



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC

Alumno: Jaime Alcántara Durán

Julio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Química

Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC

Alumno: Jaime Alcántara Durán

Julio, 2015

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi mentora, la Dra. Pilar Ortega Barrales, por su apoyo y dedicación durante estos cuatro años, por la amistad que hemos forjado, y por brindarme la oportunidad de retomar las riendas de mi formación y hacer que llegue a buen puerto.

También quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Química Física y Analítica y a la Dña. Paloma Arranz Mascaros, que han contribuido a la realización este trabajo. En particular quiero expresar sincero agradecimiento a Eulogio J. Llorente, Julia Jiménez, Irene Delgado, Marina Gómez y Juan Castro, sin su apoyo y enseñanzas, hubiese sido incluso más difícil llegar hasta aquí.

Por último quisiera hacer una mención especial a mis padres, Tomás y M^a Teresa, por su confianza depositada en mí, sus inconmensurables esfuerzos y su infinito apoyo. A ellos va dedicado este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
1. OBJETIVOS	1
2. RESUMEN /ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	2
4. ANALITOS: VITAMINAS HIDROSOLUBLES DEL GRUPO B	4
5. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA MUESTRAS DE CARÁCTER ALIMENTICIO	7
5.1. Cromatografía líquida de reparto o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	8
5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	9
<i>5.2.1. Modos de ionización: interfases de ionización a presión atmosférica. Ionización por electro spray</i>	10
<i>5.2.2. Analizadores</i>	12
<i>5.2.2.1. Trampa iónica tridimensional</i>	12
<i>5.2.3. Detectores</i>	14
5.3. Modos de trabajo típicos de los analizadores de masas de trampa iónica	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1. Reactivos	16
6.2. Equipos e instrumentos	17
6.3. Preparación de muestra	18
6.4. Condiciones HPLC-ESI/MS	22
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1. Optimización de las condiciones HPLC/ESI-MS	22
<i>7.1.1. Optimización de parámetros para MS.</i>	22
<i>7.1.2. Selección del patrón interno</i>	25
<i>7.1.3. Optimización de las condiciones cromatográficas</i>	26
7.2. Validación del método. Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación	30
7.3. Aplicaciones analíticas	35
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	44

**Optimización de un método para la determinación
de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios
mediante HPLC**

1. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo consistió en la puesta a punto de un método cromatográfico, mediante HPLC, para la determinación de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios, en concreto vitaminas hidrosolubles, estas fueron la vitamina C y todas las correspondientes al grupo B.

2. RESUMEN / ABSTRACT

En este trabajo se ha desarrollado un método para la determinación de 6 vitaminas hidrosolubles del grupo B, estas son: B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (nicotinamida), B₅ (ácido pantoténico), B₆ (piridoxina) y B₇ (biotina) en cuatro suplementos alimenticios diferentes, en forma de zumos de frutas y grageas. El método desarrollado parte de una preparación de muestra basada en una extracción mediante digestión ácida-enzimática y una extracción líquido-líquido con metanol, para muestras líquidas, y una extracción sólido-líquido para muestras sólidas. Tras la preparación de la muestra por el procedimiento correspondiente, los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas de trampa iónica tridimensional con ionización por electrospray (HPLC/ESI+MS). La ionización de los analitos se realizó en modo de ion positivo (PI). La identificación y confirmación de los compuestos de interés se basó en las medidas de masa de los iones seleccionados para cada compuesto, generalmente la molécula protonada y un fragmento de gran intensidad. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna de gel de sílice C₁₈ en fase reversa (125 mm x 3 mm). Respecto a la fase móvil, se trabajó en modo de gradiente de elución, empleando metanol y una disolución acuosa heptafluorobutírico (5 mM) de

ácido, el cual actuaba como formador de pares iónicos. El pH de la fase móvil se sitúa en torno a 2.4 ± 0.2 . Para la cuantificación se utilizó como patrón interno taurina. Se estudió el rango dinámico lineal de 0.05 a 20 ppm, y se alcanzaron límites de detección de 0,021 a 1,520 ppm para el modo full scan, y de 0,015 a 0.303 ppm para el modo MRM.

In this paper, we has developed a method for determining 6 water soluble vitamins about B group, these are: B₁ (thiamine), B₂ (riboflavin), B₃ (nicotinamide), B₅ (pantothenic acid), B₆ (pyridoxine) and B₇ (biotin) in four different nutritional supplements in the form of fruit juices and tablets. The developed method of sample preparation based on extraction by acid-enzymatic digestion and liquid-liquid extraction with methanol to liquid samples and a solid-liquid extraction for solid samples. After preparation of the sample by the corresponding procedure, extracts were analyzed by high performance liquid chromatography/mass spectrometry ion trap with electrospray ionization (HPLC/ESI+MS). The ionization of the analytes was performed in positive ion mode (PI). Identification and confirmation of compounds of interest was based on mass measurements of selected ions for each compound, usually the protonated molecule and a fragment of great intensity. Chromatographic separation was performed on a column of silica gel reverse phase C₁₈ (125 mm x 3 mm). Regarding the mobile phase was worked-mode gradient elution using methanol and an aqueous solution of heptafluorobutyric acid (5 mM), which acted as forming ion pairs. The pH of the mobile phase is about 2.4 ± 0.2 . For quantification, taurine was used as internal standard. The linear dynamic range was studied from 0,05 to 20 ppm, and detection limits of 0,021 to 1,520 ppm for the full scan mode, and 0,303 to 0,015 ppm for the MRM mode.

3. INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son uno de los mitos de la alimentación. Al contrario de lo que se cree no aportan energía, pero sin ellas el cuerpo humano no puede aprovechar los elementos energéticos suministrados por la alimentación. Las células son las más

beneficiadas por las vitaminas, porque éstas sirven para elaborar enzimas que regulan las reacciones químicas que se dan en todo ser vivo.

El cuerpo humano es capaz de sintetizar algunas vitaminas como la D, que se puede formar en la piel mediante exposición a la luz solar, y las vitaminas B₁, B₉, B₁₂, y K, formadas en la flora intestinal. La mayoría de las vitaminas nos las aporta una buena alimentación, pero a veces estas no son suficientes para satisfacer todas las necesidades del organismo, por lo que recurrimos a suplementos alimenticios.

Uno de los suplementos alimenticios más utilizados son los zumos de frutas, de verduras y/o de bayas, compuestos por oligonutrientes que, aparte de vitaminas, contienen también otros muchos nutrientes como sales minerales o aminoácidos que pueden mejorar nuestra salud y bienestar.

Las vitaminas se pueden clasificar en dos grupos, liposolubles e hidrosolubles.

Las liposolubles, vitaminas A, D, E, K y F, se almacenan en el hígado y tejidos adiposos, por lo que un consumo excesivo puede ser tóxico.

El otro grupo de vitaminas son las hidrosolubles, vitaminas B₁, B₂, B₃, B₅, B₇, B₉, B₁₂ y C llamadas así porque son solubles en agua y, por tanto, pueden pasar de los alimentos al agua de lavado o de cocción. A diferencia de las vitaminas liposolubles, éstas no se almacenan en el organismo, como consecuencia es indispensable una aportación regular. El exceso de vitaminas hidrosolubles se excreta por la orina, por lo que en general no tienen efecto tóxico por elevada que sea su ingesta.

Una dieta equilibrada debería bastar para adquirir las vitaminas necesarias. No obstante el consumo de estos productos, entre bebidas y complejos vitamínicos, sin supervisión médica, es desorbitado en nuestro país, gastándose los españoles una media de 31 millones de euros anuales en estos productos ^[1]. El acceso a estos suplementos es relativamente fácil, ya que se pueden adquirir en comercios locales y comercios cibernéticos, en formato de zumos y bebidas isotónicas, e incluso en farmacias, sin precisar de receta médica.

En general, el consumo de alimentos ricos en oligonutrientes es considerado como una alternativa o planteamiento complementario a incrementar la ingesta de estas sustancias. Los zumos pueden ser un producto idóneo para el enriquecimiento de estos nutrientes, como resultado de su elevado consumo, aportan gran cantidad de vitaminas hidrosolubles. Por este motivo, se han seleccionado estos compuestos orgánicos para la realización de este trabajo.

4. ANALITOS: VITAMINAS HIDROSOLUBLES DEL GRUPO B

Para este trabajo se seleccionaron, como analitos, las vitaminas ^[30, 31] B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂ y C (Fig. 1.) ^[2]:

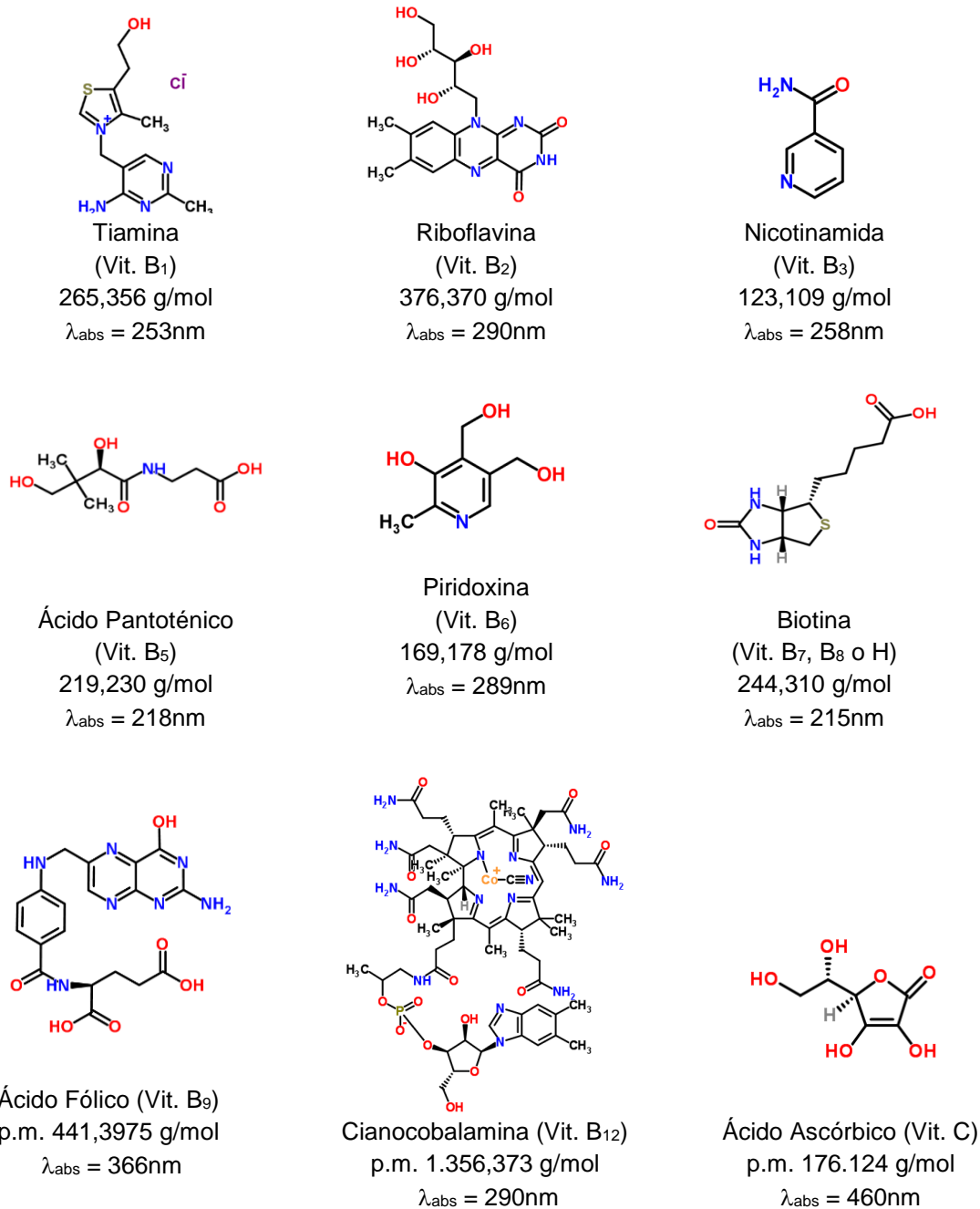


Fig. 1. Analitos Seleccionados ^[35]

- **Tiamina (vitamina B₁):** molécula que consta de dos estructuras cíclicas orgánicas interconectadas: un anillo pirimidínico con un grupo amino y un

anillo tiazol azufrado unido a esta por un puente metileno. Interviene en la regulación del sistema nervioso, su deficiencia puede provocar afecciones cardíacas. Se encuentran en cereales, carnes, frutas, vegetales de hojas verdes y vísceras.

- **Riboflavina (Vitamina B₂):** vitamina de color amarillo, constituida por un anillo de isoaloxazinadimetilado al que se une el ribitol, un alcohol derivado de la ribosa. Los tres anillos forman la isoaloxacina y el ribitol es la cadena de 5 carbonos en la parte superior. Esta colabora en el metabolismo y formación de tejidos. Su deficiencia puede ocasionar lesiones en la piel y sensibilidad a la luz. Se encuentran en leche, carnes, verduras, cereales y legumbres.
- **Nicotinamida (Vitamina B₃):** con el término genérico de niacina o vitamina PP se conoce el ácido nicotínico, su amida (la nicotinamida) y todos los derivados biológicos que se pueden transformar en compuestos biológicamente activos. Por lo general se define la actividad de la niacina como concentración de ácido nicotínico, formado por la conversión del triptófano contenido en los alimentos. Actúa en el proceso de vasodilatación y en la producción de hormonas y neurotransmisores indispensables para el sistema nervioso. La deficiencia de esta provoca la pelagra, cuyos síntomas abarcan: delirios, diarrea, membranas mucosas inflamadas, confusión mental y úlceras cutáneas descamativas. Se encuentran en cereales, vísceras y frutos secos.
- **Ácido Pantoténico (Vitamina B₅):** consiste en el ácido pantoico unido mediante un enlace peptídico a la β alanina. Colabora en la formación de hormonas y en la metabolización de ácidos grasos. La deficiencia de esta en humanos es muy poco frecuente, sólo se ha observado en casos de desnutrición graves. Sus síntomas son dolor de cabeza, fatiga, insomnio, trastornos intestinales y entumecimiento y hormigueo en las manos y pies. Se encuentran en levaduras, verduras, huevos, vísceras, cereales, frutos secos, carnes y frutas.

- **Piridoxina (Vitamina B₆):** colabora en la formación de glóbulos rojos. Una deficiencia severa de vitamina B₆ es inusual, su carencia causa trastornos neurológicos como irritabilidad, depresión y confusión, y otros síntomas como inflamación de la lengua y úlceras bucales. Se encuentran en carne, pescado azul, verduras, cereales, legumbres frutas y vísceras.
- **Biotina (Vitamina B₇, B₈ o H):** indispensable en la formación y mantenimiento de la piel y sus componentes, como las glándulas sebáceas, también interviene en el desarrollo de las glándulas sexuales. La deficiencia de biotina es muy inusual, esta puede ser por una alimentación parenteral prolongada sin suplementación de vitamina B₇, durante un consumo de clara de huevo cruda por periodos prolongados, la proteína avidina presente en la clara de huevo cruda se une a la biotina e impide su absorción, por el consumo de medicamentos anticonvulsivos, o durante el embarazo. Además, algunas enfermedades hepáticas podrían aumentar la necesidad de B₇. Los síntomas incluyen pérdida de cabello y piel roja y escamosa en torno a ojos, nariz, boca y genitales, y afecciones neurológicas como depresión, letargo, alucinaciones y entumecimiento y hormigueo en las extremidades. Se encuentran en huevos, vísceras, levaduras, leguminosas, leche y frutas.
- **Ácido Fólico (Vitamina B₉):** indispensable para la división y multiplicación celular. Su deficiencia suele estar causada por una insuficiencia dietética, embarazo o cáncer, que repercuten en una mayor división celular y metabolismo y, por lo tanto, crean una mayor demanda de folato en el cuerpo, produciendo anemia megaloblástica o macrocítica, que causa fatiga, debilidad y dificultades respiratorias. Se encuentran en vegetales, vísceras, frutos secos, cítricos, cereales, huevos, legumbres y hongos.
- **Cianocobalamina (Vitamina B₁₂):** interviene en la síntesis de ADN y ARN. Las causas más comunes de su deficiencia son una afección autoinmunitaria, anemia perniciosa, y una mal absorción de la misma por inflamación y deterioro estomacal e intestinal. Se encuentran en pescado, vísceras, huevos, queso, leche y carnes.

- **Vitamina C:** enantiómero L del Ácido Ascórbico o antiescorbútica. Nutriente esencial especialmente para mamíferos. La presencia de esta vitamina es requerida para un cierto número de reacciones metabólicas en todos los seres vivos y es creada internamente por casi todos los organismos, siendo los humanos una notable excepción. Su deficiencia causa escorbuto en humanos, y es ampliamente usada como aditivo alimentario para prevenir esta enfermedad.

5. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA MUESTRAS DE CARÁCTER ALIMENTICIO

La calidad y fiabilidad de los análisis de productos alimenticios debe ser un punto muy importante en el desarrollo del método así como en la selección de la técnica analítica, ya que la presencia de errores en los resultados presentados puede generar grandes problemas tanto de salud como económicos. Por esto, se debe disponer de métodos de análisis adecuados a las necesidades de la realidad del problema analítico en cada caso. El uso de los nuevos avances instrumentales en química analítica se presenta como una herramienta adecuada y muy útil para afrontar la problemática del análisis de sustancias orgánicas en muestras de alimentos.

Desde el punto de vista analítico es muy importante establecer unos criterios de elección de la técnica y del método que mejor se ajuste a las necesidades del problema que se desea afrontar. Tradicionalmente, para el análisis de compuestos orgánicos en muestras alimenticias, se ha utilizado la cromatografía líquida (LC) con detección Ultravioleta-Visible (UV), Diodo Array (DAD), Fluorescencia (FD) o Espectrometría de Masas (MS) para sustancias de alta polaridad o inestabilidad térmica; y la Cromatografía de Gases (GC) con detección de captura de electrónica (ECD) o Espectrometría de Masas (MS), para el análisis de sustancias más apolares, con cierta estabilidad térmica y volatilidad.

La visión actual del desarrollo de metodología de análisis HPLC acoplado a Espectrometría de Masas, así como su aplicación en el estudio de vitaminas

hidrosolubles se exponen con mayor profundidad en cada uno de los apartados siguientes que comprende este trabajo fin de grado.

5.1. Cromatografía líquida de reparto o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) es una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad, gracias a su gran sensibilidad, a su capacidad de determinaciones cuantitativas exactas y de separación de especies termolábiles o no volátiles [11]. Esta es una técnica separativa basada en la afinidad que los componentes tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, líquida, que fluye sobre otra estacionaria, sólida, empaquetada en una columna. La fase móvil se compone generalmente de una mezcla de disolventes con distinta fuerza eulotrópica. La separación es una consecuencia de la diferencia de coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, que produce sucesivas etapas de adsorción y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria.

La clasificación de las diferentes cromatografías líquidas se centra en las variaciones de las composiciones químicas de los tipos de relleno de la fase estacionaria. Cada tipo de material de relleno tiene unas características fisicoquímicas que producen diferentes mecanismos de separación. El uso de HPLC en fase reversa se ajusta adecuadamente al análisis de analitos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos.

El tipo de material apolar con que se rellenan las columnas de HPLC en fase reversa suele ser sílica químicamente modificada (cadenas de C₈, C₁₈, C₃₀...), aunque también se hace uso de otros materiales como copolímeros de estireno-divinilbenceno (XAD, PRP) o partículas de sílice-carbón (X-Terra). Como fase móvil se utilizan disolventes con cierta polaridad, generalmente mezclas de agua con disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo [3, 12].

El porcentaje y tipo de modificador orgánico en la fase móvil es el factor más determinante en la retención de los analitos polares pero no iónicos. Las interacciones entre el analito y el solvente son las que determinan la especificidad de la HPLC en fase reversa, ya que las interacciones del analito con la fase

estacionaria son relativamente débiles, interacciones de Van der Waals no específicas. La retención disminuye en función de la polaridad del analito.

Debido a la alta volatilidad de los disolventes utilizados como fase móvil y la idoneidad de esta cromatografía para analitos polares, la HPLC en fase reversa se convierte en el tipo de cromatografía más ideal para el acoplamiento con la espectrometría de masas.

Cabe destacar que se ha convertido en una práctica habitual, la adición de modificadores en la fase móvil con dos finalidades: la más convencional es mejorar la forma de pico en la cromatografía de analitos ácidos o básicos; por otro lado, favorece la ionización por protonación $[M+H]^+$ o desprotonación $[M-H]^-$ del compuesto de interés ^[11].

5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas en los campos medioambiental, agroalimentario y de salud pública. El éxito de su aplicación radica en los bajos MRLs tolerados que alcanza, siendo una técnica muy apropiada para seguridad alimentaria

Además de su gran rapidez, sensibilidad y especificidad, esta técnica de detección presenta la ventaja de ser una técnica cualitativa y cuantitativa, es capaz de analizar muestras complejas, da la posibilidad de determinar especies que coeluyen y puede aportarnos información estructural e isotópica de los analitos.

El espectrómetro de masas es un instrumento capaz de separar los iones que se desplazan con rapidez según su relación masa-carga, m/z (donde m es la masa del ion en unidades de masa atómica y z es su carga). De forma muy básica, el espectrómetro de masas está formado por tres partes fundamentales:

- **La fuente de iones:** en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose; adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede

transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento.

- **Analizador de iones:** donde se analiza la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados basándose en su relación m/z.
- **Detector:** mide, amplifica y crea espectros de masas.

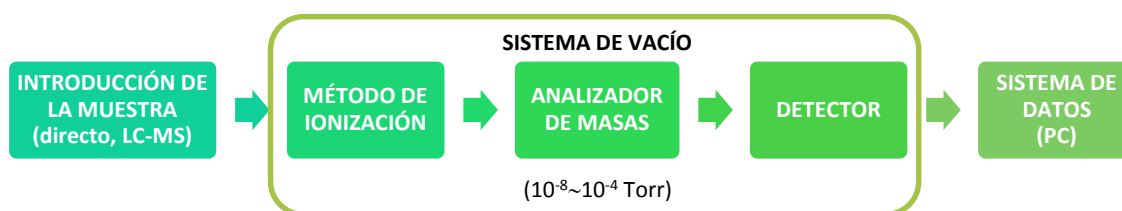


Fig. 2. Esquema de un Espectrómetro de Masas

Para que la ionización se desarrolle correctamente es necesario trabajar con alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que puedan colisionar. La colisión puede generar la fragmentación de los iones moleculares y/o producir nuevas especies por reacciones ion-molécula. Esto produciría una reducción de la sensibilidad y de la resolución del análisis, generando resultados ambiguos o mala interpretación^[11, 12, 3].

5.2.1. Modos de ionización: interfases de ionización a presión atmosférica. Ionización por Electro Spray.

El éxito en el trabajo con MS recae en gran parte en la capacidad de conseguir que los compuestos neutros se conviertan en iones moleculares o fragmentos en estado gaseoso. La ionización de los analitos es de vital importancia porque es la base de la espectrometría de masas, ya que controlar, separar y dirigir iones cargados resulta eficiente y sencillo mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos.

A lo largo de estas últimas dos décadas, se ha hecho uso de diferentes técnicas para ionizar en fase líquida, en concreto: ionización por *Termospray* (TSP),

ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización por Electrospray (ESI) [11].

En este caso se optó por la utilización de ESI, ya que resultaba más idóneo para el tratamiento de muestras.

La ionización se produce por la aplicación de un alto voltaje (3 - 6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil de la HPLC a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado. Estas gotas se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas. El flujo óptimo proveniente de la cromatografía líquida debe ser del orden de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo se han aplicado flujos mayores, de hasta 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando diseños de fuentes con energía adicional, temperatura o flujo del gas, lo que permite una mejor dispersión de las gotas a partir del capilar [12].

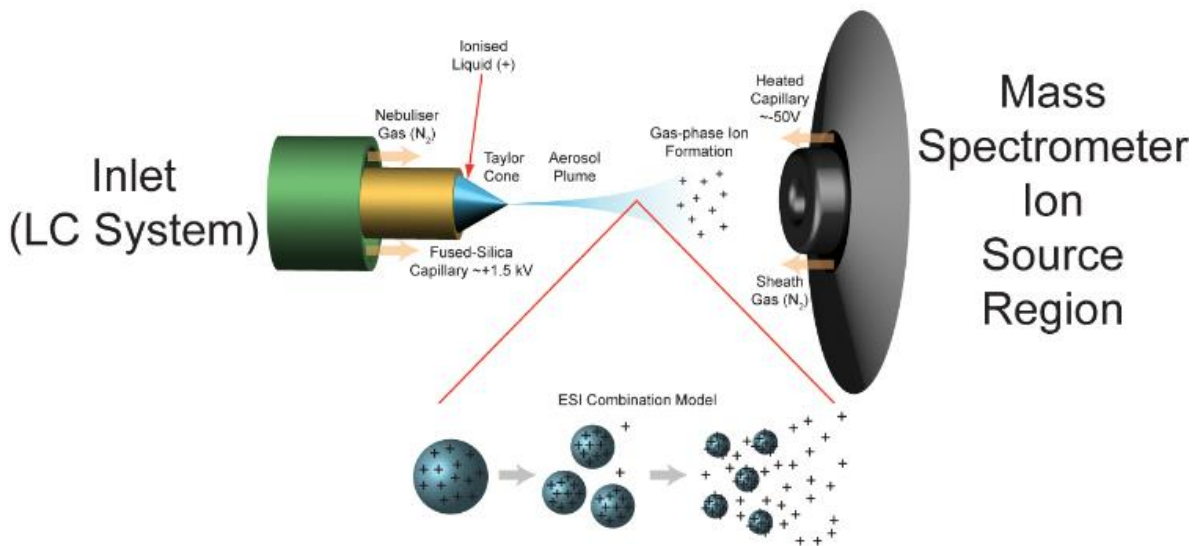


Fig. 3. Descripción general del sistema de Electrospray (ESI) y fuente de ionización [21].

Originalmente la interfase ESI se consideró como una fuente de ionización dirigida a análisis de proteínas, pues es frecuente la formación iones con más de

una carga. De forma que permite el análisis de macromoléculas en instrumentos MS donde su rango de masas no alcanzaría su peso molecular. De ahí que, posteriormente, fuera aplicada no solo a otros polímeros o biopolímeros, sino también a moléculas polares de bajo peso molecular^[11, 12].

Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como:

- **En modo positivo (PI)**, iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio.
- **En modo negativo (NI)**, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato.

5.2.2. Analizadores

Una vez los iones producidos en fase gaseosa alcanzan el analizador de masas, considerado como el alma del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga (m/z) es el que promueve la diferencia entre los distintos instrumentos de espectrometría de masas.

En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más notorios: cuadrupolo (Q), trampa de iones tridimensional ((Q)IT), trampa de iones bidimensional o lineal (LIT), Orbitrap por transformada de Fourier (FT-OT), resonancia de ion-ciclotrón por transformada de Fourier (FT-ICR) y Tiempo de vuelo (TOF). La capacidad de un analizador se evalúa de forma general en base a las siguientes características: rango de masas, resolución de masa, eficiencia de iones, exactitud de masa, rango dinámico de linealidad, velocidad de barrido y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico.

De todos los analizadores citados anteriormente nos centramos en el utilizado en el desarrollo experimental del trabajo que se presenta, la trampa iónica tridimensional^[11, 5].

5.2.2.1. Trampa iónica tridimensional

El analizador de masa tipo trampa de iones tridimensional o cuadrupolar ((Q)IT) se caracteriza porque tanto la ionización, como la separación y la detección de los iones tiene lugar en el mismo espacio, produciéndose de forma secuencial en el tiempo. La trampa de iones está formada por tres electrodos (Fig. 4), dos de ellos hiperbólicos, y entre estos un electrodo en forma de anillo toroidal, situado entre ambos electrodos hiperbólicos.

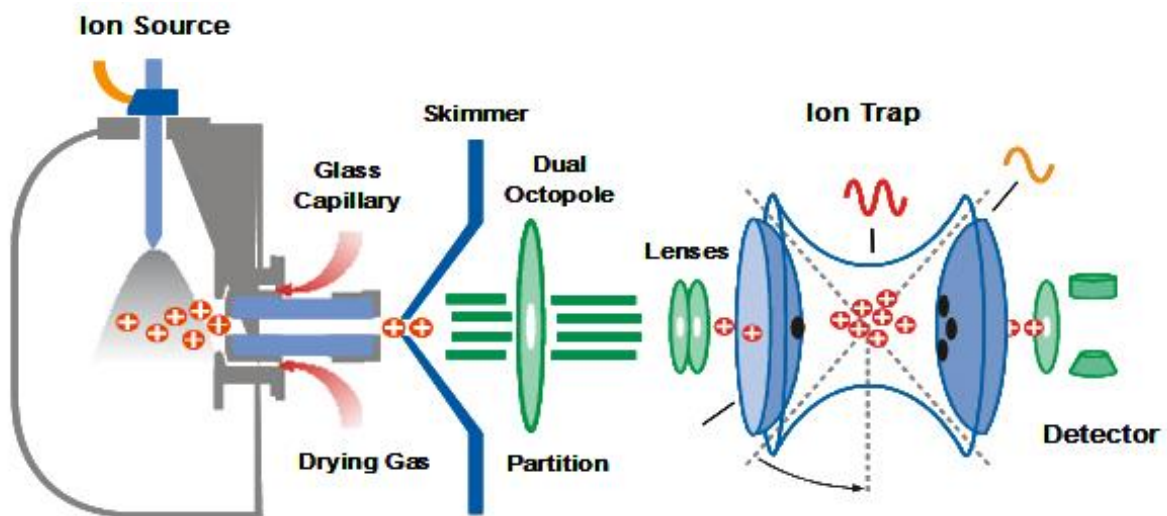


Fig. 4. Esquema de trampa iónica [32]

Una vez que las moléculas de analito alcanzan la trampa, son ionizadas y fragmentadas. Los iones son retenidos o expulsados de la trampa en función de su relación masa/carga, ya que, para unos voltajes de radiofrecuencia (RF) y corriente directa (DC) dados, sólo determinadas relaciones m/z describirán trayectorias tales que permitan que el ion se encuentre confinado en la trampa. Una vez que los iones son expulsados de la trampa pasan al detector.

Se aplican, simultáneamente, una corriente continua y un potencial de radiofrecuencia, de tal forma que los iones generados quedan confinados dentro del anillo toroidal.

Los iones son expulsados de la cámara tras la aplicación de rampas de radiofrecuencia. Conforme aumenta el voltaje, aumenta la amplitud de su movimiento oscilatorio hasta ser expulsados. Los iones de mayor masa se desestabilizan conforme va aumentando el voltaje de radiofrecuencia, de tal forma

que los iones se detectan de forma secuencial, obteniendo así el espectro en función del voltaje y la masa.

Este tipo de analizador es muy útil para obtener espectros de masas en modo Scan en los que se filtran todos los iones comprendidos en un rango m/z determinado. Este tipo de espectros son muy ricos en iones y muy informativos. A diferencia de los analizadores de tipo cuadrupolar, en los analizadores de tipo trampa de iones estos espectros pueden ser obtenidos sin que se produzca una considerable pérdida de sensibilidad.

Otra característica de estos analizadores es que permiten obtener espectros de masas de iones productos (MS^n) lo que tiene mucho interés en la elucidación estructural [4, 5].

5.2.3. Detectores

Tras la salida de los iones del analizador, estos se dirigen al detector, que registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa muy cerca de su superficie o la golpea. Se distinguen varios tipos [11]: Copa de Faraday, Multiplicadores de electrones de dínodos separados, multiplicadores de electrones de dínodo continuo y detectores de microcanales, en este caso nos centramos en el multiplicador de electrones de dínodo continuo, que es el que presenta el equipo de trabajo.

- **Multiplicadores de electrones de dínodo continuo:** los iones son desviados a un colector cuya entrada cónica, de vidrio o berilio, hace de cátodo de conversión. Los electrones liberados son atraídos hacia el electrodo positivo. Los constantes choques de los electrones con la pares provocan su multiplicidad.

5.3. Modos de trabajo típicos de los analizadores de masas de trampa iónica.

Los modos de adquisición más usuales que se pueden aplicar son [4]:

- **Barrido de todos los iones (full scan):** En este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector.
- **Adquisición de un ion seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM):** dirigida a la medida de un solo ion.
- **Adquisición de la reacción seleccionada (Multiple/Selected Reaction Monitoring, MRM o SRM):** se fragmenta un ion precursor en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima. Tras su destrucción en la trampa, se selecciona un ion específico (ion producto) que incida en el detector MS para lograr su detección.
- **Barrido de iones precursor (Precursor Ion Scan):** primero se realiza un barrido de todos los iones provenientes de la interfase, fragmentándose a una energía de colisión determinada, luego, se selecciona uno de todos los fragmentos obtenidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudiando las posibilidades de análisis de estas vitaminas se observa que no es posible utilizar los detectores más usuales de los que se suelen encontrar en un laboratorio.

En el caso de utilizar un detector de absorción UV-Vis, ya que las vitaminas tienen longitudes de absorción muy próximas entre sí (fig. 1.), o incluso idénticas, como pasa con la riboflavina y la cianocobalamina, que ambas absorben a 290nm, y a pesar de que la separación cromatográfica fuese posible, la caracterización espectroscopía UV induciría a error.

Tampoco es posible la utilización de detectores de fluorescencia, ya que no todas las vitaminas presentan fluorescencia intrínseca. Para poder medir la fluorescencia de las vitaminas no fluorescentes se requieren procesos de derivatización, ya sean en pre- o postcolumna, como por ejemplo para la

determinación de tiamina, que ha de oxidarse a tiocromo, compuesto fluorescente, mediante una reacción de oxidación con permanganato potásico.

Por estos motivos se toma la decisión de utilizar como técnica de detección la espectrometría de masas, que estudia la materia mediante formación de iones en fase gaseosa determinando su relación masa-carga (m/z).

6.1. Reactivos.

Los estándares de: tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina y ácido ascórbico, y los patrones internos: taurina, ácido hipúrico y ácido 5-aminosalicílico, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, al igual que el metanol de grado HPLC y el formador de pares iónicos, ácido heptafluorobutírico.

El agua ultra pura (18,2 μ S) se preparó por un sistema de purificación Milli-Q Gradient A10.

Los cuatro suplementos alimenticios, dos en forma de zumos, y dos en forma de grageas, fueron adquiridos en centros comerciales locales.



Fig. 5. Suplementos alimenticios utilizados para la determinación de

Tanto las vitaminas como los patrones internos fueron preparados, en mix e individualmente, en disolución acuosa a pH 4.5. A excepción de las vitaminas B₂ y B₉, que se disolvió en ácido clorhídrico (HCl) 0.1N ^[8], y solo se preparó de forma individual. Se pesaron las cantidades necesarias de cada vitamina para obtener una concentración de 250 ppm (disoluciones madre) de: B₁, B₃, B₅, B₆, B₇, B₁₂ y C, y 70 ppm de B₂ y B₉, en un volumen de 50 mL, para este cálculo se tuvo en cuenta tanto el peso molecular como la pureza de cada uno de estos estándares. De igual manera se prepararon las disoluciones de los patrones internos, también a una

concentración de 250 ppm, ya que a menor concentración era muy difícil la preparación de las disoluciones de trabajo. Cada uno de estos estándares se dividió en dos partes, siendo almacenados en botes ámbar, para evitar la fotodegradación que pudiesen presentar, como es el caso de la B₂, y fueron preservados: uno a +4°C y otro a -20°C.

A partir de estos estándares, se prepararon disoluciones de 1ppm, para la realización de infusiones directas, y de 2 ppm para el estudio de desplazamiento, tanto de cada vitamina, como del patrón interno, a la hora de interpretar el cromatograma. También, se prepararon disoluciones multipatrón a partir de los estándares, que fueron usadas, en primer lugar, para optimizar la separación cromatográfica, y en segundo, para la construcción de la recta de calibrado.

6.2. Equipos e Instrumentos.



Fig. 6. Sistema cromatográfico Agilent 1100 – Esquire 6000.

El sistema cromatográfico está compuesto de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, (Agilent 1100 de Agilent), acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica como analizador, equipado



Fig. 7. Termobloque Grant QBH2.

con un ionizador de electrospray (ESI), (Esquire 6000 de Bruker Daltonics).

El digestor utilizado fue un Termobloque Grant QBH[®] de bloques intercambiables, que presenta control digital de temperatura y permite trabajar hasta 200°C.

El medidor de pH utilizado fue un pH-meter GLP 21 de Crison, el cual presenta una resolución seleccionable entre 0.1, 0.01 y 0.001 pH. El electrodo utilizado fue un electrodo de pH Crison 52-09 para micromuestras, con una escala de pH 0-14, un diámetro de 6mm, membrana semiesférica micro, electrolito interno de la membrana gelificada, cuerpo de vidrio, diafragma cerámico, como elemento de referencia utiliza cristales de Ag/AgCl encapsulados, y un rango de temperatura de trabajo 0-80°C.



Fig. 8. pH-meter GLP 21 de Crison.

6.3. Preparación de muestras

Se realizaron tres tipos de tratamiento de muestra. Para zumos se realizaron dos de ellas, una extracción líquido-líquido con metanol, para determinar el contenido de vitaminas libres, y una hidrólisis ácida-enzimática, para determinar el contenido total de vitaminas en los suplementos alimenticios a estudiar. Para las grageas se realizó una extracción sólido-líquido.

- **Tratamiento 1: extracción sólido-líquido.**

Se disolvieron 0,114g y 0,607g de píldoras de Greens y Micebrina respectivamente en 50mL de agua Milli-Q a temperatura ambiente, y se filtraron en

papel Whatman de grado 40 a vacío. Dos mililitros de filtrado fueron almacenados en un vial de cromatografía de color ámbar, y almacenados en refrigeración a 4°C hasta su uso. 1µL se inyectó en el sistema cromatográfico [29].

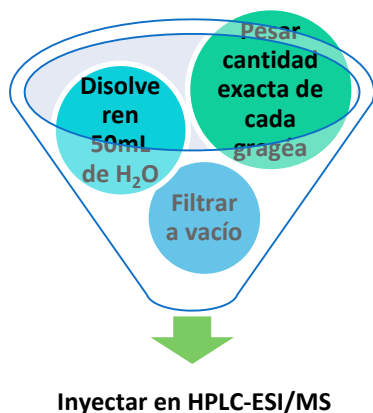


Fig. 9. Descripción general del procedimiento de disolución de grageas

- **Tratamiento 2: extracción líquido-líquido.**

Se pesaron 0,5g de muestra de zumo y extrajeron con 1mL de metanol (MeOH) de grado HPLC, se centrifugó durante 5 minutos a 2000rpm, y se filtró en papel Whatman de grado 40 a vacío. 2mL de filtrado fueron trasvasados a un vial de cromatografía de color ámbar, para evitar la degradación de tiamina y riboflavina, y almacenados en refrigeración a 4°C hasta su uso. 1µL se inyectó en el sistema cromatográfico [8, 15].

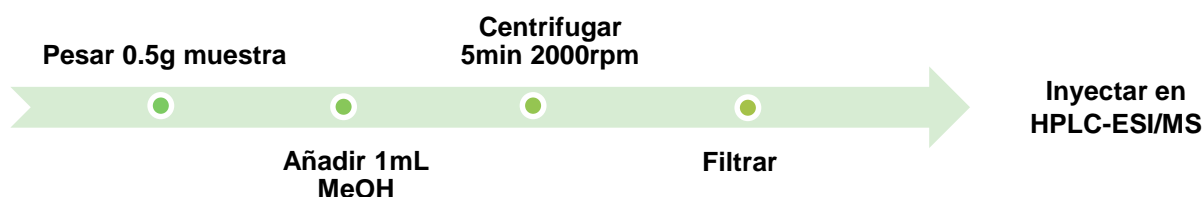


Fig. 10. Descripción general del procedimiento de extracción para muestras líquidas

- **Tratamiento 3: hidrólisis ácida-enzimática.**

Es recomendable que la extracción de las vitaminas del grupo B en muestras reales se realice mediante una hidrólisis enzimática; este tratamiento enzimático fue precedido por una hidrólisis ácida, recomendado por el método AOAC Internacional [8]. La hidrólisis ácida relaja los complejos proteicos para liberar las vitaminas a

analizar de la matriz de la muestra. Además, esta hidrólisis crea las condiciones idóneas para que las vitaminas que presentan varias formas, cambien a su forma más estable, como ocurre por ejemplo con el ácido nicotínico que, tras la hidrólisis ácida, se encuentra como Nicotinamida, pudiendo analizar toda esta vitamina en la misma conformación.

Los ésteres de vitaminas fosforiladas pasaron a sus formas libres mediante el uso de la mezcla de enzimas. Este método se extrajo de una de las referencias bibliográficas utilizadas [18] y modificó, reduciendo de 10 a 0,5mL de analito. Esto se decidió por dos motivos: que no se disponía de la instrumentación necesaria para realizar el tratamiento por tan alto volumen de muestra requerida, y por la tendencia analítica a la reducción del consumo tanto de reactivos como de muestras, de manera que reduciendo dicho volumen, se pudo hacer uso del termobloque.

Procedimiento: 2,5mL de HCl 0.1M, y 10ppm de cada patrón interno se añadieron a 0.5mL de muestra de zumo, en viales de reacción de 5mL, que se calentaron en el Termobloque durante 30 minutos a 100°C. Una vez enfriado, se ajustó el pH a 4,5 con acetato sódico 2,5M.



Fig. 11. Resultado tras la digestión enzimática.



Fig. 10. pH-metro

Posteriormente se añadió una mezcla de 40mg de papaína y 100mg diastasa por cada gramo de muestra. Para corregir la adición de las enzimas a la mezcla vitamínica, se preparó un blanco enzimático. La mezcla se mantuvo a 37°C durante 18h, tras esta incubación enzimática las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min, para inactivar la enzima, y se llevó a un volumen de

25ml con agua destilada. Antes del análisis por HPLC, las muestras se filtraron a través de un papel de filtro Whatman de grado 40. Una alícuota de 2mL del filtrado se trasvasó a un vial de cromatografía de color ámbar, para evitar la degradación de ciertas vitaminas, y almacenados en refrigeración a 4°C hasta su uso. 1µL se inyectó en el sistema HPLC/ESI-MS.

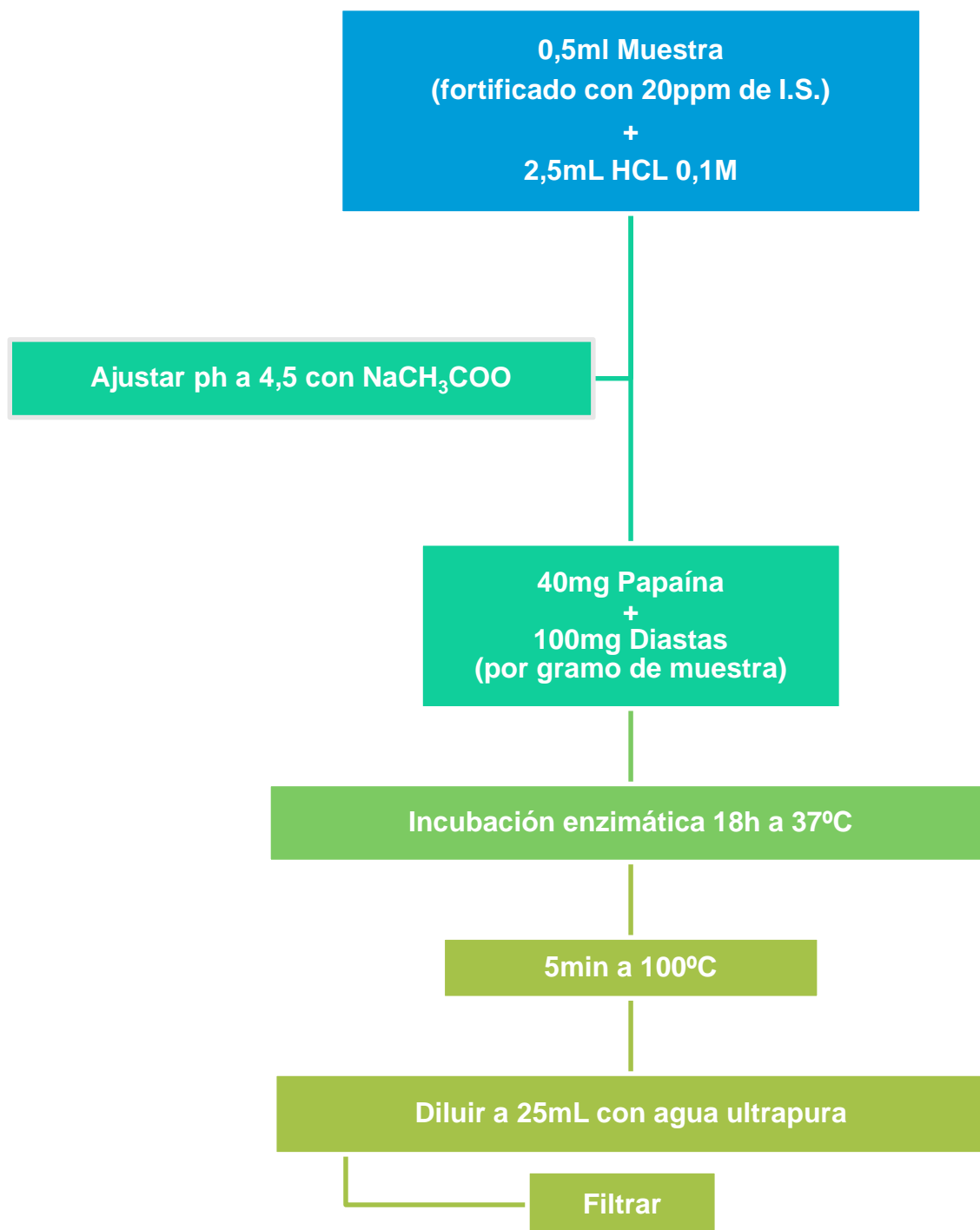


Fig. 12. Descripción general procedimiento de extracción hidrólisis ácida-enzimática

Los 2mL de cada una de las disoluciones, tanto estándares como muestras, trasvasados a los viales de cromatografía, fueron filtrados a través de filtros de jeringa de PTFE de 20 μ m, antes de ser almacenados en dichos viales.

6.4. Condiciones HPLC-ESI/MS

La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna cromatográfica de fase reversa de gel de sílice C18, Waters Spherisorb® Cartridge Columns Packed con un poro de 5 μ m y unas dimensiones de 3mm de diámetro interno por 125mm de longitud.

La tasa de flujo fue de 0.4mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. El rango de presión en columna fue 0 a 400 bar, y la compresibilidad de 100·10⁻⁶ bar⁻¹. El volumen de inyección fue 1 μ L. La columna (C₁₈) se lavó con 100% de metanol durante 5 min después de cada análisis, y después equilibrar durante 10 min con la fase móvil inicial antes de la siguiente inyección.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Optimización de las condiciones HPLC/ESI-MS

7.1.1. Optimización de parámetros para MS.

La optimización de dichas condiciones comenzó con la determinación de iones precursores y los diferentes fragmentos, de cuantificación y confirmación, tanto de los analitos como de los patrones internos, mediante espectrometría MS por infusiones directas.

La ionización por electrospray se hizo funcionar de forma continua. El voltaje del capilar y la amplitud del octopolo de referencia se fijaron en 4000V y 122.8V, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 365°C. El flujo de gas de desolvatación se fijó en 10L/min. Los espectros de MS se adquirieron desde una relación m/z de 50 a 1500, mientras que los de MS² ya eran de forma específica de cada uno de los iones precursores.

Teóricamente, el equipo estaba preparado para trabajar en modo de ionización conmutado, positivo y negativo, pero en la práctica esto no fue posible, ya que el software disponible, no permitía esta forma de trabajo. Esto hizo que solo se seleccionara el modo de ionización positiva, teniendo que descartar el estudio de aquellos analitos de ionización negativa como eran el Ácido Ascórbico y el Fólico, que a pesar de que este último presentase cierta ionización en modo positivo, apenas presentaba sensibilidad a la misma.

Algunos ejemplos de espectros de masas típicos, obtenidos de las infusiones directas, se presentan a continuación.

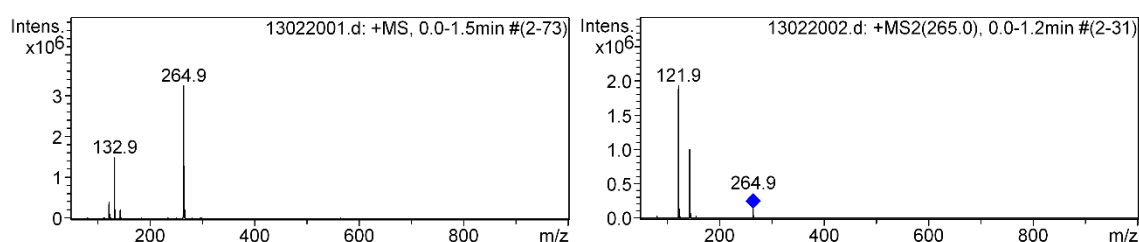


Fig. 13. Espectros ESI+MS y ESI+MS² de B1.

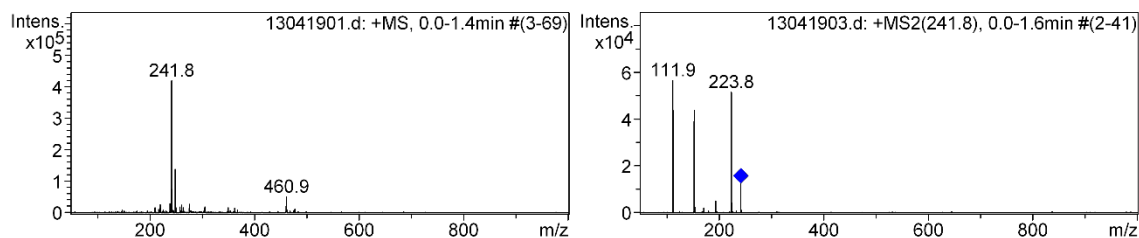


Fig. 14. Espectros ESI+MS y ESI+MS² de B5.

La tasa de flujo de gas y la temperatura de desolvatación se fijaron en 300L/h y 250°C, respectivamente. Las vitaminas se analizaron en modo PI. La tensión capilar y voltaje del cono se fijaron en 3500V y 20V, respectivamente.

Una vez optimizado el método en modo full scan, y haciendo uso de la información relativa a los fragmentos, obtenida de los espectros de MS² de las infusiones directas, datos reflejados en la tabla 1, y los tiempos de retención pertinentes de cada compuesto de los cromatogramas obtenidos por full scan, se decide trabajar en modo de adquisición MRM, optimizando tanto las ventanas de

tiempo de trabajo, como se observa en la figura 22 del apartado 7.2., como las condiciones de fragmentación de cada uno de los analitos y patrones internos, mostrados en la tabla 2.

Vit.	M _w	Ion precursor	Ion seleccionado cuantificación	Iones seleccionados confirmación	
TAU	125.15	148 [M+Na] ⁺	148	--	--
B₃	122.00	123 [M+H] ⁺	123	--	--
A5AS	153.13	154 [M+H] ⁺	136	--	--
B₅	219.00	242 [M+Na] ⁺	224	153	112
B₆	169.00	170 [M+H] ⁺	152	--	--
HA	179.00	202 [M+Na] ⁺	202	184	--
B₁	337.00	265 [M-2Cl-H] ⁺	122	144	--
B₇	244.31	245 [M+H] ⁺	227	--	--
B₂	376.00	377 [M+H] ⁺	243	--	--

Tabla 2. Iones Seleccionados. (Vit.- vitamina, M_w- peso molecular).

Analito (elución creciente)	Amplitud (V)	Skym	Skym Media	Capilar exit	Capilar exit Media	Tramp diver	Tramp driver Media
Tau (I.S.)	0.28	100.0	100.0	300.0	300.0	116.5	116.5
B₃	0.55	24.8	20.0	132.0	100.0	25.0	30.0
B₅	0.60	17.8		127.9		37.0	
B₆	0.60	20.0	20.0	103.3	103.3	30.4	30.4
B₇	0.30	30.0	25.0	150.0	200.0	40.0	45.0
B₁	0.40	41.5		99.2		38.2	
B₂	0.40	33.1	33.1	213.9	213.9	47.0	47.0

Tabla 3. Optimización para método MRM (MS/MS)

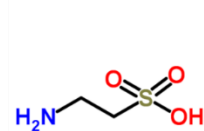
7.1.2. Selección del Patrón Interno

En principio fue utilizado ácido hipúrico como estándar interno, el cual se seleccionó ya que era el más usado en los trabajos de referencia [19, 21], y aunque no era tan sensible en ionización en modo positivo, como lo era en modo negativo, resultaba óptimo en cuanto a la señal que proporcionaba. Además, habiendo estudiado las estructuras de cada analito, se decidió adicionar dos patrones internos más. Esto fue porque el ácido hipúrico, a pesar de haber sido adecuado en el estudio de suplementos alimenticios en grageas, según bibliografía, era posible que no resultase adecuado en estudio de las muestras en forma de zumos de frutas, debido a la diferente naturaleza de los distintos analitos, ya que no todos van a tener el mismo comportamiento durante el tratamiento de muestras.

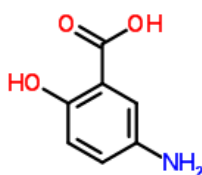
Por eso se decidió mantener el ácido hipúrico para analitos aniónicos, y utilizar taurina, para neutros, y ácido 5-aminosalicílico para catiónicos.

Ácido hipúrico	Aniónicas (ácidos)	Ácido pantoténico Ácido fólico
Taurina	Neutras	Riboflavina Nicotinamida Piridoxina Biotina
Ácido 5-aminosalicílico	Catiónicas	Tiamina Cianocobalamina

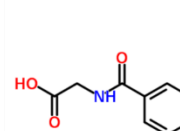
Tabla 4. Correspondencia de I.S. con analitos.



Taurina
p.m. 125,15 g/mol



Ácido 5 - aminosalicílico
p.m. 153,135 g/mol



Ácido hipúrico
p.m. 179,17 g/mol

Fig. 15. Patrones Internos seleccionados

7.1.3. Optimización de las condiciones cromatográficas.

Antes de comenzar con el estudio de las vitaminas, se decidió realizar un análisis cromatográfico preliminar de las mismas, con las condiciones cromatográficas que se obtuvieron de una de las referencias bibliográficas [19].

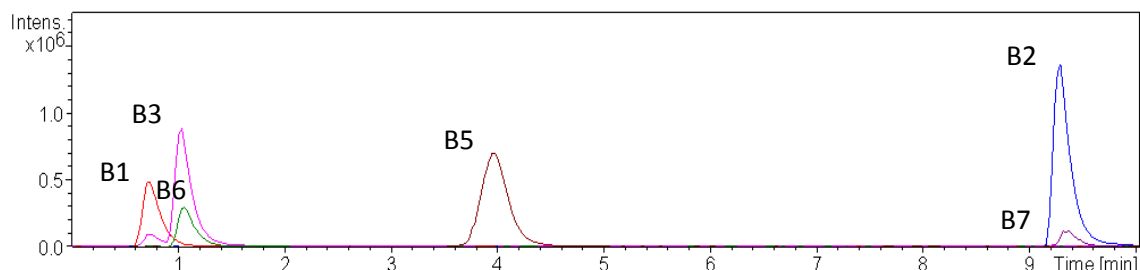


Fig. 16. Cromatograma método de partida.

Este primer método base utilizaba como fase móvil: Agua – Metanol + 0,1% ácido fórmico (H₂O – MeOH+0,1%H⁺). Como resultado se obtuvo el siguiente cromatograma (Fig. 16), mediante full scan, que duró 10 minutos, para 1ppm de B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇ y B₁₂.

En este se observó que todos los analitos proporcionaban picos definidos, y que existía solapamiento entre B₁ con B₃ y B₆ cerca del frente de elución, y B₇ con B₂ al final del cromatograma. También resultó llamativo que la Tiamina saliese a un tiempo de retención menor de un minuto. La B₁₂ no aparece en el cromatograma, esto puede ser debido a que quedase retenida en la columna, ya que la duración del cromatograma fuese demasiado corta o su concentración muy baja, aun así, decidimos seguir trabajando con ella, por lo que se tuvo que aumentar el tiempo de análisis, además de su concentración.

T _r (min)	Agua	MeOH + 0.1% H ⁺	Flujo	Gradiente elución
0	100	0	0.25	Lineal
2.5	100	0	0.25	Lineal
7.5	50	50	0.25	Lineal
9.5	5	95	0.25	Lineal
10	5	95	0.25	Lineal
11.5	100	0	0.25	Lineal

Tabla 5. Gradiente de Elución HPLC, método de partida.

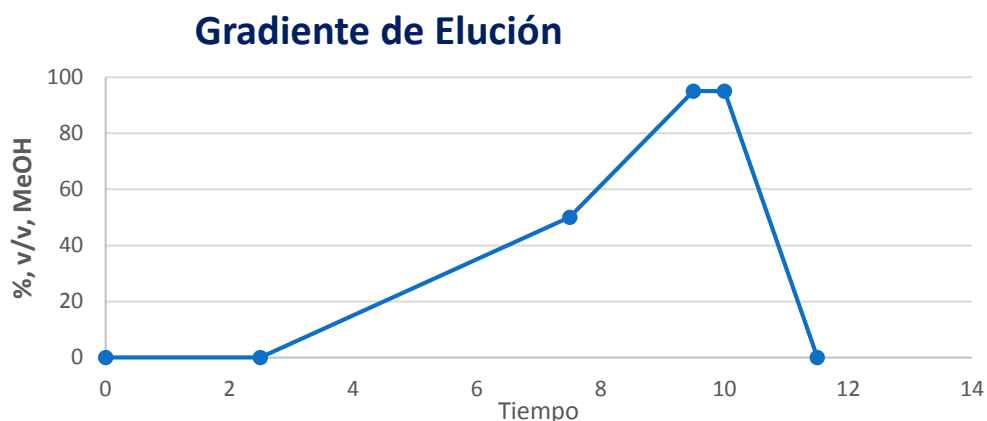


Fig. 17. Gradiente de Elución, método de partida.

En cuanto al solapamiento no presenta ningún tipo de problema, ya que en espectrometría de masas, cada pico corresponde a una relación m/z determinada, y aislando dicha masa del resto del cromatograma observamos que el solapamiento no interfiere ni modifica las áreas de unos con otros.

Para intentar solucionar la pronta salida de la vitamina B₁, B₃ y B₆, lo que puede ocasionar una mala interpretación del cromatograma cuando se aplica a muestras reales, se decidió incorporar un formador de pares iónicos.

Los compuestos altamente polares y sobre todo compuestos de carácter iónico, muestran mala retención en columnas de fase reversa, para evitar una rápida elución se incorporan en la fase móvil reactivos formadores de pares iónicos tales como: ácido trifluoroacético (CF₃COOH), ácido pentafluoropropanoico (CF₃CF₂COOH) o ácido heptafluorobutírico (CF₃(CF₂)₂COOH), que no solo aumentan la retención de estos compuestos, sino que también mejoran la separación entre ellos [18]. Entre éstos seleccionamos el ácido heptafluorobutírico 5mM, que es el seleccionado en los trabajos consultados [18, 19].

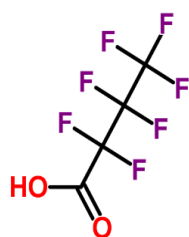


Fig. 18. Ácido heptafluorobutírico (HFBT)

Tras la selección de dicho formador de pares iónicos se realizaron análisis independientes de cada vitamina, así como de los patrones internos, estudiando el porcentaje óptimo de solventes de elución al que salían de la columna cromatográfica para cada uno de los compuestos. Para ello se utilizaba un gradiente que iba del 0% de metanol al 100%, y regreso a las condiciones iniciales, el análisis tenía una duración de 35 minutos. Tras estos estudios se pudo concluir el gradiente de elución óptimo para el nuevo método.

La duración de este método definitivo era de 35 minutos. La fase móvil consistió en:

- Una solución acuosa 5mM de Ácido Heptafluorobutírico (HFBA)
- Metanol (MeOH) de grado HPLC

T_r (min)	HFBA (%, v/v)	MeOH (%, v/v)	Gradiente elución
0	95	5	Lineal
4	95	5	Lineal
11	85	15	Lineal
15	70	30	Lineal
18	80	20	Lineal
25	80	20	Lineal
26	0	100	Lineal
30	95	5	Lineal

Tabla 6. Gradiente de Elución HPLC, método definitivo.

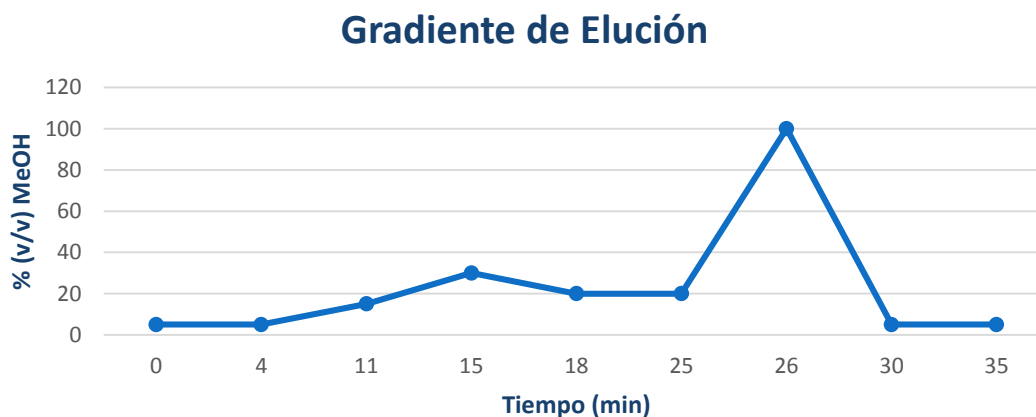


Fig. 19. Gradiente de Elución, método definitivo.

A continuación se muestra la tabla que recoge los tiempos de retención obtenidos para cada analito y para el patrón interno, así como, el cromatograma obtenido en modo full scan, del método ya optimizado, para 10 ppm de taurina, ácido hipúrico, ácido 5-aminosalicílico, 2 ppm para B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ y B₇, C y 20 ppm de B₁₂.

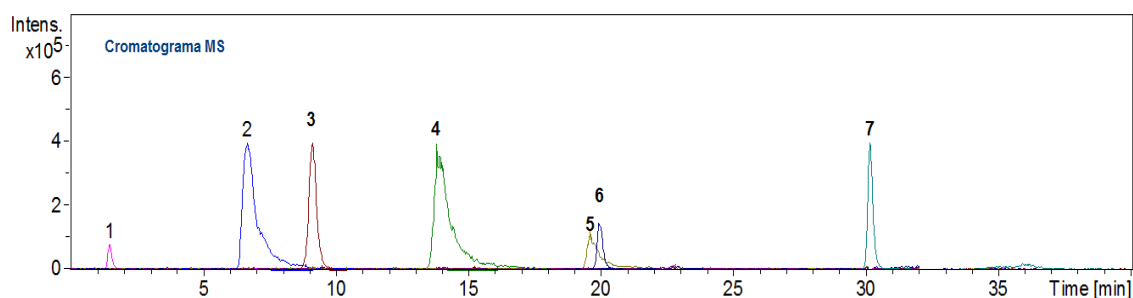


Fig. 20. Cromatograma HPLC/ESI-MS de mezcla standard de vitaminas y patrón interno a diferentes concentraciones. 1-Tau, 2-B₃, 3-B₅, 4-B₆, 5-B₁, 6-B₇ y 7-B₂.

TEIMPOS DE RETENCIÓN		
T _r (min)	Vitamina	M _w
1.2	Ácido ascórbico	176.12
1.5	Taurina	125.15
6.2	Nicotinamida	122.00
6.6	Ácido 5-aminosalicílico	153.13
8.2	Ácido pantoténico	219.00
13.3	Piridoxina	169.00
15	Ácido hipúrico	179.00
19.4	Tiamina	337.00
19.7	Biotina	244.31
22.4	Ácido fólico	441.40
30.0	Riboflavina	376.00

Tabla 7. Tiempo de retención de analitos y patrones internos

El hecho de que con este método tampoco aparezca la Cianocobalamina en los cromatogramas, y por lo tanto en la tabla anterior, es posible que sea debido a que

no se logró que dicha vitamina saliese de la columna cromatográfica, quedándose aún retenida en la misma por su gran tamaño y peso molecular, habiendo sido necesario un mayor tiempo de análisis. Además hay que destacar la baja sensibilidad que presenta esta vitamina, por lo que quizás, pudiera no ser detectada a bajas concentraciones, de hecho, debido a estos dos factores limitantes que posee la B₁₂, en la mayoría de trabajos de investigación revisados, el estudio de dicho analito es inexistente, o si se realiza, suele concluir con la no detección de la misma [18, 19].

Pero no solo los analitos resultaron ser factores problemáticos en dicho estudio, sino que al analizar los patrones internos mediante HPLC-MS y HPLC-MS/MS, en mezclas estándares, se comprobó que, el que mejor respuesta daba era la Taurina, ya que tanto el ácido hipúrico, como el ácido 5-aminosalicílico, no proporcionaban picos definidos y de intensidad medible, de ahí que tampoco se muestren en el cromatograma anterior.

Por estos motivos, también se decidieron suprimir estos dos últimos patrones internos y la Cianocobalamina, de este trabajo.

7.2. Validación del método. Linealidad, Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para evaluar la linealidad de los métodos, en modos full scan y MRM, se prepararon curvas de calibración con 9 niveles de concentración comprendidos en el rango 0,07 – 20 ppm.

Las curvas de calibración ($y = ax + b$) se construyeron mediante el trazado de las relaciones de área de pico (y) de cada estándar con respecto al área del patrón interno, frente a la concentración (x) de estos estándares de calibración.

- **Para modo full scan (MS):** a continuación se muestra la tabla de las áreas obtenidas con respecto al área del patrón interno, además de la representación gráfica de las rectas de calibrado.

[ppm]	Áreas de Pico						
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	Tau [20ppm]
0,07					0,15805		966342
0,1		1,32206	0,34352		0,35846	0,02257	968467
0,5		3,71974	0,21193	0,16095	1,51087	0,10217	961558
1		8,11208	4,60888	0,34050	3,05437	0,25515	843969
5	1,36470	51,15844	18,59841	1,73499	9,72290	0,73957	966342
7	1,91947	68,72038	24,79789	2,50136	13,70967	1,06768	887348
10	2,57210	99,95311	34,27755	3,73591	17,46152	1,47885	819754
15	3,72971	144,04342	48,66194	5,48709	24,87740	2,15334	1027459
20	4,85479	182,83326	66,54360	7,55104	32,62717	2,68881	833669

Tabla 8. Relación de áreas (analito/I.S.) para las rectas de calibrado en modo full scan.

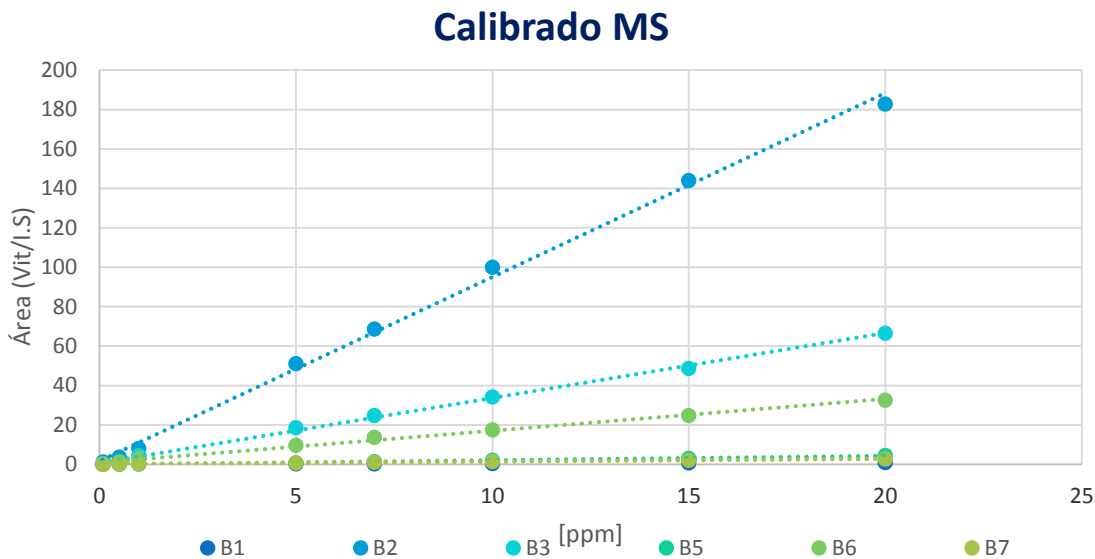


Fig. 21. Calibrado ESI+MS, acuoso.

- **Para modo MRM (MS²):** para la realización de este se decidió trabajar en modo de adquisición MRM, por lo que se seleccionaron las ventanas de tiempo, en las que se realizaron las fragmentaciones de los diferentes compuestos, como se muestran en la siguiente tabla e imagen.

Ventanas de tiempo	Rango de tiempo (minutos)	Analito (elución creciente)
1	0 - 4	Tau (I.S.)
2	4 – 11,5	Nicotinamida Ácido pantoténico
	11,5 – 18	Piridoxina
4	18 – 25	Biotina Tiamina
5	18 – 35	Riboflavina

Tabla 9. Ventanas de tiempo para método MRM (MS/MS)

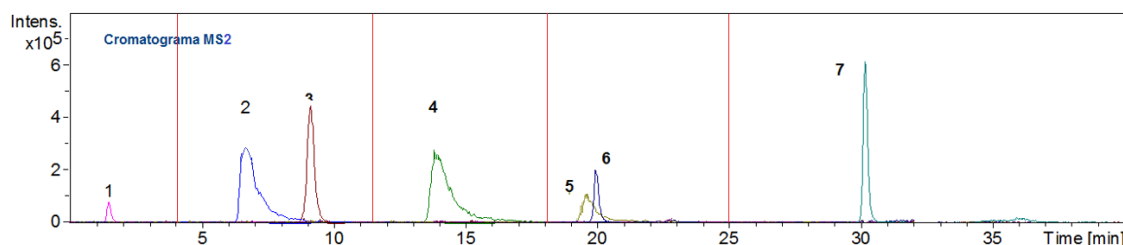


Fig. 22. Cromatograma HPLC/ESI-MS/MS de mezcla standard de vitaminas y patrón interno a diferentes concentraciones. 1-Tau, 2-B₃, 3-B₅, 4-B₆, 5-B₁, 6-B₇ y 7-B₂.

A continuación se muestra la tabla de las áreas obtenidas con respecto al área del patrón interno, además de la representación gráfica de las rectas de calibrado.

[ppm]	Áreas de Pico						
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	Tau [20ppm]
0,05		0,10407	2,24352				211114
0,07		0,98348	2,12452			0,34870	213893
0,5	0,15834	13,12784	6,89257	0,14422	1,40371	0,74354	122003
1	0,27498	31,40653	11,03957	0,15642	2,08770	1,29366	224994
5	1,31384	150,82805	39,42637	0,86998	8,95697	3,55257	152463
10	2,23224	286,03273	61,03034	1,78999	17,48902	5,60450	211148
15	3,22889	423,80752	92,95349	2,58498	26,10964	8,41718	84137
20	4,28403	597,40820	122,91936	3,61219	39,63284	11,92776	211114

Tabla 10. Relación de áreas (analito/I.S.) para las rectas de calibrado en MS².

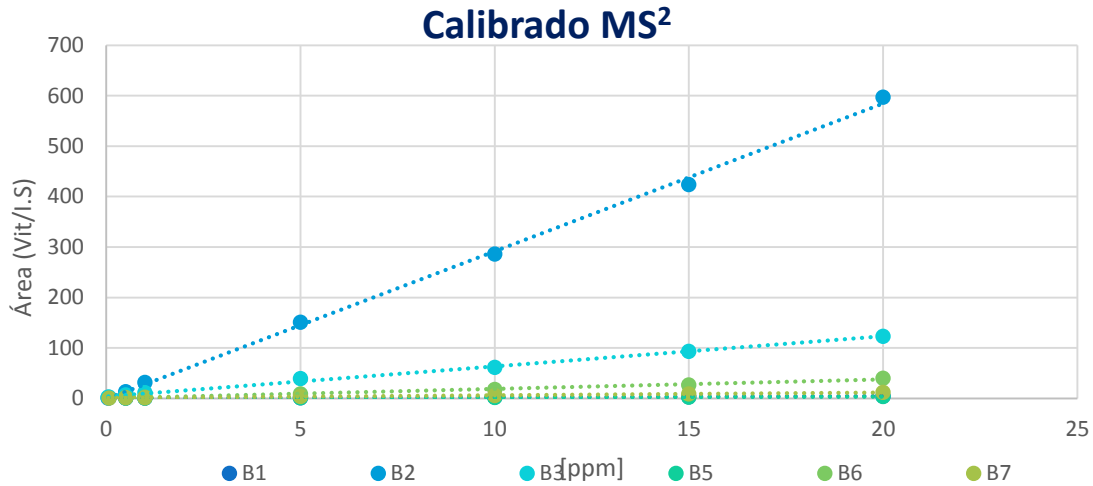


Fig. 23. Calibrado ESI+MS², acuoso.

La linealidad de los gráficos de calibración resultó altamente aceptable, como demuestran sus altos coeficientes de correlación ($r \geq 0.99$).

De acuerdo con los criterios de la FDA EE.UU. [10], la respuesta de analito en el límite de detección (LOD) debe diferenciarse de forma fiable del ruido de fondo. Se midieron soluciones de distintas concentraciones de estándares para determinar el límite de detección en el que la relación $S/N \cong 3$. La respuesta en el límite de cuantificación (LOQ) se calculó mediante la fórmula $LOQ = 3,3 \cdot LOD$. Los resultados se relacionan en las siguientes dos tablas.

DATOS DE CALIBRACIÓN, LOD Y LOQ DE LOS ANALITOS EN MS					
Analito	Coefficiente de Correlación (R)	Ecuación de la Recta	Rango de estudio (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
B₁	0,9997	$y = 0,2305x + 0,2599$	5 - 20	1,520	5,00
B₂	0,9986	$y = 9,3333x + 1,6164$	0,1 - 20	0,030	0,10
B₃	0,9986	$y = 3,2997x + 0,5853$	0,1 - 20	0,030	0,10
B₅	0,9996	$y = 0,3774x - 0,0811$	0,5 - 20	0,152	0,50
B₆	0,9977	$y = 1,6136x + 0,9787$	0,07 - 20	0,021	0,07
B₇	0,9982	$y = 0,1348x + 0,0759$	0,1 - 20	0,030	0,10

Tabla 11. Datos de calibración, límite de detección, límite de cuantificación de los analitos, para el modo full scan.

DATOS DE CALIBRACIÓN, LOD Y LOQ DE LOS ANALITOS MRM					
Analito	Coefficiente Correlación (R)	Ecuación de la Recta	Rango de estudio (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
B ₁	0,9988	$y = 0,2093x + 0,1189$	0,5 - 20	0,152	0,50
B ₂	0,9994	$y = 29,306x - 1,1348$	0,05 - 20	0,015	0,05
B ₃	0,9983	$y = 5,9541x + 3,9102$	0,05 - 20	0,015	0,05
B ₅	0,9993	$y = 0,1775x + 0,0025$	0,5 - 20	0,303	1,00
B ₆	0,9953	$y = 1,8936x - 0,3067$	0,5 - 20	0,152	0,50
B ₇	0,9972	$y = 0,5531x + 0,4806$	0,007 - 20	0,021	0,07

Tabla 12. Datos de calibración, límite de detección, límite de cuantificación de los analitos, para el modo MRM.

A la vista de los límites de detección y cuantificación obtenidos por ambos métodos, observamos que la sensibilidad no tiene un aumento significativo, como teóricamente era de esperar al pasar del modo full scan al MRM [18, 19, 20]. Además vemos que la sensibilidad de la vitamina B₅ disminuye ligeramente. Esto puede ser debido a que al optimizar el voltaje de fragmentación para MS-MS, por infusión directa, se realizó en medio acuoso, pero al hacer el análisis, el analito se eluye con una mezcla hidroalcohólica, en este caso de aproximadamente un 15%, lo que puede cambiar el voltaje de fragmentación óptimo, es decir que puede cambiar la sensibilidad.

Este prácticamente inapreciable aumento de sensibilidad, hizo que se estudiase el origen del problema. En primer lugar se pensó que los estándares estaban mal preparados o que se habían deteriorado, por lo que se volvieron a preparar, pero esto no lo justificaba, ya que los resultados fueron los mismos. A su vez surgieron problemas técnicos tanto en el sistema HPLC como en el MS, pero tras la reparación del mismo, se volvió a obtener la misma sensibilidad. Por esto se decidió volver a buscar en bibliografía hasta dar una justificación a esta situación. Esta podía ser debida al efecto de supresión de señal, que provocaba el formador de pares iónicos (HFBT) [25, 30], que además, también producía una importante contaminación del sistema HPLC-ESI/MS, reteniéndose en cada tubo, bomba, cono, etc. y de igual forma en la propia columna.

7.3. Aplicaciones Analíticas

Se decidieron analizar dos suplementos alimenticios en forma de zumos mediante el modo MRM y otros dos en forma de grageas por el modo full scan.

En primer lugar se analizaron los suplementos en forma de zumos. El tratamiento de estas muestras fue por hidrólisis ácida-enzimática. Este tratamiento se utiliza para determinar la concentración total de vitaminas hidrosolubles del grupo B, pasando todas estas a su forma libre, presentes en los productos analizados. Por otra parte, se realizó una extracción líquido-líquido, cuyo propósito era calcular la concentración de estas vitaminas presentes en los zumos en forma libre. La decisión de usar dos tipos de tratamientos de muestra fue para intentar calcular la concentración de las vitaminas asociadas o fosforiladas, por diferencia entre las vitaminas totales y las vitaminas libres. No se obtuvieron resultados cromatográficos de esta segunda extracción, líquido-líquido. Esto quizás fue porque la concentración de vitaminas libres en las muestras era demasiado baja, y el método no resultaba demasiado sensible, o porque existía un gran efecto matriz, y mediante esta extracción no se eliminaban los suficientes interferentes de las matrices. De forma que solo pudimos conocer las vitaminas totales, suma de la concentración de vitaminas libres, asociadas o fosforiladas, y en forma de distintos vitámeros, presentes en las muestras.

En el tratamiento cromatográfico de los zumos, realizado mediante MRM, y debido a la complejidad de las muestras, se decidió realizar un estudio de efecto matriz.

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito en disolvente debido a la presencia de otros componentes de la muestra. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental.

Una posibilidad para evitar el efecto matriz sería construir siempre la recta de calibrado tomando una muestra parecida a la muestra problema pero libre del analito a determinar (un blanco de muestra), y añadirle cantidades conocidas del analito para formar soluciones patrón. Sin embargo, en nuestro caso resultó imposible, por lo que la mejor alternativa para soslayar el efecto matriz, fue utilizar la técnica de las adiciones estándar ^[4, 8], que consiste en la adición de cantidades conocidas y

crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de adiciones estándar. La posterior cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero. El mayor inconveniente de esta técnica es que necesitamos construir una recta de adiciones estándar para cada muestra que queramos analizar, lo cual supone un incremento sustancial en el volumen de trabajo del laboratorio.

El efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, dependiente de la concentración de analito en la muestra, tal como se detalla a continuación. En la figura 27 se representan dos rectas de calibrado para la determinación, mediante HPLC-EIS-MS/MS, de tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantoténico, piridoxina y biotina, además de taurina como patrón interno, en zumo de granada y en zumo de açai. Estas se construyeron añadiendo a las muestras las soluciones patrón de dichas vitaminas y el patrón interno, incluyendo un punto cero, al cual no se le añadieron los analitos patrón, pero si el patrón interno.

Se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los suplementos alimenticios en forma de zumos.

- **Zumo de açai:** A continuación se muestran las áreas obtenidas de las vitaminas analizadas a cada nivel de concentración, la relación de dichos analitos con la respuesta dada por el patrón interno y la representación gráfica de este calibrado, área (analito/I.S.) frente a concentración (ppm).

Calibrado en matriz, zumo de açai							
ppm	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	Tau
0		1,99853			0,22896		49763
0,5		71,33438	9,80791		5,22648		71427
1	1,14654	128,26258	13,69358	0,36740	8,70678	1,14654	71580
5	6,35391	414,19254	72,31051	1,23425	39,18391	6,35391	73588
10	12,11330	757,62198	116,4064	2,45514	51,96669	12,11330	81002
15	19,44888	1190,34650	210,37408	5,34876	91,57939	19,44888	56533

Tabla 13. Zumo de açai, relación de áreas (analito/I.S.) de las rectas de calibrado en MS²

Calibrado en matriz, zumo de açáí

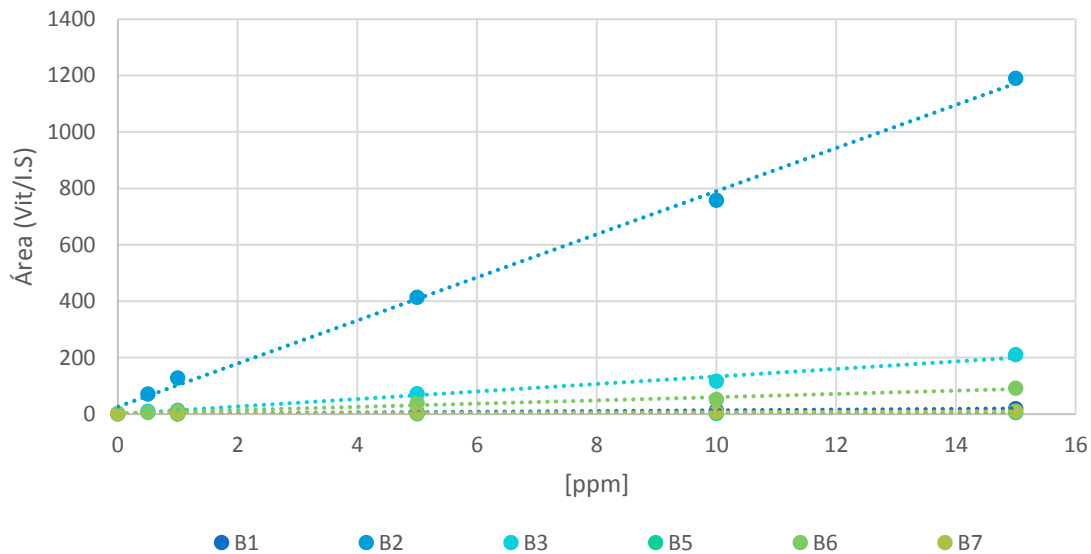


Fig. 24. Calibrado ESI+MS², zumo de açáí.

El efecto matriz se calculó mediante la relación de pendientes matriz-acuosa:

$$\frac{\text{Pendiente matriz}}{\text{Pendiente acuosa}} = \text{Efecto matriz}$$

Como criterio se consideró que existía efecto matriz cuando este ratio saliese del rango 1,1 - 0,9. (Tabla 12).

Estudio del efecto matriz en zumo de açáí					
Vit.	Ecuación	R	Pendiente acuosa	Pendiente en matriz	Efecto matriz
B ₂	y = 76,431x + 26,031	0,9987	9,3333	76,431	8,18
B ₆	y = 5,7399x + 2,6806	0,9887	1,6136	5,7399	3,55

Tabla 14. Estudio del efecto matriz de Açáí.

A la vista de los resultados podemos observar que, para el zumo de açáí, solo se podía estudiar dicho efecto para B₂ y B₆, ya que fueron los únicos analitos que dieron señal en el extracto, punto cero de la recta de calibrado en matriz. Estos presentaron un efecto matriz positivo.

Del mismo modo, se realizó el estudio para el zumo de granada.

- **Zumo de granada:** A continuación se muestran las áreas obtenidas de las vitaminas analizadas en cada nivel de concentración, la relación de dichos analitos con la respuesta dada por el patrón interno y la representación gráfica de este calibrado, área (analito/I.S.) frente a concentración (ppm).

Áreas de picos. Zumo Granada							
ppm	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	Tau
0		1,20734	0,46150				66961
0,5		32,49509	10,69698		4,38810	4,09828	78357
1	1,05556	55,64306	17,11573	0,80184	6,30992	5,30249	90764
5	4,20983	295,1393	50,19276	2,34908	24,01801	2,61579	93813
10	8,09927	603,2655	110,65262	3,53149	49,05095	4,55773	88076
15	11,54563	902,6148	161,23534	4,40916	53,72083	3,81633	95191

Tabla 15. Zumo de granada. Relación de áreas (analito/I.S.) de las rectas de calibrado en MS².

Calibrado en matriz, zumo de granada

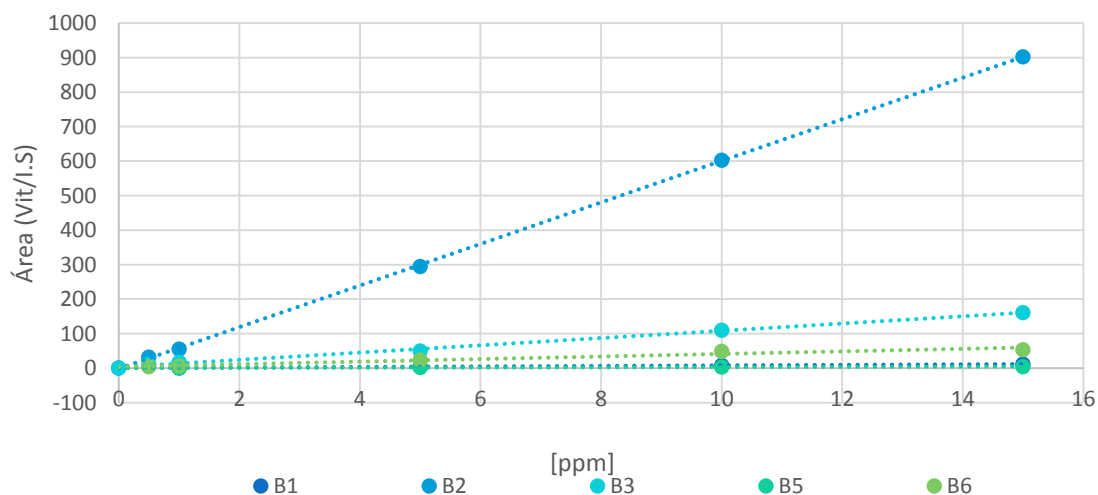


Fig. 25. Calibrado ESI+MS², zumo de granada.

Al realizar calibrado para la biotina se observó que no era lineal.

Del mismo modo que para el suplemento alimenticio de açai, estudiamos el efecto matriz, cuyos resultados se reflejan a continuación.

Estudio del Efecto Matriz en zumo de granada					
Vit.	Ecuación	R	Pendiente Acuosa	Pendiente en Matriz	Efecto Matriz
B₂	$y = 60,229x - 1,1409$	0,9999	29,306	60,229	2,05
B₃	$y = 10,540x + 3,0575$	0,9985	5,9541	10,54	1,77

Tabla 16. Estudio de efecto matriz en zumo de granada.

Como se puede comprobar, para este suplemento, tanto riboflavina como nicotinamida presentan efecto matriz positivo.

La determinación de la concentración real de cada vitamina, en ambos zumos, se calculó haciendo uso de las ecuaciones de las rectas de calibrado, tomando como cero el valor de y , se calculaba la concentración experimental de los analitos en muestra.

Cálculo de la concentración experimental en zumo de açai y de granada					
Vit.	açai		Vit.	granada	
	Ecuación	[mg/L]		Ecuación	[mg/L]
B₂	$y = 76,431x + 26,031$	1008	B₂	$y = 60,229x - 1,1409$	1227,398
B₆	$y = 5,7399x + 2,6806$	61,186	B₃	$y = 10,540x + 3,0575$	271,950

Tabla 17. Cálculo de la concentración experimental en zumo de açai y granada.

Las concentraciones experimentales dadas en la tabla anterior fueron las resultantes tras la aplicación de las diluciones practicadas durante el tratamiento de muestras. Partimos de 0,5mL de muestra, que durante el tratamiento se diluye hasta los 3mL. Una vez obtenidos los extractos, estos 3mL se llevaron a un matraz de 10mL y se enrasó con agua Milli-Q. La dilución final practicada fue de 1/20.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para ambos suplementos.

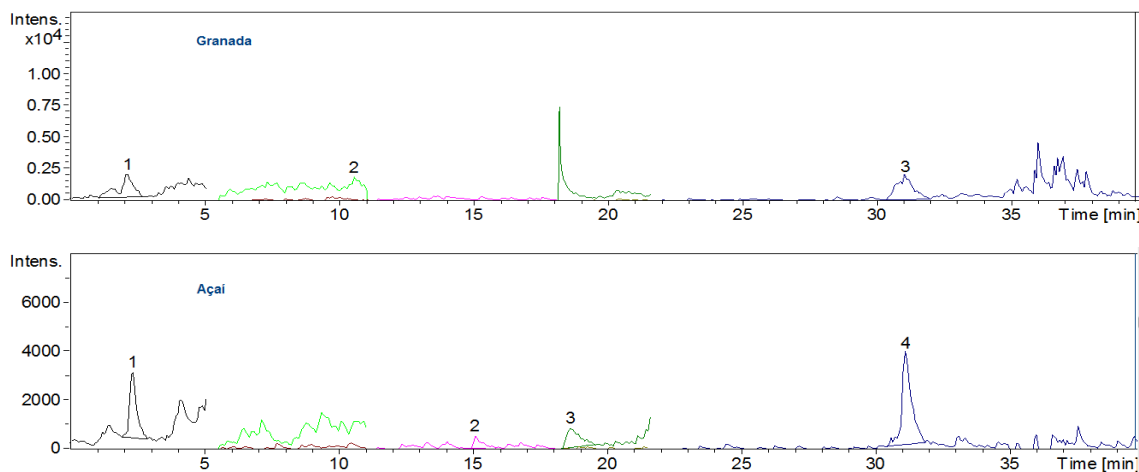


Fig. 28. Cromatogramas de los puntos cero de granada y açai.

Para el caso de las grageas, tras la extracción sólido-líquido, se decidió realizar el análisis cromatográfico por el modo full scan, ya que el fabricante proporcionaba el contenido de cada vitamina por dosis, siendo este elevado. Por consiguiente, se empleó un método, que aunque menos sensible, resulta válido para altas concentraciones. En un principio se decidió no realizar estudio del efecto matriz para estas muestras.

En la siguiente tabla se muestra la concentración de cada vitamina de cada uno de los complejos.

Concentración de vitaminas según fabricante		
Vitaminas	Greens (mg/g)	Micebrina (mg/g)
B ₁	6,75	1,14
B ₂	6,75	1,30
B ₃	6,75	14,63
B ₅	8,10	4,88
B ₆	6,75	1,62
B ₇	0,01	0,12

Tabla 18. Concentración de vitaminas (mg/g) de Greens y Micebrina, dadas por fábrica.

Tras el análisis cromatográfico de las muestras, y mediante su relación de área (analito/I.S), y utilizando las rectas de calibrado acuosas realizadas mediante Full Scan obtenemos la concentración de las muestras.

Muestra	Áreas de Pico						
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	Tau [20ppm]
Greens	0,2687	1,9758	0,7123	*	1,0408	0,07591	820983
Micebrina	0,2678	1,9848	2,0508	*	1,0583	0,0763	819754

Tabla 19. Relación de áreas (analito/I.S.) de las muestras, en MS, de Greens y Micebrina *Pico no detectado.

Determinación experimental de contenido de muestras				
Analito	R	Ecuación de la Recta	Greens (mg/g)	Micebrina (mg/g)
B₁	0,9997	$y = 0,2305x + 0,2599$	6,73	1,13
B₂	0,9986	$y = 9,3333x + 1,6164$	6,75	1,30
B₃	0,9986	$y = 3,2997x + 0,5853$	6,75	14,63
B₅	0,9996	$y = 0,3774x - 0,0811$	*	*
B₆	0,9977	$y = 1,6136x + 0,9787$	6,75	1,62
B₇	0,9982	$y = 0,1348x + 0,0759$	0,01	0,10

Tabla 20. Determinación experimental de contenido de muestras Greens y Micebrina.

Una vez obtenemos la concentración, teniendo en cuenta la dilución llevada a cabo, de cada vitamina, la comparamos con la concentración dada por el fabricante.

Grado de concordancia (%) de la concentración experimental con la concentración dada por el fabricante						
Vit.	Greens			Micebrina		
	mg/g dados por fabricante	mg/g experimentales	Porcentaje de concordancia	mg/g dados por fabricante	mg/g experimentales	Porcentaje de concordancia
B₁	6,75	6,73	99,70%	1,14	1,13	99,12%
B₂	6,75	6,75	100%	1,30	1,30	100%
B₃	6,75	6,75	100%	14,63	14,63	100%
B₅	8,10	*	*	4,88	*	*
B₆	6,75	6,75	100%	1,62	1,62	100%
B₇	0,01	0,01	100%	0,12	0,10	83,33%

Tabla 21. Grado de concordancia (%) de la concentración experimental–fabricante. Para Greens y Micebrina se tomaron 0,114 y 0,607g de muestra respectivamente.

A excepción del ácido pantoténico, cuya señal no fue detectada en los cromatogramas de ambas muestras, los resultados experimentales resultaron muy similares a los proporcionados por el fabricante.

Abajo se muestran los cromatogramas de las muestras de Micebrina y Greens.

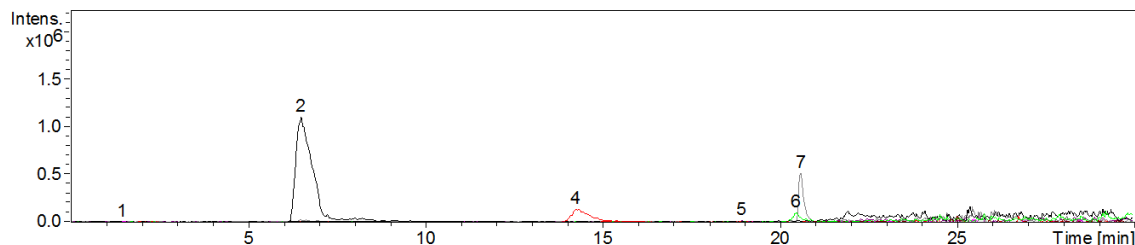


Fig. 29. Cromatograma de muestra de Micebrina. 1-Tau, 2-B₃, 4-B₆, 5-B₁, 6-B₇, 7-B₂.

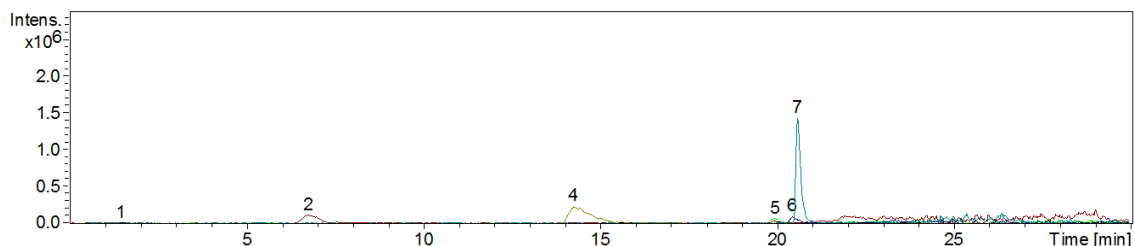


Fig. 30. Cromatograma de muestra de Greens. 1-Tau, 2-B₃, 4-B₆, 5-B₁, 6-B₇, 7-B₂.

8. CONCLUSIONES

Un método HPLC/ESI-MS fue desarrollado y validado para el análisis simultáneo de 6 vitaminas B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ y B₇ en suplementos alimenticios. Se trata de un método sencillo que puede ser usado para el control de calidad de suplementos alimenticios.

En el caso concreto de este trabajo fin de grado, tanto precisión como sensibilidad se vieron mermadas, debido a la supresión de señal que ejerce el ácido Heptafluorobutírico, actuando como formador de pares iónicos.

La fase móvil y la elución lineal permitieron separar tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantoténico, piridoxina y biotina. También se probó, además, a

separar el ácido ascórbico y el ácido fólico, que presentaban baja sensibilidad a ionización positiva, y la cianocobalamina, que presentan baja sensibilidad a cualquier ionización o no se logró su elución de la columna cromatográfica, por lo que fueron descartadas.

Los límites de detección y cuantificación, resultaron ser más bajos de los esperados (encontrados en los trabajos que tomamos como base para este proyecto) lo que también resultó ser provocado por el efecto de supresión de señal que provocaba el ácido heptafluorobutírico.

La resolución se obtuvo en un tiempo de análisis de 35min.

El método de tratamiento de muestra se basa en una combinación entre una digestión ácida y una extracción enzimática, para liberar vitaminas unidas a proteínas y compuestos fosforilados, seguido por un análisis de HPLC. También se demuestra la validez del método HPLC usando detección por espectrometría de masas para la determinación simultánea de las 6 vitaminas analizadas en grageas mediante el modo full scan, y para B₂ y B₆ en zumo de açai y B₂ y B₃ en zumo de granada en modo MRM.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AECOSAN, Ministerio de Salud, Servicios Sociales e Igualdad de España.
- [2] Lehninger principles of biochemistry (6^o ED). *Michael M. Cox y David L. Nelson. OMEGA 2014.*
- [3] Principios de Análisis Instrumental. *Skoog, sexta ed., 2008.*
- [4] Análisis Instrumental. *Kenneth A. Rubinson, Judith F. Rubinson, Pearson Education, 2000.*
- [5] Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Hoffmann et al., 2002.*
- [6] Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Niessen, 2006.*
- [7] Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry. *Dass, 2007.*
- [8] Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2012) 19th Ed. *AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, AOAC SMPR 2011.003.*
- [9] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. *US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2010.*
- [10] Diccionario de química física. *Costa, J.M., Díaz de Santos ediciones, 2005.*
- [11] Nuevas metodologías analíticas basadas en espectrometrías de masas para el análisis multi-residuo de plaguicidas y otros contaminantes en vegetales con alto contenido graso y en productos alimenticios de origen vegetal. Tesis doctoral. *Bienvenida Gilbert Lopez. Universidad de Jaén, 2010.*
- [12] Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. Tesis doctoral. *Susana Grimalt Brea. Universitat Jaume I de Castellón, 2009.*
- [13] Desarrollo de métodos de análisis para la cuantificación de disruptores endocrinos químicos en muestras biológicas. Tesis doctoral. *Rocío Rodríguez Gómez. Universidad de Granada, 2014.*
- [14] Desarrollo de metodología analítica para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en aguas y vegetales mediante LC-MS/MS con analizador de tripe cuadrupolo. Tesis doctoral *José Manuel Marín Ramos. Universitat Jaume I de Castellón, 2010.*
- [15] Hifenaciones instrumentales entre la cromatografía líquida, diferentes sistemas detectores y nuevos métodos de pretratamiento de muestra para la

- determinación de vitaminas en alimentos. Tesis doctoral. *María de los Ángeles Bravo. Universidad de Murcia, 2013.*
- [16] A “three-in-one” sample preparation method for simultaneous determination of B-group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast® kits. *Zhang H. Lan F, Shi Y, Wan ZG. Food Chemistry, Vol. 153, 15 June 2014, pag. 371-377*
- [17] Development and validation of an LC–MS/MS based method for quantification of 25 hydroxyvitamin D2 and 25 hydroxyvitamin D3 in human serum and plasma. *Stanley (Weihua) Zhanga, Wenying Jianb, Sheryl Sullivana, Sharkeya. Journal of Chromatography B Volume 961, 15 June 2014, 62–70.*
- [18] Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B(1) (thiamine), B(6) (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B(12) in animal and plant foods. *A. Lebidzinska et al. / J. Chromatogr. A 1173 (2007) 71-80*
- [19] High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Zhi Chen, Bo Chen, Shouzhou Yao / Analytica Chimica Acta 569 (2006) 169-175.*
- [20] Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. *J.M. Hernández Perez, Ed. Cont Lab Clin 2005; 8; 49-62*
- [21] Simultaneous and accurate determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin tablets by using an RP-HPLC method. *Semahat Kucukkolbasi, Onur Bilber. H. Filiz Ayyildiz, Huseyin Kara. Quim. Nova, Vol. 36, No. 7, 1044-1051, 2013*
- [22] Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *D. Ivanovic, A. Popovic, D. Radulovic, M. Medenica. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 18 (1999) 999–1004*
- [23] LC Simultaneous Determination of the Free For MS of B Group Vitamins and Vitamin C in Various Fortified Food Products. *Rita Engel, Eva Stefanovits-Banyai, Laszlo Abranko. Chromatographia 2010, 71, 1069–1074*

- [24] Simultaneous determination of water soluble vitamins in fortified food products. *R. Engel*, I. Abrankó, é. Stefanovits-bányai and p. Fodor. Acta Alimentaria, Vol. 39 (1), pp. 48–58 (2010)*
- [25] Development of a LC-MS/MS method for the simultaneous screening of seven water-soluble vitamins in processing semi-coarse wheat flour products. *Nurit E, Lyan B, Piquet A, Branlard G, Pujos-Guillot E. Anal Bioanal Chem (2015) 407:3471–3479*
- [26] Unexpected peaks in tandem mass spectra due to reaction of product ions with residual water in mass spectrometer collision cells. *Neta P, Farahani M, Simón-Manso Y, Liang Y, Yang X, Stein SE. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28, 2645–2660.*
- [27] Determination of cobalamins using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. *S.A. Baker, N.J. Miller-Ihli, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 1823.*
- [28] Molecular orbital analysis of anomalous trans effect in cobalamins. *T. Andruniow, J. Kuta, M.Z. Zgierski, P.M. Kozłowski, Chem. Phys. Lett. 410 (2005) 410.*
- [29] A new approach for automated liquid–liquid extraction in a sequential injection manifold. *Delgado-Blanca I. Orgeta-Barrales P. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 5 November 2014, 8p.*
- [30] www.nutri-facts.org
- [31] www.chromatographyonline.com
- [32] www.lamondlab.com
- [33] www.penyfan.ugent.be
- [34] www.wikipedia.es
- [35] www.chemspider.com

