

CAPÍTULO 42

Análisis de folatos
en muestras alimentarias
mediante técnicas cromatográficas
de alta resolución.

ELÍSBET MARTÍN TORNERO

1. Introducción.

El trabajo se encuadra en el área de la Química Analítica y se ha desarrollado en el grupo de investigación "Análisis y Control de Residuos en Alimentos, Fluidos Biológicos y Medio Ambiente (ANAYCO)", en el cual estoy desarrollando mi Tesis Doctoral bajo la dirección de las Dras. Anunciación Espinosa Mansilla e Isabel Durán Martín-Merás.

La investigación se centra en el desarrollo y aplicación de nuevos métodos analíticos, basados principalmente en técnicas separativas que permitan identificar y cuantificar, de manera más rápida y con mayor sensibilidad que los protocolos previamente establecidos, compuestos de gran interés en el campo bioanalítico y alimentario, concretamente folatos y pteridinas no conjugadas. Las pteridinas son compuestos naturalmente presentes en fluidos biológicos y alimentos. Actúan como marcadores de alteración de diversas rutas bioquímicas, por lo que se les denominan *biomarcadores* y se encuentran en alimentos como precursores de la formación de folatos.

En este trabajo se ha optimizado un método para el análisis del ácido fólico (AF) y sus metabolitos (ácido tetrahidrofólico –THF- y ácido 5-metiltetrahidrofólico –MTHF-) en alimentos. Estos compuestos son muy importantes en el organismo humano, ya que son coenzimas en diversas reacciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos. Su deficiencia en el organismo humano puede conducir a diversas enfermedades como anemia, incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares y de diversos tipos de cánceres y está relacionada con diversas patologías y complicaciones en neonatos, tales como defectos del tubo neuronal (Calman, 1992).

Aunque los folatos son micronutrientes esenciales, los seres humanos no pueden sintetizarlos y los tienen que incorporar a través de la dieta. Se ha constatado que el consumo de alimentos ricos en folatos se traduce en una menor incidencia de defectos del tubo neuronal neonatal (Kelly, McPartlin, Goggins, Weir y Scott, 1997).

La mayoría de los alimentos contienen baja cantidad de folatos y para incrementar la ingesta de los mismos se puede recurrir a su fortificación mediante la adición de ácido fólico sintético. Otra posibilidad es llevar a cabo modificaciones genéticas de los alimentos vegetales para que produzcan mayor cantidad de ácido fólico, proceso denominado biofortificación.

Por todo ello es de especial interés disponer de métodos rápidos y sensibles para determinar las concentraciones de estos compuestos en alimentos.

Durante muchos años, los métodos elegidos para la determinación de folatos han sido análisis microbiológicos basados en el crecimiento de varios microorganismos (Rader, Weaver y Angyal, 1998). Sin embargo, esta técnica solamente permite conocer el contenido total de folatos, pero no el contenido de los compuestos individuales, lo que es cada vez más demandado para distinguir entre los folatos naturales y las formas sintéticas de folatos.

Para identificar y cuantificar los folatos individualmente se ha recurrido a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que permite la determinación de folatos individuales en una variedad de matrices (Konings, 1999). Normalmente la detección utilizada ha sido espectrofotometría UV-Visible. Sin embargo este no es un sistema de detección muy sensible para estos compuestos. También se han publicado métodos que utilizan espectrometría de masas (MS), pero esta técnica no es accesible por todos los laboratorios. La técnica de fluorimetría de registro rápido (FSFD) no ha sido comúnmente utilizada para la determinación de los folatos debido a que algunos de ellos presentan un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, por ejemplo el ácido fólico.

Teniendo en cuenta esta dificultad se han propuesto varios métodos que transforman el AF en derivados más fluorescentes (Gregory, Sartain y Day, 1984). Sin embargo, estos métodos implican una reacción química postcolumna, lo que complica el sistema instrumental empleado y su mantenimiento.

Por otro lado, hay estudios que demuestran que la fluorescencia del ácido fólico se ve fuertemente incrementada cuando es irradiado con luz UV, debido a que se forman derivados fuertemente fluorescentes (Jiménez-Girón, Durán-Merás, Muñoz De La Peña, Espinosa-Mansilla, Cañada-Cañada y Olivieri, 2008; Suárez, Cabrerizo, Lorente, Thomas y Capparelli, 2000).

Por todo ello nos propusimos la optimización de un método mediante HPLC-FSFD, incorporando un sistema de fotoirradiación *on-line* post-columna. De este modo el AF y sus dos principales metabolitos pudieron ser detectados mediante la medida de su fluorescencia. El método propuesto se ha validado en el análisis de diversos alimentos.

2. Parte experimental y resultados.

2.1. Método cromatográfico.

El método cromatográfico para la determinación de estos tres folatos en muestras alimentarias se desarrolló en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector fluorimétrico de registro rápido. A este sistema se acopló un fotorreactor para la irradiación *on-line*, que consiste en un tubo de PTFE enrollado alrededor de una lámpara de xenón. Este fotorreactor se situó entre la columna y el detector, para que así los analitos fueran separados

en su estado original, pero fueran detectados una vez transformados en sus correspondientes fotoproductos. Un esquema del sistema empleado se muestra en la Figura 1.

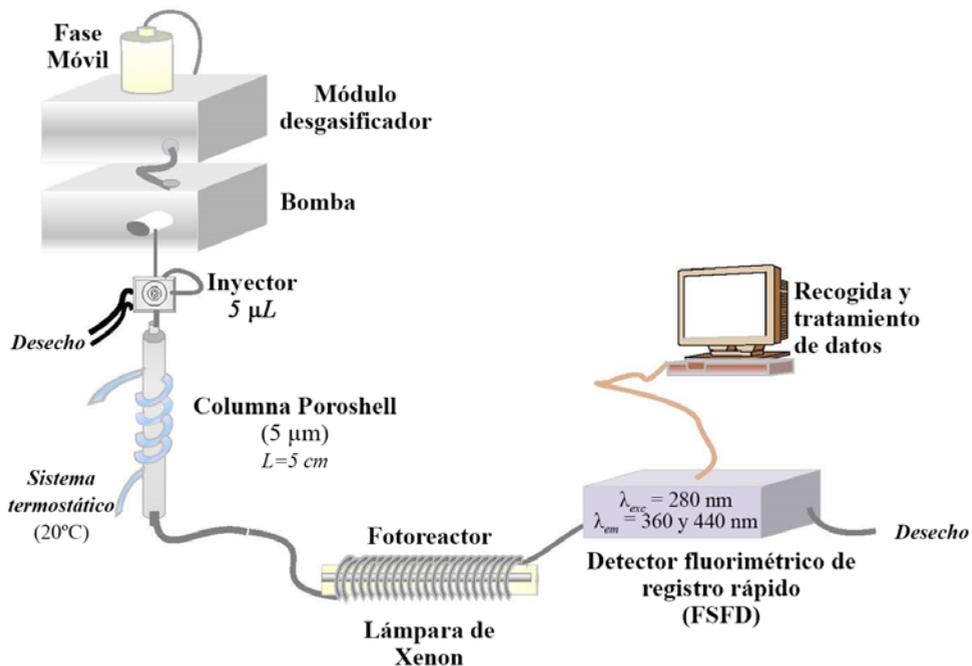


Figura 1. Sistema utilizado para la cuantificación de folatos en alimentos.

Los componentes de la fase móvil fueron ácido fórmico (2 mM, pH 4) y acetonitrilo (6:94, v:v) en modo isocrático. Se aplicó un gradiente de velocidad de flujo para conseguir mayor sensibilidad, así la elución se empieza con un flujo de 0,4 mL/min durante 4 min, después se incrementa a 1,0 mL/min y se mantuvo durante 2 min, para finalmente volver a 0,4 mL/min durante otros 6 min.

Para la separación de los analitos se empleó una columna Poroshell 120 EC C8 (50 x 4,6 mm, 2,7 µm), termostataada a 20 °C.

El volumen de inyección fue 5 µL y el detector de fluorescencia se programó en modo multiemisión a 360 nm y 440 nm, excitando a 280 nm. En estas condiciones los tres folatos seleccionados para el estudio eluyen en menos de 12 minutos.

El método propuesto fue validado mediante el establecimiento de la linealidad, precisión y límites de detección (LOD). Así el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0,99 para todos los compuestos, los LODs (Long y Winefordner, 1983) estuvieron entre 7,5 ng·mL⁻¹ para AF and 22,9 ng·mL⁻¹ para MTHF y la precisión calculada como desviación estándar relativa fue menor de 5,3%, lo que indica la buena repetitividad del método propuesto.

El método cromatográfico propuesto se aplicó a muestras de alimentos vegetales comerciales, concretamente a tomate fresco, espinacas congeladas y a muestras de cereales de desayuno.

2.2. Extracción y limpieza de las muestras.

El procedimiento de extracción consistió en pesar 1 gramo de la muestra previamente liofilizada (en el caso del tomate y las espinacas) y molida en un tubo de centrifuga y extraerlos con 20 mL de tampón de extracción (50 mM HEPES/CHES conteniendo 2% ácido ascórbico y 10 mM de mercaptoetanol, pH 7.85) durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo, para posteriormente ser enfriado rápidamente en baño de hielo.

El contenido de estos tubos fue sometido a un proceso de desconjugación enzimática, para lo cual se añadieron 50 μ L de plasma de rata reconstituido previamente y se incubó durante 3 horas a 37°C, para posteriormente ser hervido durante 5 minutos, enfriado en baño de hielo y centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,45 μ m para posteriormente ser purificado mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio aniónico (SAX) (Jastrebova, Witthöft, Grah, Svensson y Jägerstad, 2003). Alícuotas de 3 mL de la muestra se pasaron a través del cartucho SAX previamente acondicionado con metanol (2 x 2,5 mL) y agua (2 x 2,5 mL). Posteriormente el cartucho se lavó con agua (3 mL) para eliminar las interferencias y los folatos retenidos fueron eluidos con 3 mL del tampón de elución (acetato de sodio 0,1 M, conteniendo 1% de ácido ascórbico y 0,1% de mercaptoetanol).

Este método de purificación fue validado mediante estudios de repetitividad y ensayos de recuperación obteniéndose recuperaciones entre 94% y 102%.

2.3. Cuantificación de folatos en alimentos.

Antes de llevar a cabo la cuantificación de los compuestos, se evaluó la influencia de la matriz de la muestra en la determinación. Para ello, se realizaron las curvas de calibración de adición patrón para cada folato en las muestras analizadas y se compararon las pendientes de las curvas con las correspondientes pendientes de las curvas de patrón externo. Los resultados mostraron que en la mayoría de las muestras había efecto matriz y, como consecuencia, se propuso el método de adición patrón como método de cuantificación.

De este modo, se contaminaron las muestras a analizar con cuatro niveles de concentración de cada analito y se utilizó el área de pico como señal analítica. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Los tres folatos fueron detectables en todas las muestras, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias a los diferentes niveles de enriquecimiento y resultados comparables a los encontrados por otros métodos en estas matrices.

3. Conclusiones.

Se ha optimizado un método mediante HPLC-FLD con fotoderivatización *on-line* post-columna para la determinación de AF y sus dos principales metabolitos. Es la primera vez que se utiliza la fotoderivatización *on-line* para el análisis del AF y sus metabolitos posibilitando así la utilización de la detección fluorimétrica, más sensible que la disponible actualmente mediante otro tipo de detectores.

En las muestras analizadas el THF se ha podido cuantificar en los tres tipos de muestras, mientras que el AF y el 5MTHF solo se encuentran disponibles en cantidades cuantificables en las muestras de cereales y espinacas, respectivamente.

REFERENCIAS

- Calman, K. (1992). *Folic Acid and the Prevention of Neural Tube Defects*. Heywood, Lancashire: Health Publications, Department of Health and Social Services.
- Gregory, J. F.; Sartain, D. B. y Day, B. P. (1984). Fluorimetric Determination of Folic Acid in Biological Materials using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Nutrition*, 114, 341-353.
- Jastrebova, J.; Witthöft, C.; Grahn, A.; Svensson, U. y Jägerstad, M. (2003). HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry*, 80, 579-588.
- Jiménez-Girón, A.; Durán-Merás, I.; Muñoz-De La Peña, A.; Espinosa-Mansilla, A.; Cañada-Cañada, F. y Olivieri, A. C. (2008). Photoinduced fluorimetric determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in serum using the kinetic evolution of the emission spectra accomplished with multivariate second-order calibration methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 827-835.
- Kelly, P.; McPartlin, J.; Goggins, M.; Weir, D. G. y Scott, J. M. (1997). Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1790-1795.
- Konings, E. J. (1999). A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *Journal of AOAC International*, 82, 119-127.
- Long, G. L. y Winefordner, J. D. (1983). Limit of Detection. *Analytical Chemistry*, 55, 712A-724A.
- Rader, J. I.; Weaver, C. M.; Angyal, G. (1998). Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measure of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chemistry*, 62, 451-465.
- Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Thomas, A. H. y Capparelli, A. L. (2000). Study of the photolysis of 6-carboxypterin in acid and alkaline aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 132, 53-57.

APUNTES BIOGRÁFICOS

Elísabet Martín Tornero (Valencia de Alcántara, Cáceres, 2 de diciembre de 1988), es Licenciada en Química y Máster en Gestión de la Calidad y Trazabilidad en Alimentos de Origen Vegetal, ambos por la Universidad de Extremadura. Ha disfrutado de una Beca de Formación de Tecnólogos en el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Reside en Badajoz desde el comienzo de sus estudios y actualmente disfruta de un contrato de personal docente investigador mediante una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura asociado al Proyecto “Estrategias de calibración multi-vía para la potenciación de metodologías analíticas aplicadas en los campos bioanalítico, agroalimentario y medioambiental”.

Contacto: elisabetmt@unex.es