tabla 17**, se observa que el R^2 se encuentra en el rango de 0.9964-0.9997, para las curvas de calibración obtenidas en el rango evaluado, lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Por tanto, el RDL del método implementado fue de 0,5 – 50 ppm. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración. Los valores bajos de pendiente, e.g. 0,64, indican una baja sensibilidad para determinar un analito de interés.

4.1.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC). Para la determinación del NMD y NMC del DAD se siguieron los criterios descritos en la **Sección 3.3.3.3** En la **Tabla 18** se observan los NMD y NMC para cada una de las vitaminas estudiadas.

Tabla 18. Niveles mínimos de detección y de cuantificación del DAD de las vitaminas K₃, retinol, acetato de retinilo, D₂, (+) – γ -tocoferol, (+) - α -tocoferol, K₂, acetato de α - tocoferilo, K₁ y palmitato de retinilo.

Vitaminas	NMD, $\mu\text{g/L}$	NMC, $\mu\text{g/L}$
K ₃	53	176
Retinol	3	676
Acetato de retinilo	2	326
D ₂	1	269
(+)– γ -Tocoferol	9	1041
(+)– α -Tocoferol	9	2010
K ₂	2	484
Acetato de α -tocoferilo	35	8702
K ₁	2	441
Palmitato de retinilo	9	1872

4.1.3.4 Selección del método: para aislar las vitaminas liposolubles presentes en las muestras de la leche, se contemplaron dos métodos, a saber: (1). Extracción directa del material lipídico (esta metodología no se puede aplicar porque sería perjudicial para la columna del equipo HPLC) y (2). Saponificación de la matriz con una solución de KOH /MeOH 5N y posterior extracción de las vitaminas. Teniendo en cuenta las consideraciones planteadas se selecciono el método (2).

4.1.3.5 Exactitud del método: La variable de respuesta empleada para realizar el diseño experimental fue el porcentaje de recuperación de cuatro vitaminas seleccionadas, teniendo en cuenta que las características químicas de cada una son semejantes a las de sus isómeros. Los resultados obtenidos con los experimentos realizados según el diseño experimental factorial 2^3 se presentan en la **Tabla 19**.

A continuación, se definen los términos del diseño experimental.

- Variables: 3
- Experimentos: 16
- Respuesta: % Recuperación de cada vitamina
- Términos: A - Temperatura
B - Solvente
C - Efecto antioxidante
AB - Interacción temperatura - solvente
AC - Interacción temperatura - efecto antioxidante
BC - Interacción solvente - efecto antioxidante

Para determinar los valores de las tres variables seleccionadas que permitieran obtener los mejores porcentajes de recuperación en el análisis simultáneo de las vitaminas liposolubles, se tomaron los datos obtenidos de los 16 experimentos (**Tabla 19**) y se analizaron con el *software* MINITAB 15 (ver **Anexo 3**).

Tabla 19. Resultados del diseño experimental factorial 2³.

Nº de Exp.	Temperatura, °C	Solvente	Efecto del antioxidante*	Recuperación, %			
				Retinol	D ₂	(+)-α-Tocoferol	K ₁
1	80	Folch	sin antioxidante	73	26	23	44
2	90	Folch	sin antioxidante	93	55	0	0
3	80	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante	37	39	0	71
4	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante	85	51	0	52
5	80	Folch	con antioxidante	91	79	75	6
6	90	Folch	con antioxidante	82	61	3	0
7	80	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante	51	71	53	8
8	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante	92	68	42	41
9	80	Folch	sin antioxidante	92	95	73	43
10	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante	89	48	40	57
11	80	Folch	sin antioxidante	74	63	37	43
12	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante	83	52	0	51
13	80	Folch	con antioxidante	93	88	58	0
14	90	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante	82	57	0	51
15	80	Folch	con antioxidante	90	72	48	0
16	90	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante	95	58	40	49

*Ácido pirogálico (3mg)

Para el análisis de los resultados del diseño experimental factorial 2^3 , se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

1. Evaluación de los efectos principales de cada una de las variables (**Tabla 20**). El efecto principal de cada variable indica la variación promedio de la respuesta cuando cambia ese factor (**Anexo 4**).

Se calcula como la respuesta media de todos los experimentos en que la variable está en el nivel +, menos la respuesta media cuando la variable está en el nivel –.

2. La evaluación de los efectos de interacción entre las variables; es cuando una o más variables producen juntas un efecto diferente del obtenido en los efectos principales de las variables individuales.

3. Impacto de los efectos de interacción sobre los efectos principales. Al observar la **Tabla 21** de interacción, se aprecian interacciones significativas en temperatura – solvente para el retinol y D₂; solvente – antioxidante para D₂; estas interacciones priman sobre los efectos principales.

En la **Tabla 20**, se presentan los resultados del análisis de los efectos principales de las variables estudiadas para cada una de las vitaminas, y las interacciones significativas (interacciones señaladas) obtenidas con el diseño experimental empleado.

Con la información suministrada por el *software* (**Anexo 3**) se obtienen los efectos más significativos (**Tabla 21**), “aquellos que presentan un valor $p < 0,05$ que es el Valor de Probabilidad o nivel de confianza del 95%” [85].

Tabla 20. Efectos principales de las variables estudiadas sobre la recuperación de las vitaminas retinol, D₂, α -tocoferol, K₁.

Vitaminas	Temperatura, °C	Solvente	Efecto antioxidante
Retinol	90	Folch	sin antioxidante
D ₂	80	Folch	con antioxidante
(+) α -Tocoferol	80	<i>n</i> -Hexano	sin antioxidante
K ₁	80	<i>n</i> -Hexano	con antioxidante

Tabla 21. Resumen de los efectos principales de las variables estudiadas y sus interacciones.

Vitaminas	Términos	Variables	Efecto	Coefficiente
Retinol	A	Temperatura	23,10	11,55
	B	Solvente	-20,79	-10,39
	AB	Temperatura - Solvente	20,60	10,30
D ₂	A	Temperatura	28,27	14,13
	AB	Temperatura - Solvente	17,19	8,60
	BC	Solvente - Antioxidante	8,63	4,31
(+) α -Tocoferol	A	Temperatura	-45,22	-22,61
K ₁	A	temperatura	-33,06	-16,53

Al Analizar las gráficas de interacciones, (**Figuras 15-17**), normalizadas a valores de cero (0) y uno (1) para los efectos en cuestión, y que presentan puntos de corte, se debe observar el más alto valor de % de recuperación que posean, sin importar el valor de su pendiente. De los efectos más significativos, se observa que 90°C es la condición de trabajo más recomendada para el retinol y D₂. A su vez, se observa en las gráficas (valores más altos), que conviene trabajar usando como solvente *n*-Hexano y antioxidante.

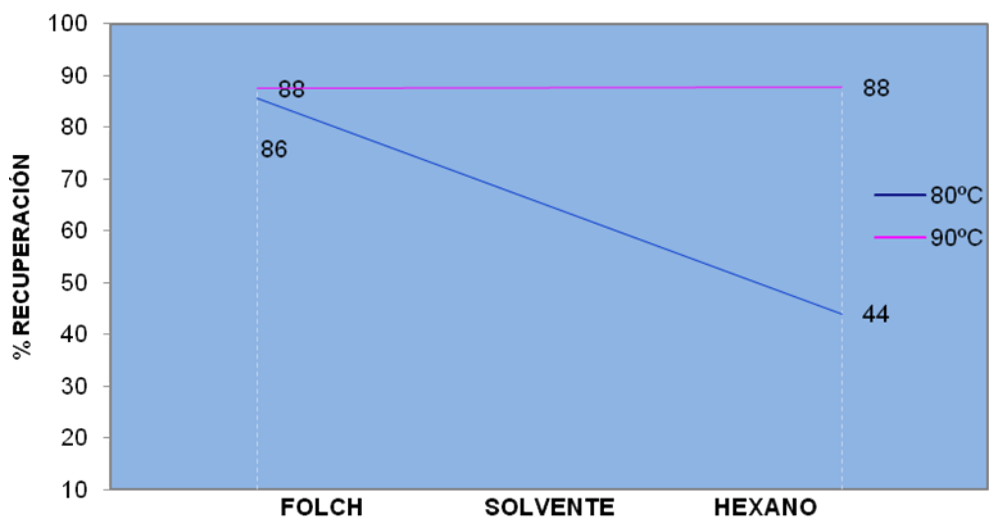


Figura 15. Interacciones entre las variables temperatura y solvente para el retinol.

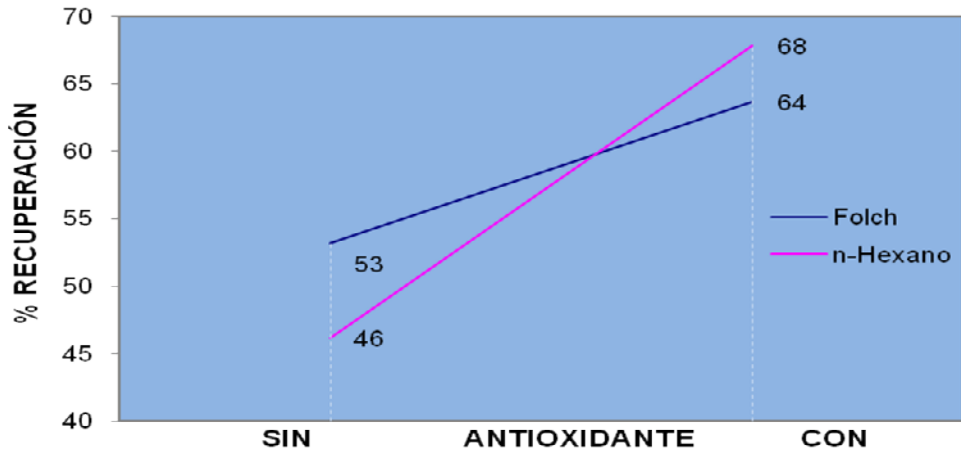


Figura 16. Interacciones entre las variables temperatura y solvente para la vitamina D₂.

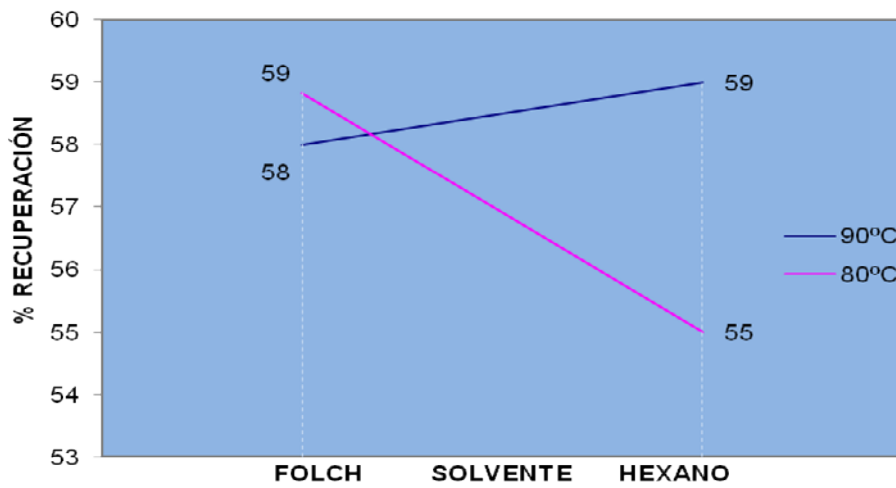


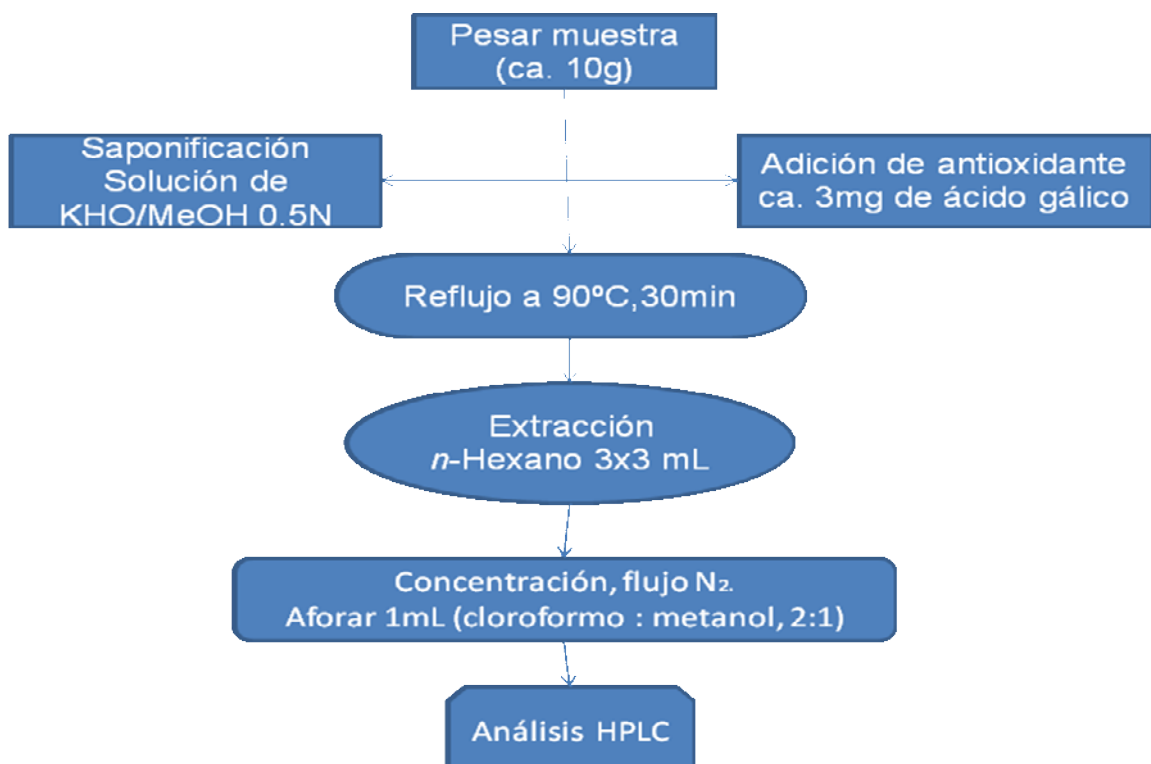
Figura 17. Interacciones entre las variables solvente y antioxidante para la vitamina D₂.

Al Unificar estas condiciones, según las gráficas de interacciones, con las de los efectos principales, se deducen las condiciones para extracción de vitaminas, así:

1. Temperatura: 90°C
2. Solvente: *n*-Hexano
3. Con antioxidante

Con estos parámetros de trabajo, se obtendrán las condiciones de extracción simultáneas de vitaminas. Este procedimiento puede resumirse en el diagrama de flujo, que aparece a continuación.

Diagrama 1. Procedimiento para la extracción de vitaminas liposolubles en leche



La cantidad de antioxidante (ácido gálico) adicionada necesaria se evaluó previamente a diferentes concentraciones (0.01, 0.03, 0.05 y 3%) y se encontró que el porcentaje de recuperación de la mezcla de vitaminas es mejor con bajos porcentajes de ácido gálico (0.01 – 0.05%) y al 3% del antioxidante este se convierte en prooxidante disminuyendo el observable (% de recuperación); también se apreció que factores como la luz y el oxígeno inciden directamente en los resultados y durante la preparación de la muestra se debe tener especial cuidado con estos factores.

Teniendo las condiciones del método de extracción, se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación. Utilizando el procedimiento de extracción de vitaminas en una leche comercial y enriqueciéndola con vitaminas liposolubles en una concentración determinada, se obtuvieron los resultados reportados en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Porcentaje de recuperación de la mezcla de vitaminas liposolubles adicionada a una leche sin vitaminas.

Vitaminas	Áreas (mAU*s)			% de recuperación	
	leche sin vitaminas	Cantidad inicial	cantidad recuperada Promedio	Promedio	
Retinol	0	2090	1755	83,97	±0,01
D ₂	8	473	414	87,53	±0,03
(+) -α -Tocoferol	0	97	68	70,1	±0,5
K ₁	0	417	188	45,08	±0,03
(+) -γ -Tocoferol	0	158	116	73,4	±0,6
K ₂	0	152	68	44,74	±0,02
K ₃	0	114	43	37,7	±0,7

n = 3 réplicas

Como se observa en la **Tabla 22**, los porcentajes de recuperación de las vitaminas fueron aceptables (70 -84%), excepto para las vitaminas K (<60%), sin embargo, es importante resaltar, que durante este procedimiento se realizó la extracción de vitaminas liposolubles simultáneamente.

4.1.3.6 Determinación de la reproducibilidad de la extracción. Para calcular la reproducibilidad de la extracción, se realizó un triplicado de una muestra de leche enriquecida con una mezcla de vitaminas liposolubles. La reproducibilidad fue evaluada como el CV, % (ver **Tabla 23**).

Tabla 23. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de leche enriquecida.

Vitaminas	Área, mAU*s			— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
α -Tocoferol	44	43	44	44	1	2
Retinol	930	960	900	930	29	3
K ₁	81	82	86	83	3	4
D ₂	580	620	580	590	25	4
γ -Tocoferol	115	118	110	114	4	4
K ₂	152	147	160	153	7	4
K ₃	114	108	105	109	5	4

En la **Tabla 23** se observan los coeficientes de variación, que se encuentran en el rango de 2 - 4 %, y cumplen con las GLP [85].

4.2 EXTRACCIÓN DE VITAMINAS EN MUESTRAS COMERCIALES

Una vez implementada la metodología de extracción simultánea y análisis de las 10 vitaminas, ésta se aplicó a productos comerciales, tales como *yogurt*, leche entera, leche cruda (de cantina), leche en polvo (para niños), y leche *Light* UHT adquiridas en el mercado local.

En las **Figuras 18-22**, se observan perfiles cromatográficos típicos de las vitaminas aisladas de diferentes muestras de leche comerciales, analizadas por HPLC-DAD en columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 RP. Las condiciones cromatográficas están descritas en la **Tabla 11** y el procedimiento de preparación de la muestra en el **Diagrama 1**.

En **Tablas 24-28** se reportan las concentraciones de vitaminas en las muestras analizadas, teniendo en cuenta los % de recuperación.

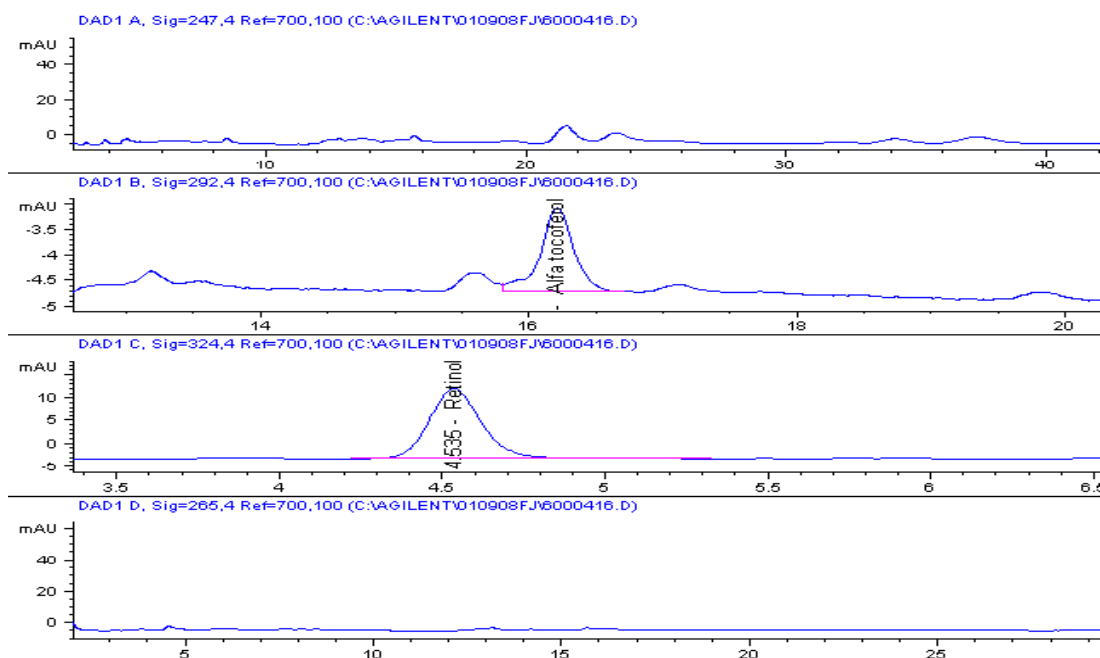


Figura 18. Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche entera aisladas y analizadas por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 24. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche entera adquirida del mercado local.

Vitaminas	$\mu\text{g}/10\text{g}$ ($\pm S$, n=2)	
K ₃	<0,32	$\pm 0,02$
Retinol	12,34	$\pm 0,04$
D ₂	<0,36	$\pm 0,01$
(+)- γ -Tocoferol	<1,27	$\pm 0,02$
(+)- α -Tocoferol	7,70	$\pm 0,03$
K ₂	<0,78	$\pm 0,02$
K ₁	<0,62	$\pm 0,02$

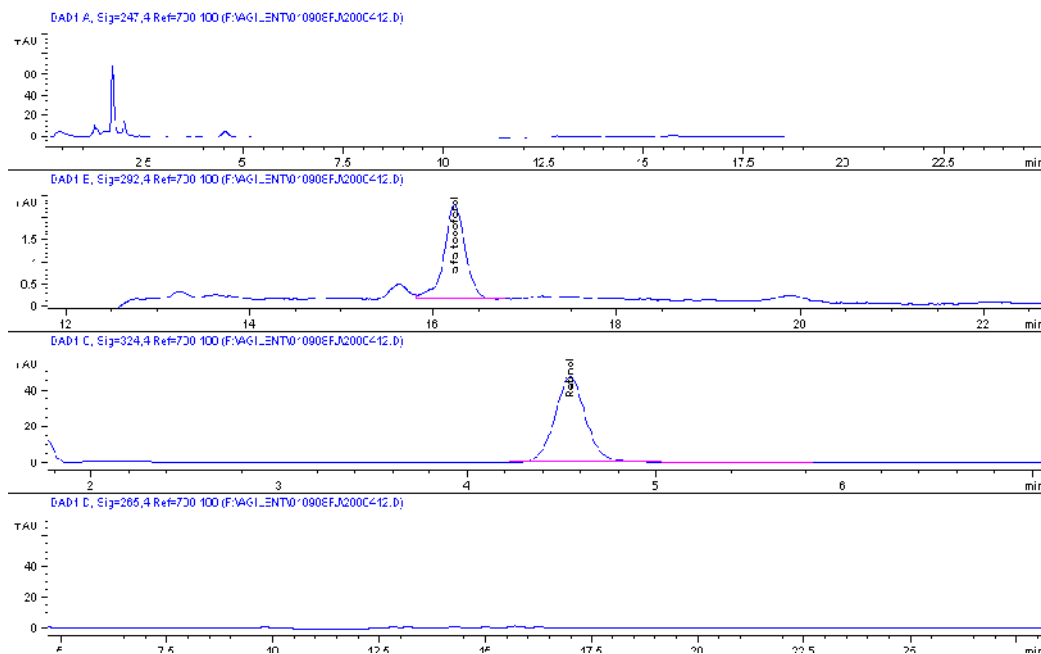


Figura 19. Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche cruda (cantina) aisladas y analizadas por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 25. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche cruda (cantina) adquirida del mercado local.

Vitaminas	$\mu\text{g}/10\text{g}$ ($\pm S$, $n=2$)	
K ₃	<0,32	$\pm 0,02$
Retinol	36,56	$\pm 0,04$
D ₂	<0,36	$\pm 0,01$
(+)- γ -Tocoferol	<1,27	$\pm 0,02$
(+)- α -Tocoferol	14,05	$\pm 0,03$
K ₂	<0,78	$\pm 0,02$
K ₁	<0,62	$\pm 0,02$

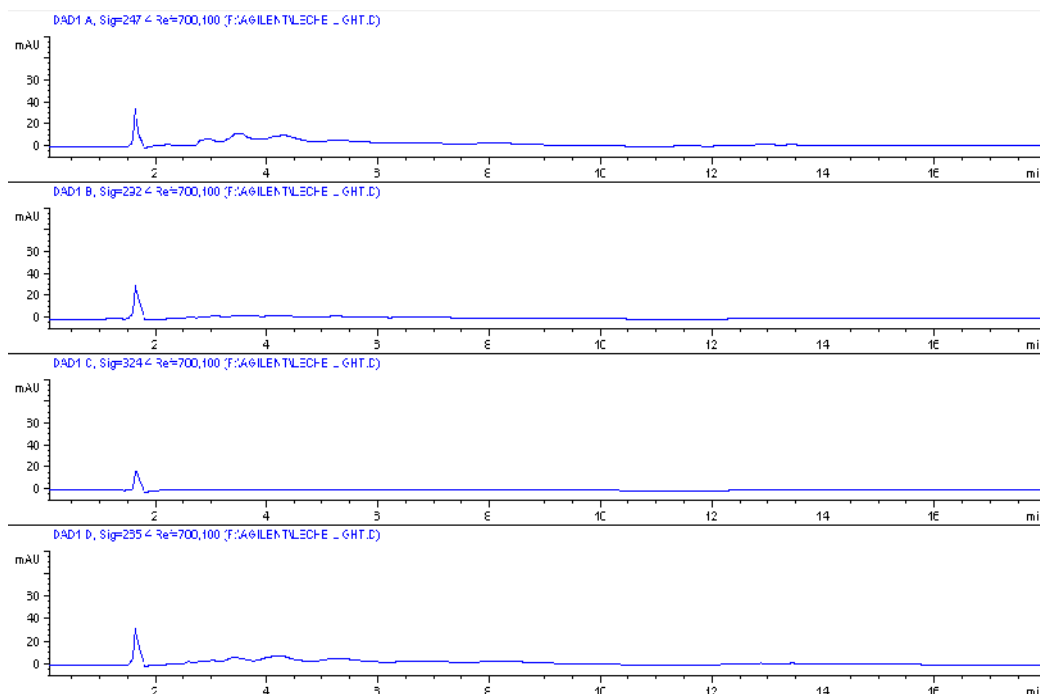


Figura 20. Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche *light* aisladas y analizadas por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 26. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche *light* adquirida del mercado local.

Vitaminas	$\mu\text{g}/10\text{g}$ ($\pm S$, n=2)
K ₃	<0,32 \pm 0,02
Retinol	<0,81 \pm 0,04
D ₂	<0,36 \pm 0,01
(+)- γ -Tocoferol	<1,27 \pm 0,02
(+)- α -Tocoferol	<2,60 \pm 0,03
K ₂	<0,78 \pm 0,02
K ₁	<0,62 \pm 0,02

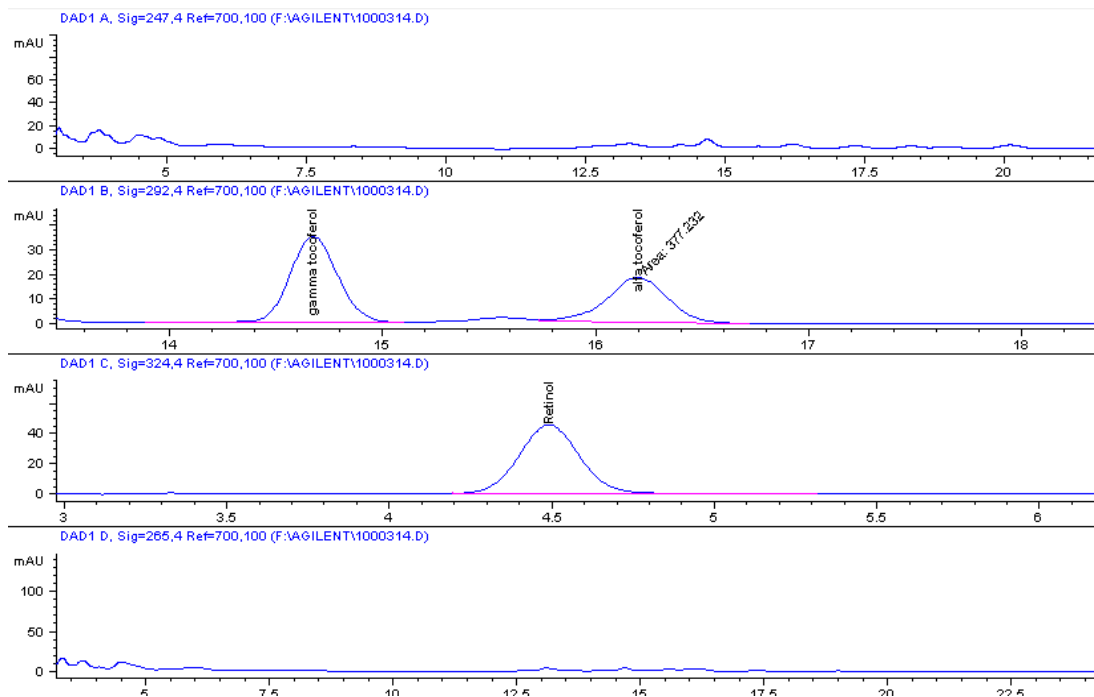


Figura 21. Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en leche en polvo (para niños) aisladas y analizadas por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 27. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en leche en polvo (para niños) adquirida del mercado local.

Vitaminas	$\mu\text{g}/10\text{g}$ ($\pm\text{S}$, n=2)
K ₃	<0,32 \pm 0,02
Retinol	47,71 \pm 0,04
D ₂	<0,36 \pm 0,01
(+)- γ -Tocoferol	303.61 \pm 0,02
(+)- α -Tocoferol	179.65 \pm 0,03
K ₂	<0,78 \pm 0,02
K ₁	<0,62 \pm 0,02

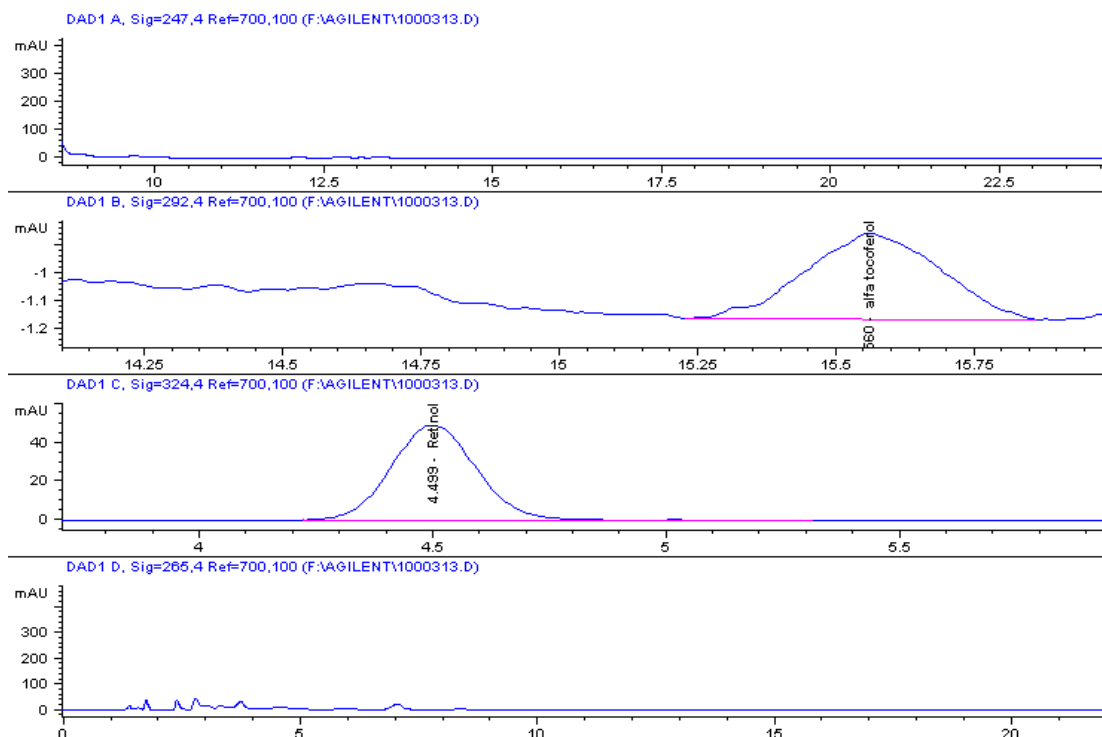


Figura 22. Perfil cromatográfico de vitaminas liposolubles en *yogurt* aisladas y analizadas por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 28. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g}/10\text{g}$) en *yogurt* adquirido del mercado local.

Vitaminas	$\mu\text{g}/10\text{g}$ ($\pm\text{S}$, n=2)
K ₃	<0,32 \pm 0,02
Retinol	50.55 \pm 0,04
D ₂	<0,36 \pm 0,01
(+)- γ -Tocoferol	<1,27 \pm 0,02
(+)- α -Tocoferol	3.39 \pm 0,03
K ₂	<0,78 \pm 0,02
K ₁	<0,62 \pm 0,02

Como se puede apreciar la metodología puede ser aplicada a diferentes matrices lácteas (*yogurt*, leche entera, leche cruda (de cantina), leche en polvo (para niños), y leche *Light* UHT adquiridas en el mercado local).

En la **Tabla 29** el producto terminado con mayor contenido vitamínico es la leche en polvo para niños. Además se observa que la leche cruda (cantina), presenta una mayor concentración de vitaminas que la leche procesada (en este caso leche entera y leche *light*) no enriquecida con vitaminas.

También se aprecia que los resultados son cercanos con los reportados en las tablas de los productos, lo que indica estimando que el procedimiento empleado es confiable.

4.3 COSTOS DEL ENSAYO

En los costos del ensayo, se realizó, una evaluación real de los volúmenes de solvente, depreciación de los equipos, salarios de los operarios entre otros. Los cuales están resumidos en el **Anexo 5**. Estos, son competitivos contra los valores que presentan las empresas y laboratorios a nivel nacional.

Tabla 29. Resultados generales de los contenidos vitamínicos, de las diferentes matrices evaluadas y concentraciones reportadas en las tablas nutricionales de los productos.

Vitaminas	leche entera		leche cruda		leche <i>light</i>		leche en polvo (para niños)		yogurt	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	µg/10g (±S, n=2)		µg/10g (±S, n=2)		µg/10g (±S, n=2)		µg/10g (±S, n=2)		µg/10g (±S, n=2)	
K ₃	<0,32 ± 0,02	NR	<0,32 ± 0,02	NR	<0,32 ± 0,02	NR	<0,32 ± 0,02	NR	<0,32 ± 0,02	NR
Retinol	12,34 ± 0,04	NR	36,56 ± 0,04	NR	<0,81 ± 0,04	NR	47,71 ± 0,04	52	50,55 ± 0,04	50
D ₂	<0,36 ± 0,01	NR	<0,36 ± 0,01	NR	<0,36 ± 0,01	NR	<0,36 ± 0,01	NR	<0,36 ± 0,01	NR
(+)-γ-Tocoferol	<1,27 ± 0,02	NR	<1,27 ± 0,02	NR	<1,27 ± 0,02	NR	303.61 ± 0,02	350	<1,27 ± 0,02	NR
(+)-α-Tocoferol	7,7 ± 0,03	NR	14,05 ± 0,03	NR	<2,60 ± 0,03	NR	179.65 ± 0,03	200	3.39 ± 0,03	NR
K ₂	<0,78 ± 0,02	NR	<0,78 ± 0,02	NR	<0,78 ± 0,02	NR	<0,78 ± 0,02	NR	<0,78 ± 0,02	NR
K ₁	<0,62 ± 0,02	NR	<0,62 ± 0,02	NR	<0,62 ± 0,02	NR	<0,62 ± 0,02	5	<0,62 ± 0,02	NR

Para la comparación de los resultados presentes en las etiqueta se realizó la respectiva unificación de unidades.

NR: no reportado

A: Concentración determinada

B: Concentración reportada en la tabla nutricional del producto

5. CONCLUSIONES

Las metodologías implementadas para el análisis simultáneo de filoquinona, menadiona, menaquinona, acetato de retinilo, acetato de α -tocoferilo, ergocalciferol, palmitato de retinilo, α -tocoferol, γ -tocoferol y retinol por las técnicas analíticas HPLC/DAD cumplen con los requerimientos establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio, y aseguran, de esta manera, la calidad y la confianza en los resultados y, por ende, su aplicación para el análisis de vitaminas en matrices lácteas, analizadas.

La variable que más incidencia tuvo sobre el porcentaje de recuperación en la etapa de preparación de la muestra fue la temperatura. Se estableció que las mejores condiciones de extracción fueron con *n*-Hexano con adición de ácido gálico y a 90°C.

Se implementó un método HPLC para la determinación de 10 vitaminas liposolubles en productos lácteos, que permite lograr porcentajes de recuperación altos (70 - 84%) y que presentan coeficientes de variación que cumplen con las recomendaciones de las buenas prácticas de laboratorio para los tiempos de retención (0.1 – 0.2%) y áreas cromatográficas (0.8 -1.7%).

6. RECOMENDACIONES

Como se pudo apreciar, el porcentaje de recuperación de las vitaminas K₁, K₂ y K₃ (38 - 45%) es bajo y cabe la posibilidad de buscar otra alternativa para aislarla y cuantificar a esta vitamina solamente.

Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los analitos, es importante que se realice el proceso de extracción bajo atmósfera de N₂, con ausencia de luz y la determinación cromatográfica se debe realizar en un periodo de tiempo inferior a 48 horas.

Evaluar la metodología establecida para el análisis de vitaminas liposolubles por HPLC/DAD, empleando un detector de fluorescencia, FLD, ya que éste es más sensible y selectivo frente a algunas vitaminas.

BIBLIOGRAFÍA

1. "Vitaminas". Enciclopedia Microsoft Encarta. Edición 2007, Microsoft Corporation. Washington, **2007**.
2. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST 69, June **2005**. [sitio en Internet] Libro Web de Química del NIST. Disponible en <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acceso el 25 de septiembre del 2007.
3. CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. Bioquímica. Cuarta Edición, Thomson Internacional. México D.F., **2004**, p.p. 212-218.
4. MATHEWS, C.K.; HOLDE, V.K.; AHERN, K.G. Bioquímica. 3^{ra} Edición Pearson, Madrid, **2004**, p.p.776-780.
5. ROZO, C.; MAMONE, M. Vitaminas, agentes nutritivos y terapéuticos. Ediciones Doyma S.A. Barcelona, **1986**, p.p. 11-22.
6. GSTIRNER, F. Métodos fisicoquímicos para la determinación de vitaminas. Editorial Manuel Marín, Barcelona, **1944**, p.p.227.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Ithaca, New York, **2004**, p.p.341.
8. QUESADA, J.M.; MATA-GRANADOS, J.M.; LUQUE, M.D. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, 89, p.p. 473–477.
9. HARTMANN, S.; FROESCHEIS, O.; RINGENBACH, F.; WYSS, R.; BUCHELI, F.; BISCHOF, S.; BAUSCH, J.; WIEGAND, U.W. Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2001**, 751, p.p. 265–275.

10. CHATZIMICHALAKIS, P.F.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2004**, 805, p.p. 289–296.
11. VOGEL, S.; ROSEANN, P.I.; SHEILA, M.O.; KAKO, Y.; QUADRO, L.; GOTTESMAN, M.E.; GOLDBERG, I.J.; BLANER, W.S. Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision, *Biochemistry*, **2002**, 41, p.p. 15360-15368.
12. MERCK SHARP & DOHME. Manual MERCK de información medica para el hogar. Madrid, **2005**, Sec.12, Cap. 135, p.p. 135.
13. LATHAM, M.C. Human nutrition in the developing world, Food and Nutrition Cornell, University Ithaca, New York, EEUU, **1997**, Series - No. 29.
14. MEAD, M. The problem of changing food habits. In: *Bulletin of the National research Council No. 108*. Food and Nutrition Board of the National Academy of Science, Washington, **1943**.
15. BENDER, A.D. Nutritional Biochemistry of the Vitamins. Second Edition. Cambridge University Press, London, **2003**, p.p. 30-146.
16. DANE. Censo producción de leche industrial. [sitio en Internet]. DANE: ENA (Encuesta Nacional Agropecuaria). **2004**. Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/leche_industrial_2004.pdf. Acceso el 10 de septiembre de 2008.
17. MEDINA, B.J.C.; CASTILLO, E. Problemas en la cuantificación de vitaminas liposolubles en premezclas y alimentos terminados, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), México, **1994**, Cap. 27, p.p. 23-27.
18. NOLLET, L.M.L. Food analysis by hplc. 2º Edition, Marcel Dekker, Inc. New York, **2000**, p.p. 805-846.

19. KRAUSE, M.A. Nutrición y dietoterapia. Interamericana. McGraw–Hill 8ª Edición, México, **1995**, p.p.71-85.
20. SLABAUGH, W.H.; PARSONS, T.D. General Chemistry. 3ª Edición, Limusa, México, **2006**, p.p. 443 – 457.
21. MAYNARD, L.A.; LEOSLI, J.K.; HINTZ, H. F.; WARNER, R.G. Nutrición Animal. McGraw-Hill, 7ª Edición, México, **1981**, p.p. 59-67.
22. MURRIA, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. Harper's Illustrated Biochemistry. 27º Edition, McGraw-Hill, New York, **2003**, p.p. 481-488.
23. CREIGHTON, E.T.; Encyclopedia of molecular biology volumes 1–4. European' Molecular Biology Laboratory. A Wiley-Interscience Publication, London, **1999**, p.p.2240-2248.
24. KOOLMAN, J.; KLAUS-HEINRICH, R. Color atlas of biochemistry, 2º Edition Thieme, New York, **2005**, p.p.364-368.
25. REGINALD H. G.; GRISHAM C.M.; Biochemistry, 3º Edition. John Wiley and Sons Ltd. New York, **1999**, p.p. 603-608.
26. RALSTON B.G.; KUNCHEL W.P. Shaum`s outline of theory and problems of biochemistry. 2º Edition. McGraw-Hill, New York, **1998**, p.p. 162,165.
27. NELSON, L.D.; COX, M.M. Lehninger principles of biochemistry. 4ª ed.Omega. Barcelona, **2006**, p.p. 360-366.
28. Material Safety Data Sheet MSDS. Chemical Product and Company Identification. 1997 - 2005 ScienceLab.com, Inc., www.sciencelab.com, 09-25-2007.
29. SCHLEICH, K.; STOLLER, H. Novel vitamin A acetate process. United States Patent. N. 4,254,281, Mar. 3, **1981**.

30. BEUTEL, R.H. Process for separating vitamin A palmitate. United States Patent. N 2,712,515. Jul 22, **1952**.
31. PARKER, L.; HIRAMATSU, M.Y. Antioxidant food supplements in human health. Academic Press, **1999**, p.p.55-69.
32. GAMARRA, A.I.; RESTREPO, J.F.S. Historia de la vitamina D. *Rev. Col. Reumatol*, **2005**, 12, (1), p.p. 11-32.
33. GAMARRA, A.I.; RESTREPO, J.F.S. Historia de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la vitamina D. *Rev. Col. Reumatol*, **2005**, 12, (2), p.p. 107-140.
34. DELUCA, H.F.; TADI, B.P.; PLUM, L.A.; CLAGETT-DAME, M. 17, 20(Z)-dehydro vitamin D analogs and their uses. United States Patent. N.7,241,748. July 10, **2007**.
35. DELUCA, H.F.; TADI, B.P.; PLUM, L.A.; CLAGETT-DAME, M. 17,20(E)-dehydro vitamin D analogs and their uses. United States Patent. N. 7,241,752. July 10, **2007**.
36. MORAS, D.; ROCHEL-GUIBERTEAU, N.; WURTZ, J.M. Polypeptides derived from vitamin D nuclear receptor, and their uses in particular for screening vitamin D analogues. United States Patent. N.7,199,219. April 3, **2007**.
37. KRUGER, M.C.; BOOTH, C.L. Effect of calcium fortified milk supplementation with or without vitamin K on biochemical markers of bone turnover in premenopausal women. *Nutrition*, **2006**, 22, p.p. 1120–1128.
38. NOLLET, L.M.L. Food analysis by HPLC. 2° Edition, Marcel Dekker, Inc. New York, **2000**, p.p. 805-846.
39. PRICE, P.A. WILLIAMSON, M.K. LOTHNINGER, J.W. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, p.p.12760-12766.

40. DEZEE, K.J.; SHIMEALL, W.T.; DOUGLAS, K.M. Treatment of excessive anticoagulation with phytonadione (vitamin K): a meta-analysis. *Arch. Intern. Med.*, **2006**; 166,(4), p.p.391-7.
41. KRASINSKI, S.D.; RUSSELL, R.M.; FURIE, B.C. The prevalence of vitamin K deficiency in chronic gastrointestinal disorders, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1985**, 41, (3), p.p.639-643.
42. UDALL, J.A. Human sources and absorption of vitamin K in relation to anticoagulation stability, *JAMA*, **1965**, 194, (2), p.p.127-129.
43. MORALES, S.; SOL, M. Factores que afectan la composición de la leche. [sitio en Internet]. TECNO VET: Año 5 N° 1, marzo 1999. disponible en: http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9670%2526ISID%253D459,00.html. Acceso el 10 de octubre del 2007.
44. HAZARD, T.S. Variación de la composición de la leche. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación, Carillanca, Temuco, **1997**, 62, p.p. 33-44.
45. WATTIAUX, M. A.; Lactation and milking. Ed. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Wisconsin, **1999**. Cap. 19, p.p. 73-76.
46. BRINGE, N.A.; KINSELLA, J.E. The effects of pH, calcium chloride and temperature on the rate of acid coagulation of casein micelles. *Am. Dairy Sci.*, Annual Meeting, Davis, CA. **1986**, p.p. 23-26
47. MARTÍN-MAZUELOS, E.; CANTÓN, L. E.; ESPINEL-INGROFF, A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Asociación Española de Micología, *Rev. Iberoam. Micol.*, **2001**, p.p. 16.1-16.9.
48. KENNDLER, E. Introduction to chromatography. Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna, Austria, **2004**, p.p. 1-25.

49. HERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ, C., *Introducción al Análisis Instrumental*. 1^{ra} Edición, Editorial Ariel Ciencia, Barcelona, **2002**, p.p. 273 – 307.
50. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Principios de análisis instrumental*. 5^{ta} Edición, McGraw-Hill, Barcelona, **2001**, p.p. 382-431, 729-828.
51. NOLLET, L.M.L. *Food analysis by HPLC*. 2^o Edition, Marcel Dekker, Inc. New York, **2000**, p.p. 805-846.
52. QUATTROCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.A.; LABA, R.F. *Introducción a la HPLC aplicación y practica*. Artes Graficas Farro S.A, Buenos Aires, **1992**, p.p. 89-137.
53. ARDREY, R.E. *Liquid chromatography–mass spectrometry*. University of Huddersfield, Huddersfield, Wiley, New York, **2003**, p.p.200-240.
54. KATZ, E.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N.; MARCEL, D. *Handbook of HPLC*. Edition, Marcel Dekker New York, **1998**, p.p. 273-293.
55. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GIAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2^o Edition, Wiley, New York **1997**, p.p. 21-125.
56. VERONIKA, M.R. *Pitfalls and errors of HPLC in pictures*. 2^o Edition, Edited by Wolfgang Dünge. Weinheim, **1997**, p.p. 100-105
57. ROMÁN, S.A.; GARRIDO, J.C.; MARTÍ, A.R. *Técnicas ópticas de análisis. Análisis químico*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, **2007**, p.p. 7-23.
58. AKE, M.; FABRE, H.; MALAN, A.K.; MANDROU, B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826, p.p. 183–189.
59. ALBALI-HURTADO; NOVELLA-RODRFGUEZ, S.M.; VECIANA-NOGUS, T.; MARIN-FONT, A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae

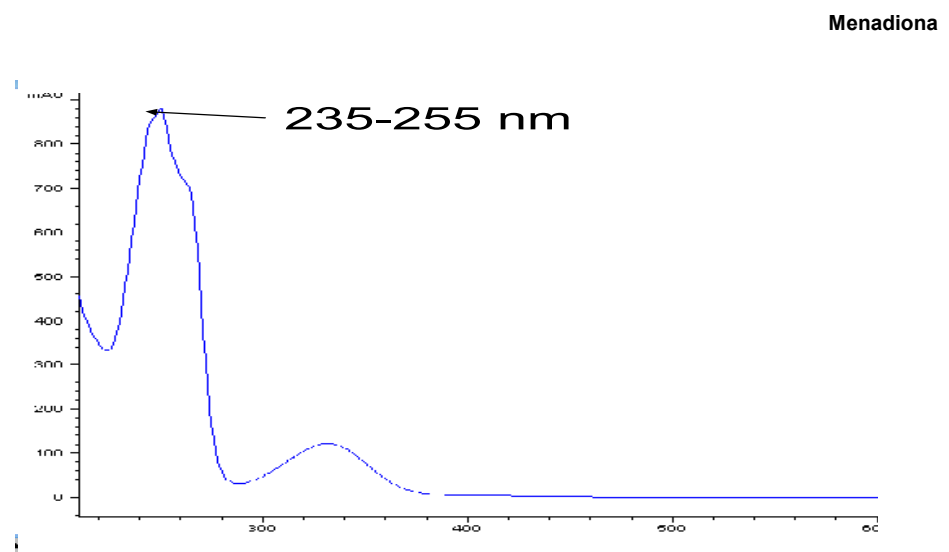
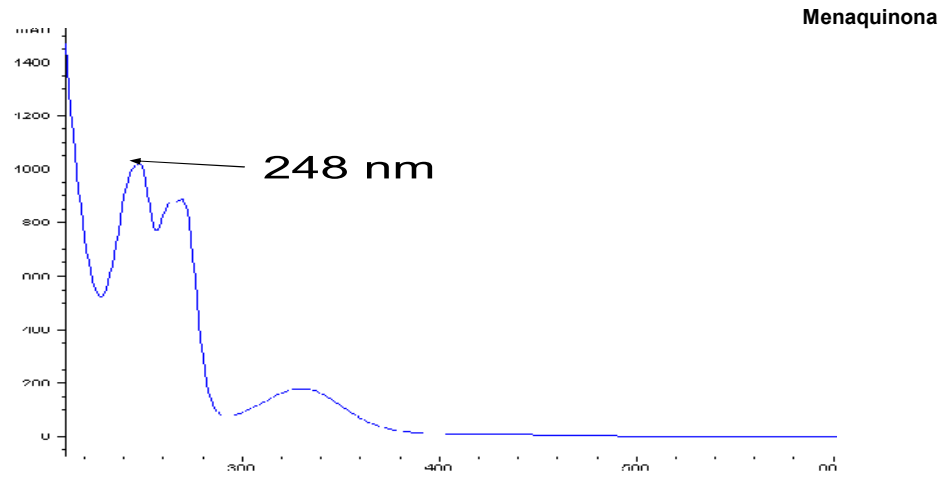
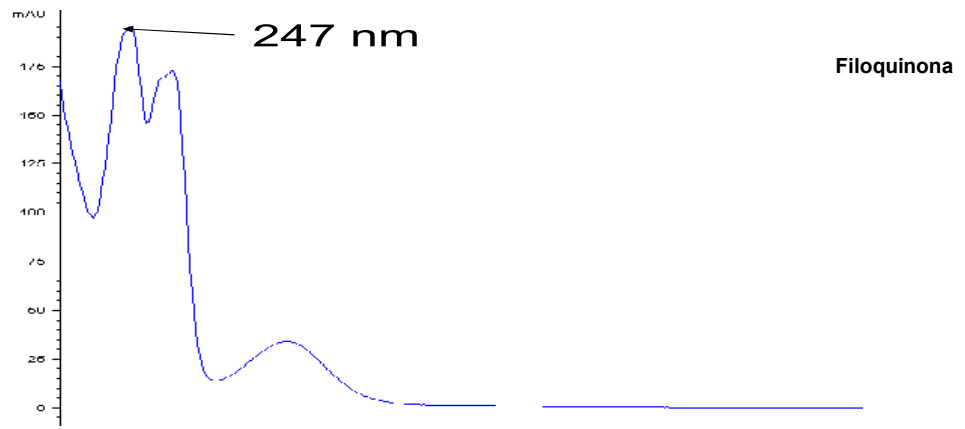
- by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 778, p.p. 243-246.
- 60.** CHÁVEZ-SERVIN, J.L.; CASTELLOTE, A.I.; LOPEZ-SABATER, M.C. Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high-performance liquid chromatography–diode array detection using a short narrow-bore column, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1122, p.p.138–143.
- 61.** DELGADO, M.M.; SÁNCHEZ, P. A.; SÁNCHEZ, R.M.; GÓMEZ, P.M.C.; HERNÁNDEZ, M.J. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection, *Talanta*, **1996**, 43, p.p.1555-1563.
- 62.** GOMES, D.B.; FERNÁNDEZ, M.P.; ALVAREZ, G.D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 891, p.p. 109–114.
- 63.** RODAS, M.B.; MORERA, P.S.; CASTELLOTE, B.A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1018, p.p.197–202.
- 64.** HULSHOF, P.J.M.; ROEKEL-JANSEN, T.; BOVENKAMP, P.; WEST, C. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in the Netherlands, *J. Food Compos. Anal.*, **2006**, 19, p.p. 67–75.
- 65.** QIAN, H.; SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 25, p.p.127–133.
- 66.** MICHIKO, M.; HIROKAZU, Y.; HARUKO, S.; MICHINAGA, M.; HIROMASA, I. Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradient, *J. Chromatogr. B*, **2001**, 757, p.p. 365–368.

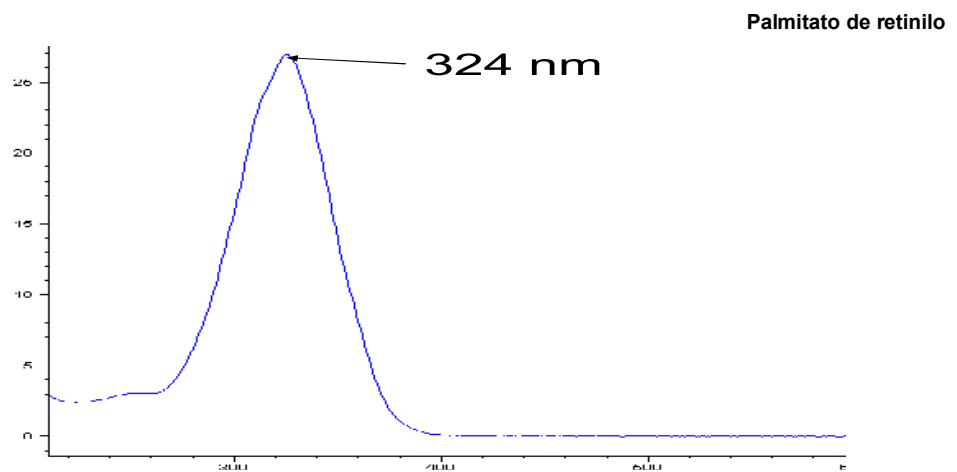
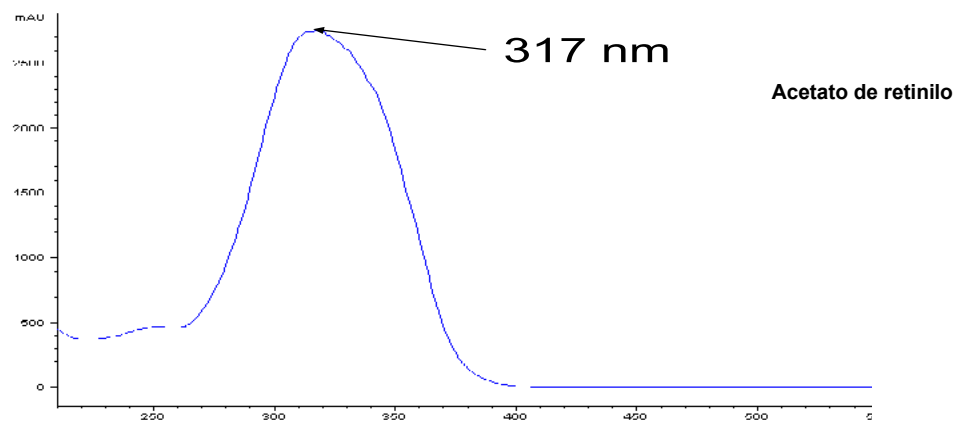
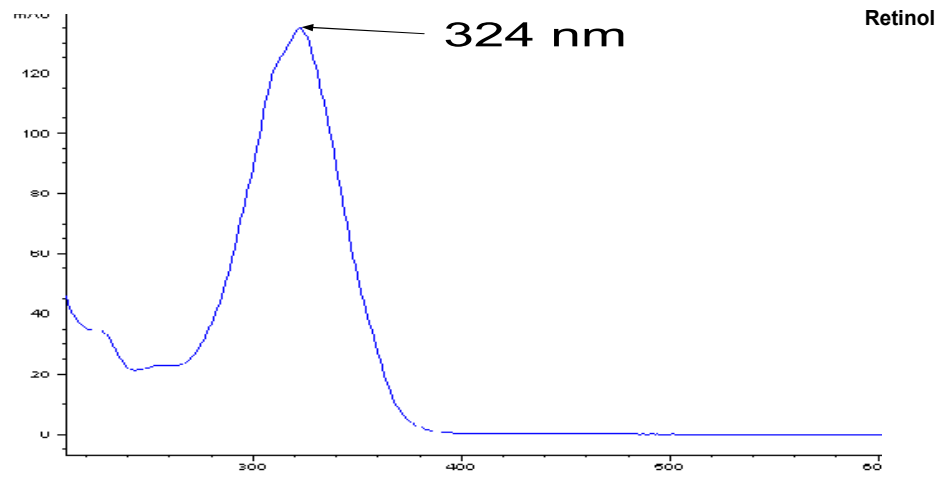
67. WEINMANN, A.R.M.; OLIVEIRA, M.S.; SALIM, M.J.; MARTINS, A.R. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorometry and of tocopherol by ultraviolet absorbance in the serum of newborns, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 729, p.p. 231–236.
68. SALO-VAANANEN, P.; OLLILAINEN, V.; MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; SALMELA-MOLSA, E.; PIIRONEN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction, *Food Chem.*, **2000**, 71, p.p. 535-543.
69. CREECH, K.J.; SCHUH, T.; MONT, R. KIMELMAN D. Temporal distribution, localization and metabolism of all-trans-retinol, dihydroretinol and all-trans-retinal during Xenopus development, *J. Biochem.*, **1994**, 301, p.p.111-119.
70. KHACHIK, F.; SPANGLER, J.C.; SMITH, J.C. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p.p.1873-1881.
71. YAKUSHINA, L.; TARANOVA, A. Rapid HPLC simultaneous determination of fat-soluble vitamins, including carotenoids, in human serum, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, 13, p.p. 715-718.
72. HERRERO, M.C.B.; GRANADO, F.L.; BLANCO, I.N.; OLMEDILLA-ALONSO, B. Retinol, α -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A and E fortified dairy products commercialized in Spain, *J. Inter. Dairy*, **2005**, 15, p.p. 521–526.
73. ARAUJO, R.J.A.; ARENCIBIA, J.R. Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. *ACIMED*, **2002**, 10, p.p. 5-6.
74. SPINAK, E. Diccionario Enciclopédico de Bibliometría, Cienciometría e Informetría, Caracas: UNESCO, **1996**, p. 34 -131.
75. DELUCA, H.F.; TADI, B.P.; PLUM, L.A.; CLAGETT-DAME, M. 17,20(Z)-dehydro vitamin D analogs and their uses. United States Patent. N.7,241,748. July 10, **2007**.

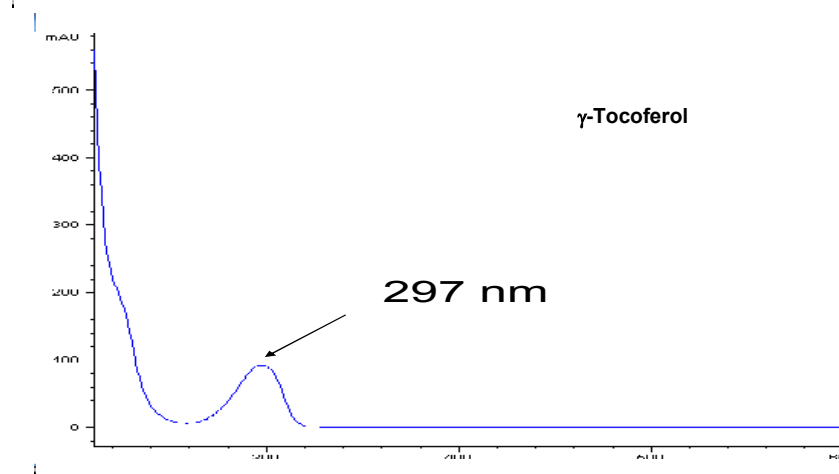
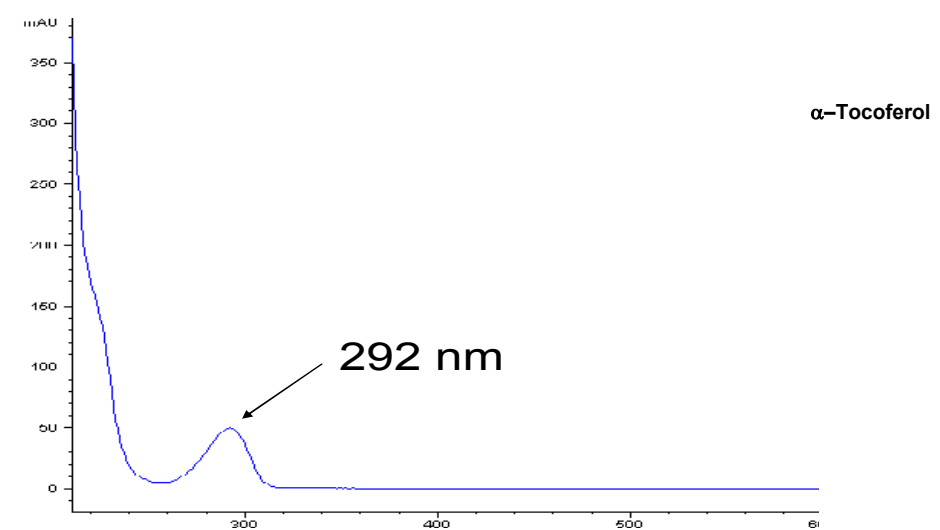
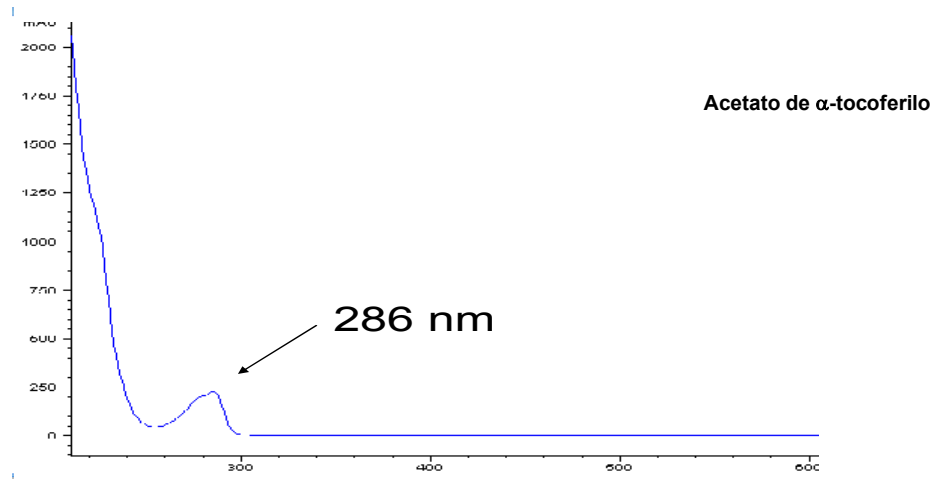
- 76.** DELUCA, H.F.; TADI, B.P.; PLUM, L.A.; CLAGETT-DAME, M. 17, 20(E)-dehydro vitamin D analogs and their uses. United States Patent. N. 7,241,752. July 10, **2007**.
- 77.** MORAS, D.; ROCHEL-GUIBERTEAU, N.; WURTZ, J.M. Polypeptides derived from vitamin D nuclear receptor, and their uses in particular for screening vitamin D analogues. United States Patent. N.7,199,219. April 3, **2007**.
- 78.** NIELSEN, M.M. Content of vitamin E in fractions of milled wheat [Indhold af vitamin E i fraktioner af formalet hvede]. [oral] Presentation at 6th *Eur. Young Cereal Sci. Technol. Workshop*, Montpellier, 2 may **2007**.
- 79.** VILLAVERDE, H.C. Interaction between dietary polyunsaturated fatty acids and vitamin E in body lipid composition and (α)-tocopherol content of broiler chickens, *Dep. Cienc. Anim.*, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, **2005**, p.p.154.
- 80.** ASCHERIO, A.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; RIMM, E.B.; LITIN, L.; WILLETT, W.C.; Correlations of vitamin A and E intakes with the plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among American men and women, Harvard School of Public Health, Boston, *J. Nutr.*, **1992**, 122, p.p.1792-1801.
- 81.** HEIKINHEIMO, R.J.; INKOVAARA, J.A.; HARJU, E.J.; HAAVISTO, M.V.; KAARELA, R.H.; KATAJA, J.M.; KOKKO, A.M.L.; KOLHO, L.A.; RAJALA, S.A. Annual injection of vitamin D and fractures of aged bones, *Calcif. Tissue Int.*, **1992**, 51, p.p.105-110.
- 82.** PRICE, P.A. WILLIAMSON, M.K. LOTHRINGER, J.W. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, p.p.12760-12766.
- 83.** SWART, M.; KRULL, I.; Analytical method development and validation. Ed. Marcel Dekker, New York, **1997**. p.p.92.

- 84.** HORWITZ, W.; Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.* **1982**, 54, p.p.67.
- 85.** BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Estadística para experimentadores. Ed. Reverté. Barcelona, **1989**, p.p 250-279.

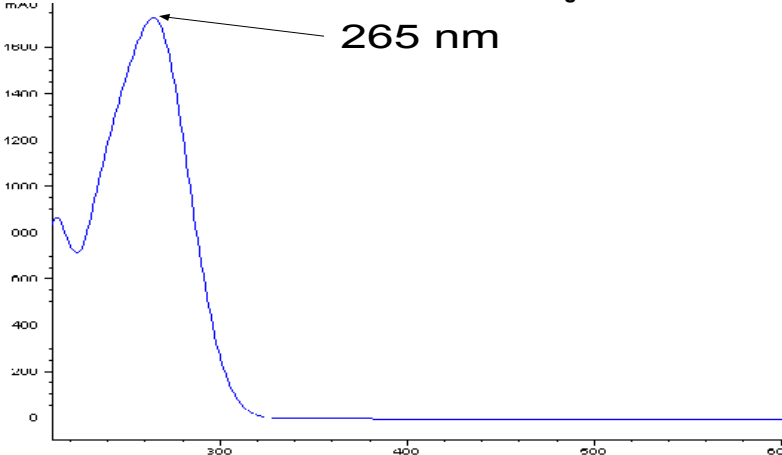
Anexos 1. Espectros de ultravioleta-visible de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, filoquinona, menadiona, menaquinona, γ -tocoferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferilo y ergocalciferol.





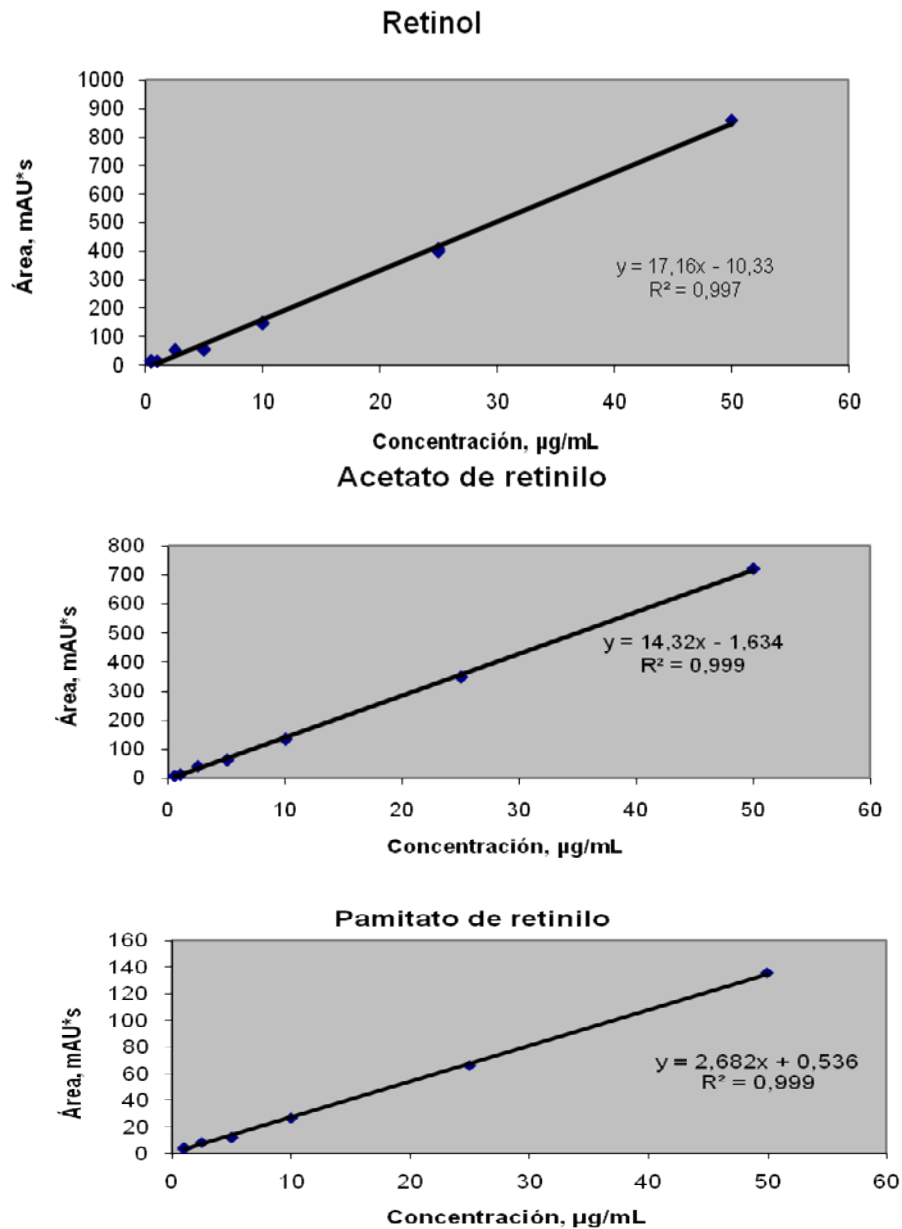


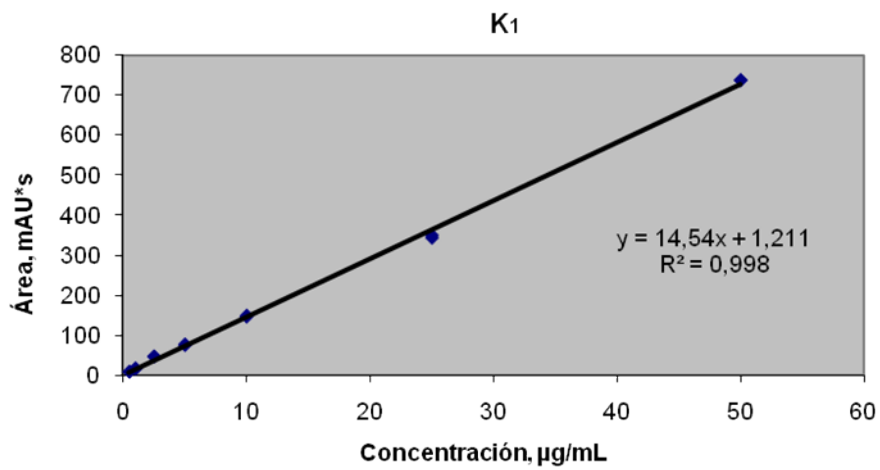
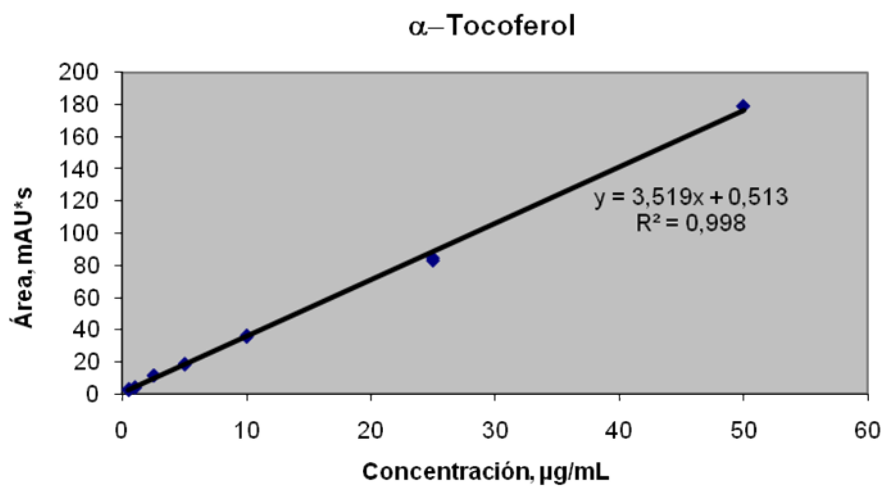
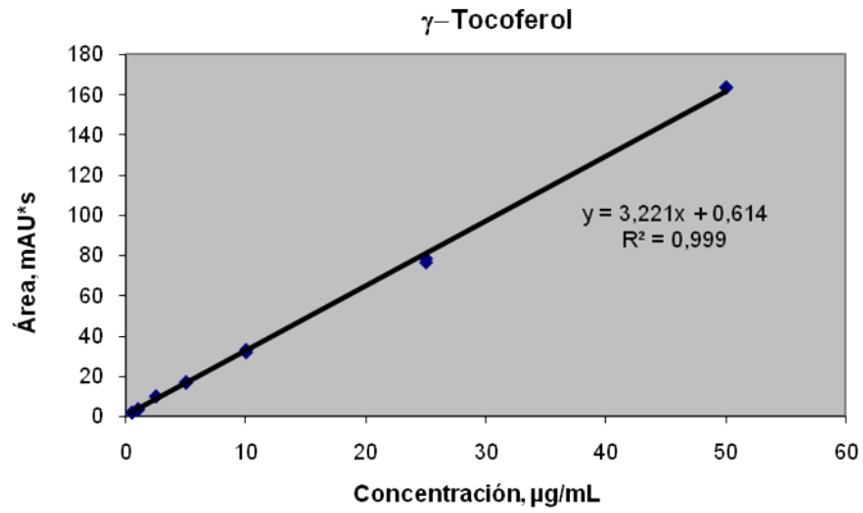
Ergocalciferol

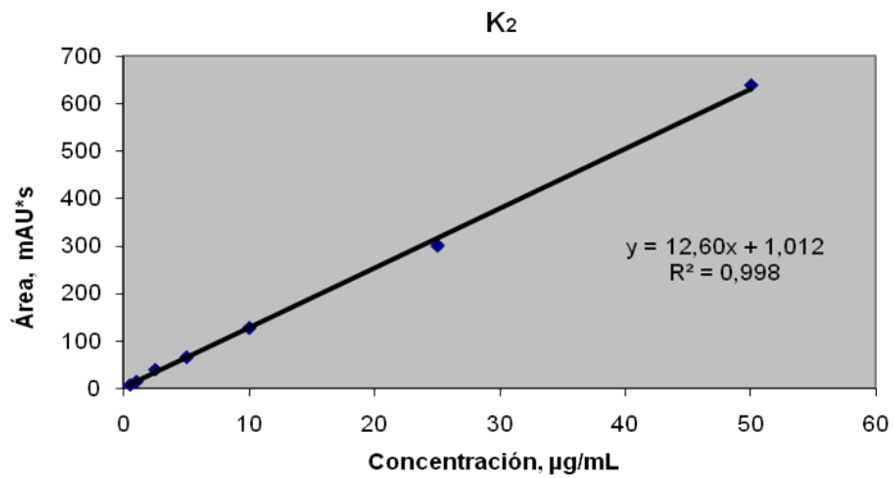
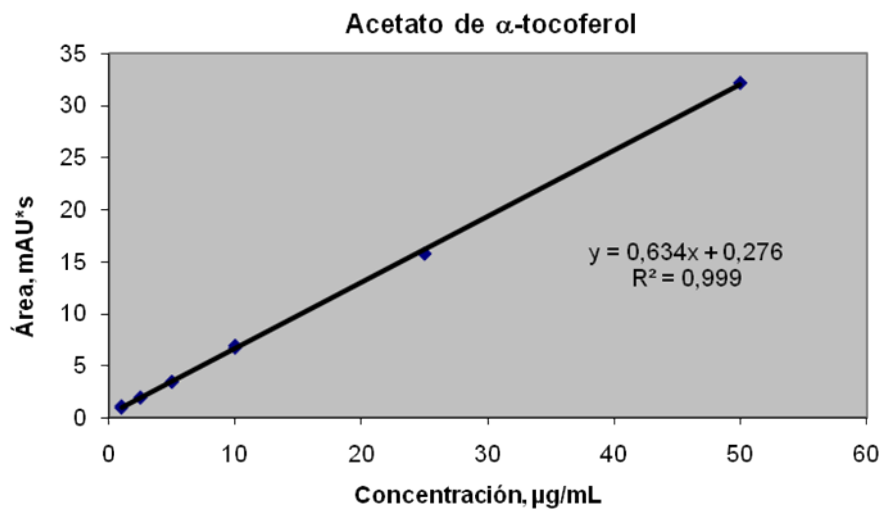
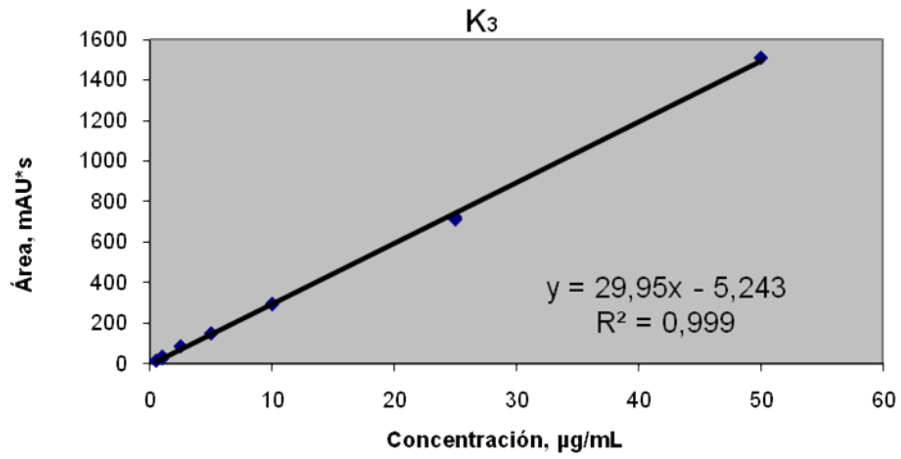


Anexo 2 Curvas de calibración de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, γ -tocoferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferilo, filoquinona (K₁), menaquinona (K₂), menadiona (K₃) y ergocalciferol (D₂).

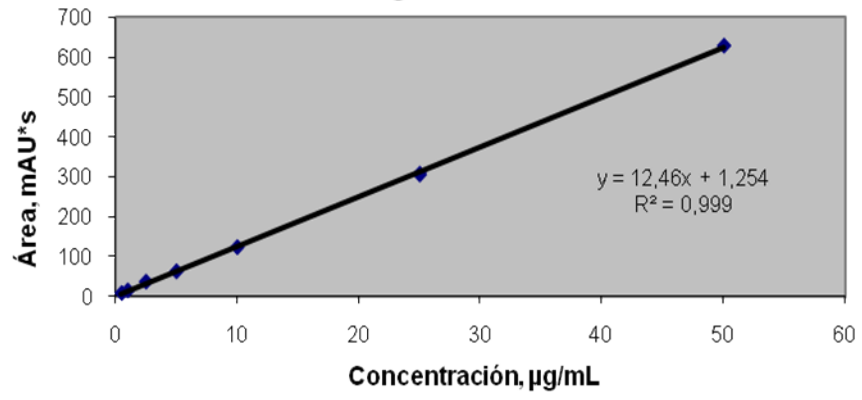
Figura 2-1 Curvas de calibración de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, filoquinona (K₁), menaquinona (K₂), menadiona (K₃), γ -tocoferol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferilo, y ergocalciferol (D2), concentraciones de trabajo de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50 ppm.







Ergocalciferol



Anexo 3 Resultados, obtenidos por el *software* MINITAB 15, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción de las vitaminas:
Retinol, D₂, α -Tocoferol, K₁.

Retinol

Ajuste factorial: % recuperación vs. Temperatura; Solvente; Antioxidante

Efectos y coeficientes estimados para % Recuperación (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef.			
		Coef	de EE	T	P
Constante		76,25	1,627	46,88	0,000
Temperatura	23,10	11,55	1,627	7,10	0,000
Solvente	-20,79	-10,39	1,627	-6,39	0,000
Antioxidante	5,78	2,89	1,627	1,78	0,113
Temperatura*solvente	20,60	10,30	1,627	6,33	0,000
Temperatura*antioxidante	-6,85	-3,43	1,627	-2,11	0,068
Solvente*antioxidante	5,39	2,70	1,627	1,66	0,136
Temperatura*solvente*antioxidante	4,23	2,11	1,627	1,30	0,230

S = 5,63461

PRESS = * R-cuad. = 93,54%

D₂

Ajuste factorial: % recuperación vs. Temperatura; Solvente;

Antioxidante

Efectos y coeficientes estimados para % recuperación (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef.			
		Coef	de EE	T	P
Constante		57,295	1,589	36,06	0,000
Temperatura	28,265	14,133	1,589	8,89	0,000
Solvente	-3,819	-1,910	1,589	-1,20	0,264
Antioxidante	6,888	3,444	1,589	2,17	0,062
Temperatura*Solvente	17,192	8,596	1,589	5,41	0,001
Temperatura*Antioxidante	-0,790	-0,395	1,589	-0,25	0,810
Solvente*Antioxidante	8,625	4,312	1,589	2,71	0,026
Temperatura*Solvente*Antioxidante	3,908	1,954	1,589	1,23	0,254

S = 5,50407

PRESS = * R-cuad. = 94,71%

α-Tocoferol

Ajuste factorial: % recuperación vs. Temperatura; Solvente; Antioxidante

Efectos y coeficientes estimados para % Recuperación (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef.			
		Coef	de EE	T	P
Constante		23,23	4,050	5,74	0,000
Temperatura	-45,22	-22,61	4,050	-5,58	0,001
Solvente	-11,52	-5,76	4,050	-1,42	0,193
Antioxidante	13,26	6,63	4,050	1,64	0,140
Temperatura*solvente	11,06	5,53	4,050	1,37	0,209
Temperatura*Antioxidante	-12,01	-6,01	4,050	-1,48	0,176
Solvente*Antioxidante	2,95	1,48	4,050	0,36	0,725
Temperatura*solvente*Antioxidante	-3,41	-1,70	4,050	-0,42	0,685

S = 16,1983 PRESS = 8396,37 R-cuad. = 83,42%

K₁

Ajuste factorial: % Recuperación vs. Temperatura; Solvente; Antioxidante

Efectos y coeficientes estimados para % Recuperación (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef.			
		Coef	de EE	T	P
Constante		33,48	5,924	5,65	0,000
Temperatura	-33,06	-16,53	5,924	-2,79	0,024
Solvente	-15,66	-7,83	5,924	-1,32	0,223
Antioxidante	-5,86	-2,93	5,924	-0,49	0,634
Temperatura*Solvente	3,60	1,80	5,924	0,30	0,769
Temperatura*Antioxidante	-6,49	-3,25	5,924	-0,55	0,599
Solvente*Antioxidante	6,20	3,10	5,924	0,52	0,615
Temperatura*Solvente*Antioxidante	-15,69	-7,84	5,924	-1,32	0,222

S = 23,6952 PRESS = 17966,8 R-cuad. = 60,39%

Anexos 4. Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación de las vitaminas: retinol, D₂, α -tocoferol y K₁.

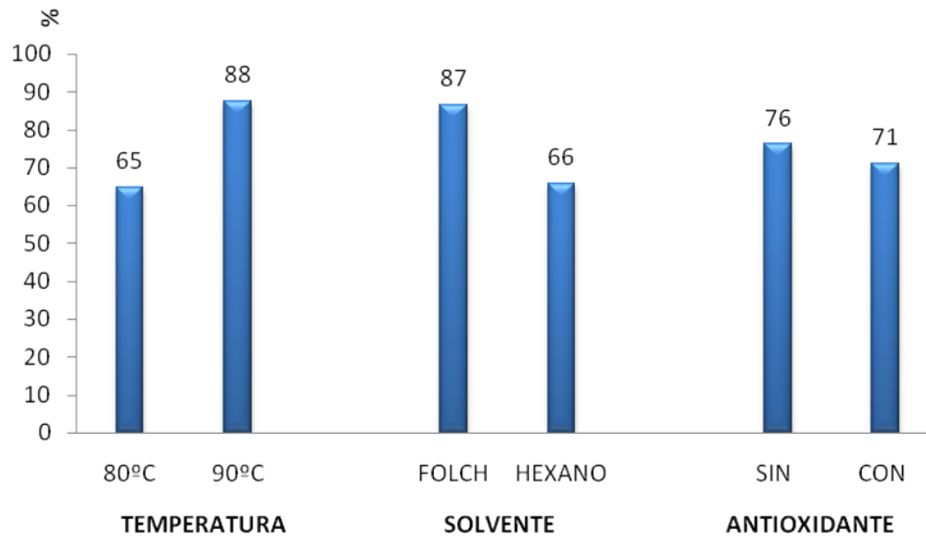


Figura 1. Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación del retinol.

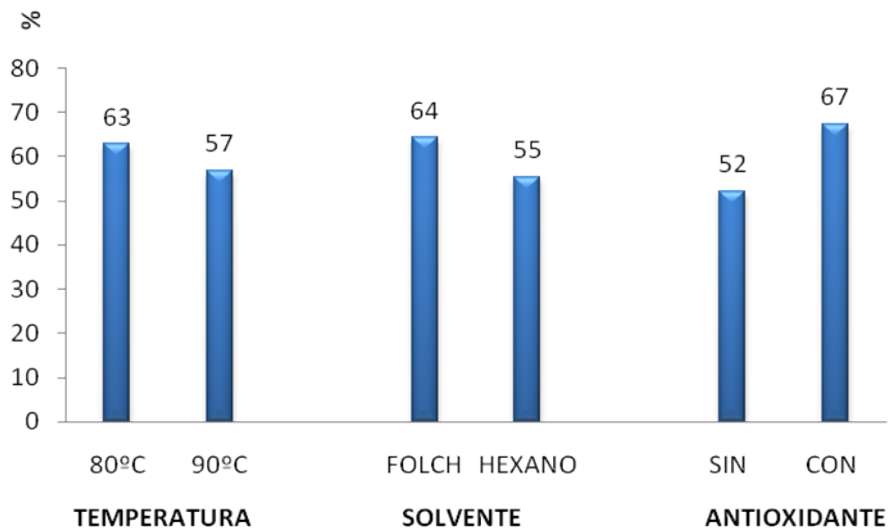


Figura 2. Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación de la vitamina D₂.

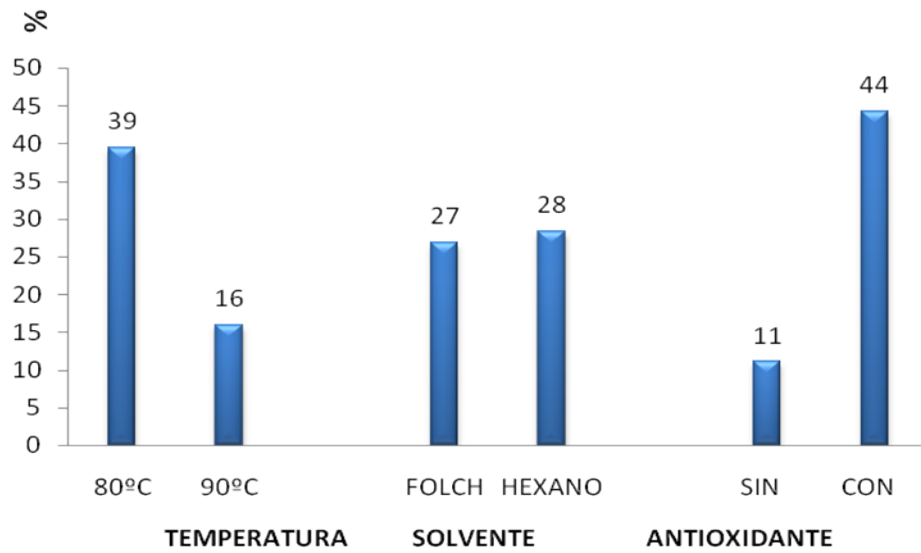


Figura 3. Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación del α -tocoferol.

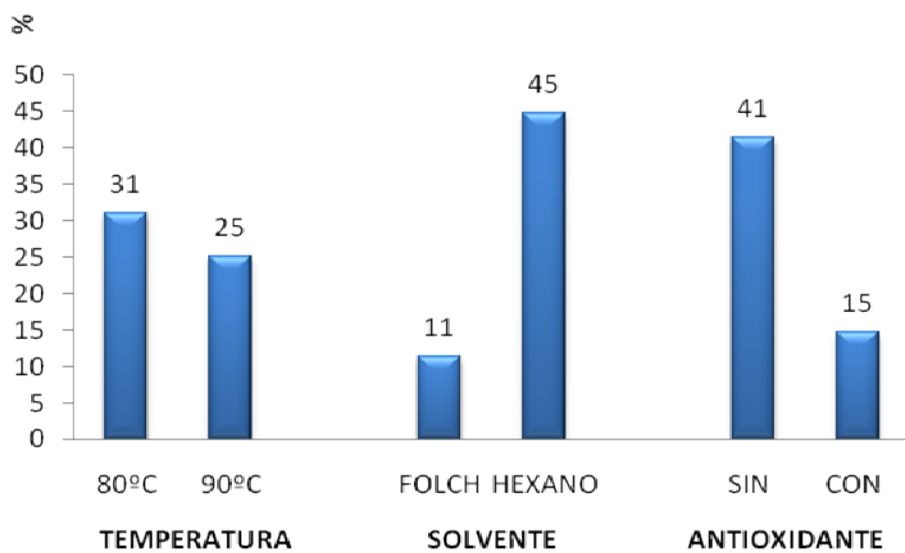


Figura 4. Efectos principales de las variables estudiadas sobre el porcentaje de recuperación de la vitamina K₁.

Anexos 5. Resumen general de costos

COSTOS ENSAYO VITAMINA

<i>Preparación de la muestra</i>	<i>\$ 3.723</i>
<i>Equipos auxiliares y suministros</i>	<i>\$ 9.374</i>
<i>Reactivos corrida cromatográfica</i>	<i>\$ 9.550</i>
<i>Máquina /equipo</i>	<i>\$ 9.583</i>
<i>Mano de obra</i>	<i>\$ 44.605</i>
<i>Costos indirectos</i>	<i>\$ 38.752</i>
<i>TOTAL</i>	<i>\$ 115.587</i>