



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

REVISION DE APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN EL ANALISIS
DE ALIMENTOS.

Trabajo Monográfico

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

VICENTE SIQUEIROS BELTRONES

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | | |
|----|--|----|
| 1. | INTRODUCCION | 1 |
| 2. | GENERALIDADES | 4 |
| | 2.1 Parámetros Cromatográficos | 4 |
| | 2.2 Equipo Empleado en HPLC | 6 |
| | 2.3 Aspectos Prácticos de la HPLC | 10 |
| 3. | MÉTODOS Y TÉCNICAS POR GRUPOS DE COMPUESTOS | |
| | 3.1 Carbohidratos | 13 |
| | 3.2 Lípidos | 17 |
| | 3.3 Compuestos Nitrogenados | 22 |
| | 3.4 Vitaminas | 27 |
| | 3.4.1 Hidrosolubles | 28 |
| | 3.4.2 Liposolubles | 34 |
| | 3.5 Aditivos | 41 |
| | 3.5.1 Antioxidantes | 41 |
| | 3.5.2 Conservadores | 42 |
| | 3.5.3 Edulcorantes | 44 |
| | 3.5.4 Tensoactivos | 45 |
| | 3.6 Ácidos Orgánicos | 46 |
| | 3.7 Colorantes | 48 |
| | 3.7.1 Naturales | 49 |
| | 3.7.2 Sintéticos | 53 |
| | 3.8 Compuestos de Sabor y Aroma | 58 |
| | 3.9 Contaminantes y Productos de Descomposición. | 63 |
| | 3.9.1 Carcinógenos | 63 |

| | |
|---|----|
| 3.9.2 Drogas Residuales | 70 |
| 3.9.3 Pesticidas, Fungicidas y Herbicidas | 75 |
| 3.9.4 Productos de Descomposición Natural o por Procesamiento. | 77 |
| 3.9.5 Residuos Hormonales | 81 |
| 3.10 Tóxicos Naturales | 83 |
| 3.10.1 Micotoxinas | 83 |
| 3.10.2 Misceláneos | 94 |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 98 |
| 5. BIBLIOGRAFIA POR TEMAS | 99 |

1) INTRODUCCION.

La cromatografía líquida de alta resolución, también llamada cromatografía líquida de alta presión o de alta rapidez, a pesar de ser una técnica reciente, descrita por primera vez entre 1967-1969, ha tenido una contribución significativa en los alimentos y otras áreas de investigación.

Las primeras separaciones llevadas a cabo por cromatografía se acreditan al botánico ruso Tswett, que en 1903 separó pigmentos de plantas por cromatografía de adsorción; pero no fue hasta la década de los treinta cuando Kuhn y Lederer, Reichstein y Van Euw ⁽¹⁾, utilizaron la misma técnica para separar productos naturales. En 1941, Martin y Synge ⁽¹⁾, descubrieron la cromatografía de partición líquido-líquido, y dieron los fundamentos para la cromatografía gas-líquido y los de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); también introdujeron el concepto de "altura equivalente a un plato" que ha sido utilizado hasta nuestros tiempos como medida de eficiencia de la cromatografía. Para finales de los años sesentas, Kirhland, Hubert, Horvath, Preiss y Lipsky ⁽¹⁾, describieron las primeras técnicas de aplicación del HPLC.

La HPLC ha tenido una gran aceptación, tanto en la investigación como en los análisis de rutina, esto debido a su rapidez, versatilidad y confiabilidad.

Se han encontrado una serie de ventajas del HPLC sobre otras técnicas analíticas, entre las que se incluyen:

a) El análisis de los componentes de la muestra no se encuentra limitado por la estabilidad o volatilidad; de hecho, la HPLC es el método a escoger para una variedad de compuestos térmicamente lábiles o de alto peso molecular.

b) Muestras acuosas o no-acuosas pueden ser analizadas sin o con pocos tratamientos previos.

c) Existe gran disponibilidad de solventes y materiales de empaque para columna, lo cual da un alto grado de selectividad para análisis específicos.

d) Los tiempos de separación son cortos, generalmente en pocos minutos.

e) Los compuestos separados son fácilmente recuperados y aislados de la fase móvil para futuros análisis de caracterización.

En el análisis de alimentos se prevé una sustitución paulatina de las técnicas existentes por las de HPLC. Esto se infiere de las ventajas mencionadas anteriormente, por la gran cantidad de técnicas publicadas que mejoran a las comúnmente utilizadas, y de la aceptación de varios métodos como oficiales por organismos como el AOAC, AACC y otros similares.

A pesar de que un número grande de artículos han sido publicados sobre la aplicación de la HPLC en el análisis de alimentos, no existe una revista especializada en este tema, por lo que la información se encuentra dispersa en una gran cantidad y variedad de publicaciones. Otro punto importante en la realización del trabajo recopilativo, es el hecho de que va-

a) El análisis de los componentes de la muestra no se encuentra limitado por la estabilidad o volatilidad; de hecho, la HPLC es el método a escoger para una variedad de compuestos térmicamente lábiles o de alto peso molecular.

b) Muestras acuosas o no-acuosas pueden ser analizadas sin o con pocos tratamientos previos.

c) Existe gran disponibilidad de solventes y materiales de empaque para columna, lo cual da un alto grado de selectividad para análisis específicos.

d) Los tiempos de separación son cortos, generalmente en pocos minutos.

e) Los compuestos separados son fácilmente recuperados y aislados de la fase móvil para futuros análisis de caracterización.

En el análisis de alimentos se prevé una sustitución paulatina de las técnicas existentes por las de HPLC. Esto se infiere de las ventajas mencionadas anteriormente, por la gran cantidad de técnicas publicadas que mejoran a las comúnmente utilizadas, y de la aceptación de varios métodos como oficiales por organismos como el AOAC, AACC y otros similares.

A pesar de que un número grande de artículos han sido publicados sobre la aplicación de la HPLC en el análisis de alimentos, no existe una revista especializada en este tema, por lo que la información se encuentra dispersa en una gran cantidad y variedad de publicaciones. Otro punto importante en la realización del trabajo recopilativo, es el hecho de que va--

-rias instituciones educativas y de investigación han adquirido cromatógrafos para HPLC; por lo que esta recopilación puede ser de gran ayuda, principalmente en la reducción del tiempo dedicado a la localización de información sobre técnicas, condiciones de operación y bibliografía.

En consecuencia, el objetivo de este estudio es contar con un catálogo de técnicas y referencias que faciliten la aplicación de la HPLC a los alimentos.

Para tal propósito se efectuó una revisión bibliográfica de la literatura científica a lo largo de los últimos diez años. La información obtenida fue clasificada por grupos de compuestos y para cada uno se seleccionó aquella que se consideró como la más avanzada.

2) GENERALIDADES

2.1 Parámetros Cromatográficos.

En la HPLC, al igual que las demás técnicas cromatográficas, es necesario conocer ciertos parámetros, así como la forma de calcularlos, para poder determinar la eficiencia de la separación, en este caso la eficiencia de la columna, y así escoger la más apropiada para el análisis.

Relación de capacidad de la columna.

La relación de capacidad de la columna, k' , o simplemente el valor de k' del soluto, es el método comúnmente empleado para indicar la retención del soluto y se calcula según la ecuación.

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

donde t_r es el tiempo de retención de un pico dado, y t_o es el tiempo de retención de un pico (o solvente) no retenido. El valor de k' mide la proporción del tiempo que tarda el soluto en la fase estacionaria contra el tiempo que tarda en la fase móvil.

Número de platos teóricos.

La eficiencia de una columna cromatográfica se mide por el número de platos teóricos, N , del cual la columna es equivalente, y se calcula según la ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

donde t_r es el tiempo de retención de un pico, y w es el ancho

de la base del pico medido. El número de platos de una columna es una medida de la cantidad de dispersión de un soluto mientras se desplaza por una columna.

Altura equivalente de un plato teórico (H.E.T.P.)

La H.E.T.P. o simplemente la altura del plato, H, de una columna, está dada por la ecuación:

$$H = L/N$$

donde L es el largo de la columna. Se deduce que para valores pequeños de H, las columnas son más eficientes.

Curva de la altura del plato (C.A.P.)

La altura del plato de una columna varía con la velocidad lineal del eluyente, u, según la ecuación:

$$u = L/t_0$$

La gráfica de H contra u se conoce como C.A.P., y da los medios para comparar la eficiencia de diferentes columnas y de los materiales de empaque; pero debido a que H depende del tamaño de la partícula, d_p , existen problemas cuando se tienen columnas empacadas con el mismo material pero con fracciones de varios tamaños, ya que inducen diferentes C.A.P.. Para evitarlo, es preferible utilizar parámetros adimensionales h y \sqrt{V} , que son los valores reducidos de H y u respectivamente, donde:

$$h = H/d_p$$

$$\sqrt{V} = u \cdot d_p / D_m$$

En es el coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil se estima de la ecuación de Wilke-Chang (1)

$$D_m = \frac{7.4 \times 10^{-12} T \sqrt{\Psi M}}{\eta V^{0.6}}$$

donde T es la temperatura ($^{\circ}\text{K}$), Ψ el factor de asociación del eluyente, (1 para solventes no polares, 1.5 para etanol, 1.9 para metanol y 2.6 para agua), M es el peso molecular el eluyente, η es la viscosidad del eluyente (mPa's) y V es el volumen molar del soluto (ml) = peso molecular/densidad.

Resolución.

La resolución, R_s , de dos picos cromatográficos, es la medida de su separación y se calcula según su ecuación:

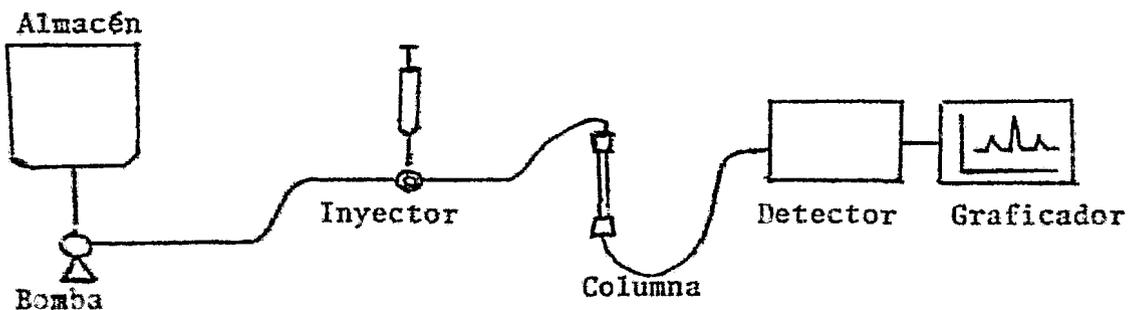
$$R_s = 2 \frac{t_2 - t_1}{W_1 + W_2}$$

Donde t_1 y t_2 son las distancias de retención y W_1 y W_2 son la anchura de las bases de los picos.

2.2 Equipo empleado en HPLC

Componentes.

El cromatógrafo para HPLC consiste básicamente de un almacén de solvente, una bomba, un sistema de inyección, una columna, y un detector unido a un graficador de carta, tal como se muestra en el esquema:



El depósito del solvente puede ser cualquier recipiente, - pero se debe tomar medidas para desgasar el solvente, ya sea - por aplicación de vacío, calor o por ultrasonificación. Si no se elimina el gas, particularmente en solventes próticos, se - puede provocar la formación de burbujas de aire en la celda de detección, con la consecuente ruptura de la continuidad del -- cromatograma.

Bombas.

Existen varios tipos de bombas, sistema directo de presión con gas, intensificador neumático, reciprocantes y de jeringa (tornillo), las cuales se pueden clasificar en dos tipos: las de presión constante y las de desplazamiento constante. Por lo general la primera es de funcionamiento con aire y amplificada neumáticamente, y la segunda recíprocante y de funcionamiento eléctrico. Frecuentemente las bombas de presión constante tienen una columna grande de retención, la que hace dificultosos los cambios rápidos de solventes; también son menos apropiadas para la programación de gradiente. Las bombas de desplazamiento constante de una sola cabeza producen una señal pulsada, - por lo que se requiere un suprimidor de pulsos. Alternativamente, una bomba de dos cabezas puede ser utilizada con los pistones a 180° fuera de fase para dar un rendimiento esencialmente libre de pulsos.

El flujo producido por este tipo de bombas es dominado por la velocidad del motor eléctrico, el que es fácilmente controlado electrónicamente para proveer un gradiente.

La mayoría de las bombas, de ambos tipos, dan flujo máximo de 10 ml/min. que es el adecuado para la gran mayoría de aplicaciones donde se emplean columnas analíticas. Por lo general, las bombas de desplazamiento constante dan una mayor reproducibilidad, y aparte de su mayor costo, deben ser preferibles.

Sistemas de inyección.

La inyección de la muestra puede ser llevada a cabo por dos diferentes métodos, en columna o vía una válvula, el primero - puede ser con o sin septum, el cual permite descargar la muestra directamente de la jeringa a la parte superior de la columna. De esta forma la columna puede operar en el modo de diámetro infinito, lo que nos lleva a una mayor resolución que obtenida si se emplea un inyector de válvula. Las desventajas que puede tener son goteo y bloqueo de la aguja.

Las válvulas de inyección, en las cuales la muestra es introducida a una presilla de retención antes de ser aplicadas a la columna, presentan una operación más conveniente y puede ser fácilmente automatizada, comúnmente por activación neumática su inconveniente es que la muestra se diluye antes de la columna y no se puede aprovechar el efecto del diámetro infinito. Las válvulas de inyección desperdician muestra, ya que se requiere un exceso de solución para asegurar que la presilla - está completamente llena.

Columnas.

La mayoría de las columnas para HPLC están construidas de acero inoxidable. El largo de la columna varía entre 100-500

mm, comúnmente 250 mm, con diámetros internos de 2 a 5 mm.

Es importante que el interior de la columna sea liso y libre de suciedad y aceite.

Detectores.

Una gran cantidad de detectores se encuentran disponibles para su uso en sistemas de HPLC, pero de éstos sólo el detector de ultravioleta (UV), el de fluorescencia y el refractómetro diferencial son de uso común.

Los detectores de UV pueden operar a longitud de onda fija, generalmente a 254 nm con una lámpara de mercurio, o sobre todo el rango del ultravioleta utilizando una lámpara de deuterio. El detector de longitud de onda fija tiene una mayor sensibilidad, debido a la mayor intensidad de la radiación incidente, pero su aplicación es limitada. El detector de longitud de onda variable puede ser ajustado a una longitud de onda de máxima absorción de los compuestos de interés, además, algunos tienen una fuente de tungsteno (wolframio) el cual amplía la detección a la región visible. Los detectores de fluorescencia son de uso limitado, pero para aquellos compuestos que son fluorescentes, el límite de detección es considerablemente menor que el de UV. La sensibilidad se incrementa significativamente con el uso de una celda de flujo empacada con un soporte sólido. El refractómetro ha sido llamado el detector universal, ya que da respuesta a todos los compuestos que provocan diferencia entre el índice de refracción del eluyente de la columna y el del solvente. Sin embargo, su sensibilidad es considerable

-mente menor que el de UV y el de fluorescencia, y solo es empleado cuando éstos dos no son apropiados, como es el caso de los azúcares.

Otros detectores han sido utilizados en HPLC, incluyendo aparatos electroquímicos y sistemas de transporte unidos a detectores de ionización de flama y más recientemente espectrómetros de masa.

2.3. Aspectos prácticos de la HPLC.

Fase móvil.

Al contar con un número limitado de soportes, la selectividad de la HPLC se consigue con la variación de la temperatura de columna o con la composición de la fase móvil.

Las columnas de HPLC pueden ser operadas isocráticamente, o sea la composición del eluyente se mantiene constante o puede ser en forma de elución de gradiente en el que la composición de la fase móvil varía durante la operación. Este sistema también puede emplearse en programación de flujo, en el cual la velocidad de flujo del solvente, en vez de su composición, se cambia durante el análisis. Esto es particularmente útil cuando se emplea detección por índice de refracción, ya que la elución de gradiente no es aplicable.

Materiales de empaque.

El gran número de compuestos químicos que son analizados como componentes de los alimentos, significa que son necesarios una gran cantidad de diferentes materiales de empaque para columna. La fase estacionaria comúnmente utilizada es sílica, la

cual puede ser empleada sin modificar y donde el proceso cromatográfico es de adsorción, ó una sílica modificada por la unión de grupos funcionales con los grupos silanol, para dar un sistema de partición. La sílica puede ser utilizada con una gran variedad de solventes, abarcando un intervalo amplio de polaridades, aunque para compuestos muy polares, tales como aminoácidos y azúcares, es más conveniente separarlas en fases de sílica modificada. Cuando el grupo ligado a la sílica es de naturaleza hidrofóbica, por ejemplo el grupo C₁₈, la fase estacionaria trabaja en forma de fase inversa, donde los compuestos menos polares (más hidrofóbicos) son fuertemente retenidos.

El grupo funcional ligado puede poseer propiedades de intercambio iónico, por ejemplo, un grupo ácido sulfónico. Estas fases estacionarias se utilizan para componentes iónicos de los alimentos, tales como aminoácidos y nucleótidos. Alternativamente, los compuestos iónicos pueden ser cromatografiados como pares iónicos empleando un contador de iones apropiado y una columna de fase inversa.

Cuando se trata de seleccionar el material de empaque para intentar realizar una separación, es extremadamente útil conocer las fórmulas de los solutos. Si moléculas parecidas o de la misma clase han sido ya separadas este sistema puede ser tomado como un razonable punto de partida. Las piezas más importantes cuando se realiza una separación no conocida son:

- La fórmula molecular ó la presencia de grupos funcionales conocidos especialmente grupos básicos ó ácidos.

- La solubilidad de las moléculas en solventes orgánicos y en agua, ácidos o bases.
- El espectro UV (asumiendo que un detector de UV es empleado) para asegurar que la detección se realiza donde la molécula tiene una absorbancia razonable.
- La presencia de impurezas; es esencial identificar el soluto de interés y no un material extraño o impureza.
- Contar con información de cromatografía de capa fina (TLC).

3. METODOS Y TECNICAS POR GRUPOS DE COMPUESTOS.

3.1 Carbohidratos.

Los carbohidratos se encuentran entre los compuestos más abundantes en la naturaleza; por lo que el análisis de azúcares es de considerable y creciente importancia en la industria alimentaria, tanto en el desarrollo de nuevas tecnologías para procesamiento y manufactura de alimentos, como en el control de proceso y calidad de productos ya existentes. Alimentos tan variados como jugos de frutas y jaleas, helados, refrescos, cervezas, vinos, productos de panadería, cereales, miel, productos lácteos, hidrolizados de almidón, jarabes de maíz con alto contenido de fructuosa, melazas, extractos de soya, etc., requieren de uno o más métodos analíticos para su control de calidad en su contenido de sacáridos.

Además de los usos industriales, los análisis son importantes en el campo de la investigación biológica y médica.

En los últimos años gran cantidad de trabajos han sido publicados sobre la aplicación de la HPLC al análisis de carbohidratos, debido a las ventajas que tiene sobre las demás técnicas existentes; la cromatografía gas-líquido que da buena reproducción, separación y rendimiento, tiene el inconveniente de necesitar la formación de derivados de los azúcares, debido a la baja volatilidad de éstos, lo que nos daría algo de imprecisibilidad y lentitud; los métodos colorimétricos existentes, cuentan con la sensibilidad y reproducción necesaria, pero son

inespecíficos y lentos; los métodos enzimáticos presentan el problema de permitir solo la determinación de un compuesto -- por análisis y su costo, ya que las enzimas inmovilizadas tienen un período de vida de dos semanas; la cromatografía de capa fina, de papel y los métodos de reducción de cobre son más lentos, requiriendo preparación de las muestras.

Metodología.

Un gran avance se ha conseguido en el análisis de carbohidratos con la introducción de nuevas columnas para la HPLC (fases ligadas a aminas o a carbohidratos), por lo que una -- gran cantidad de artículos han sido publicados. En la mayoría de los artículos revisados los autores emplean columnas μ Bondapak/Carbohidrato, Hurst y Martin (1,2,3), Damon y Pettitt (4), Brandao et. al. (5), Richmond et. al. (6), Warthesen y Kramer (7), Thean y Funderburk (8), Black et. al. (9,10), -- Dunmire y Otto (11), Cegla y Bell (12), Lawson et. al. (13, 14), Shaw et. al. (15), Euber y Brunner (16); Hunt et. al. -- (17) emplea una columna de fase ligada a una amina; Engel y Olinger (18) utilizan una columna de intercambio iónico; y Aitzetmuller (19), Aitzetmuller et. al. (20) y Johnock y -- Wagstaffe (21) emplearon sílica gel adicionado de un modificador de amina.

El detector utilizado por la mayoría, es el de índice de refracción, a excepción de Lawson et. al. (13,14) que emplean un detector de UV, lo que le da un mayor poder de detección, a nivel de nanogramos, pero con la inconveniencia de necesitar

un paso de derivación (p-nitrobencilexianina), para formar un compuesto cromóforo.

La fase móvil se encuentra formada por una mezcla de acetonitrilo-agua (7:3) en la mayoría de las técnicas; Brandao et al. (5) y Richmond et. al. (6) ocupan una fase eluyente de acetonitrilo-agua-etanol, a una relación de (85:15:5), la que incrementa la resolución y disminuye el tiempo de análisis, las explicaciones que se dan a esta mejora son, el etanol compite con los azúcares por el sitio activo de la fase estacionaria, pero sigue permitiendo un alto grado de interacción y selectividad; esto permite un decremento del tiempo de retención de los azúcares presentes en el sistema; el etanol disminuye la disponibilidad del agua para que solubilice los azúcares y esto en cambio incrementa el tiempo de retención.

Preparación y extracción de muestras.

Hurst et. al. (1,2,3) determinaron la presencia de fructosa, lactosa, glucosa y sacarosa en diferentes tipos de muestras chocolates, bebidas, frutas, lácteos, frutas procesadas y golosinas.

Las muestras de chocolate se desgrasan con éter de petróleo, son pulverizadas y disueltas en agua caliente, calentando a baño María, 85-90°C por 25 minutos, se enfría y centrifuga, el sobrenadante se filtra por un filtro de jeringa.

Bebidas, éstas sólo son filtradas, las carbonatadas se desgasifican. Las frutas frescas y procesadas se homogenizan y extraen con una mezcla de metanol-agua-ácido acético (79:20:1).

Productos lácteos (helados, pudings y yogurts) y golosinas (galletas, pasteles y barras de dulce) se extraen con agua a 70-80°C.

Uno de los métodos de extracción y separación más completos es el de Dunmire y Otto (11), en el que determinan la presencia de fructuosa, glucosa, sacarosa, melobiosa, rafinosa y estaquiosa, en una gran variedad de alimentos y en un amplio rango de concentraciones. La técnica de preparación de las muestras consiste, principalmente, en la extracción con una solución de etanol-agua (50:50); para muestras conteniendo menos del 50% de proteína se extrae sólo con agua, sometiénolas a baño sónico a una temperatura aproximada de 50°C. por una hora, agitando posteriormente. Las muestras con alto contenido de grasa, se lavan con cloroformo y se les ajusta el pH a 4.5, utilizando ácido acético para las de alto contenido proteico, para precipitar las proteínas, se centrifuga y limpia en una minicolumna empacada con Corasil AX y Porasil B/C₁₈, y una fase móvil de acetonitrilo-agua (75:25); las muestras quedan ya listas para la HPLC.

En la mayoría de los artículos revisados, los investigadores realizaron sus extracciones con mezclas de etanol-agua o solamente agua; la desprotenización se lleva a cabo con ácido acético o acetato de plomo o ácido tricloroacético.

Black et. al. (9,10) determinaron sacarosa, rafinosa, estaquiosa y β -ciclodextrina en soya; se considera que la rafinosa y la estaquiosa son responsables de problemas gastrointestinales asociados con alimentos conteniendo soya entera.

Brandao et. al. (5) y Richmond et. al (6) analizaron fructas y alimentos dietéticos para determinar la presencia de fructuosa, glucosa, sorbitol; sacarosa y maltosa.

Cegla y Bell (12) determinaron carbohidratos solubles, glucosa, sacarosa, refinosa y estaquiosa, en harinas desgrasadas de semillas oleaginosas.

Damon y Pettitt (4) determinaron fructuosa, glucosa y sacarosa en melazas.

Engel y Olinger (18) determinaron psicosa, maltotriosa, fructuosa, dextrosa, maltulosa y otros disacáridos en jarabes de maíz.

Warthesen y Kramer (7) analizaron leche y helados para determinar la presencia de fructuosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Shaw et. al. (15) determinaron la presencia de glucosa, fructuosa, D-manno-heptulosa y perseitol (alcohol de siete carbonos). La manno-heptulosa posee la habilidad fisiológica de causar inhibición de insulina en humanos.

Thean y Funderburk (8) empleando acetonitrilo y agua en la extracción, determinaron en mieles, levulosa, dextrosa, sacarosa, maltosa e isomaltosa.

3.2 Lípidos

El análisis parcial de lípidos en los alimentos ha sido siempre problemático, las técnicas existentes de cromatografía de gases, capa fina y métodos enzimáticos no son lo completamente satisfactorios en las determinaciones cuantitativas. La

aplicación de la HPLC al análisis de lípidos, no ha sido bien aprovechada, debido principalmente a la falta de detectores -- apropiados, en los últimos años este problema ha sido sobrepasado en su mayor parte, con el desarrollo de nuevos detectores y con las técnicas de derivación de compuestos no-absorbentes de UV a unos que sí absorban.

Metodología.

La mayoría de los investigadores que han reportado técnicas para determinar lípidos, ha sido sobre mezclas de éstos y no directamente en alimentos.

Plattner et. al (1) realizaron una separación rápida de triglicéridos, de acuerdo al largo de su cadena y al grado de insaturación.

Preparación de la muestra. Las muestras de aceite solo son disueltas en cloroformo.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil puede ser metanol-agua o acetonitrilo agua (2:1); el detector es un refractómetro diferencial.

Herslof et. al. (2) separaron triglicéridos de muestras artificiales, con resolución hasta en compuestos que solo difieren en dos grupos metilo.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Nucleosil C_{18}); la fase móvil está compuesta por acetonitrilo-acetona (1:1) ó metanol-acetona (3:2), siendo la primera la más apropiada para muestras de aceite natural; el detector es de índice de refracción, dando una mayor respuesta para glicéridos

saturados que para los insaturados.

Aitzatmuller (3) describió una técnica que puede ser aplicada al análisis de mezclas de mono-, di- y triglicéridos, emulsificantes, algunas grasas de semillas y productos técnicos tales como aditivos de polímeros.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con sílica gel; la fase móvil es una elución de gradiente, con tres mezclas de solventes, A tetracloruro de carbono-isooctano (34:66), B cloroformo-dioxano-hexano (40:11:49) y C cloroformo-metanol-éter diisopropílico (34:36:30); el detector es de transporte-flama-ionización.

Kiuchi et. al (4) determinaron di- y triglicéridos, ácidos grasos y esteroides, que permitió el análisis total de lípidos en soya y productos de soya.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con MicroPak SH-10 y una precolumna con Merkosorb SI-60; la fase móvil es una elución de gradiente, compuesta por un solvente A, hexano-cloroformo (9:1) y etanol como solvente B, el solvente B pasa de 0% de la fase inicial hasta 70% a un gradiente de concentración de 3%/minuto, manteniéndose constante durante 30 minutos; el detector es de ionización de flama.

El mínimo detectable es de 0.1 a 1.4 μ g.

Tweeten y Wetzel (5) determinaron derivados de ácidos grasos en extractos de granos.

Preparación de la muestra. Los granos son molidos hasta polvo fino, secado a vacío, los lípidos son extraídos con un solvente orgánico, el cual se evapora, bajo una corriente de nitrógeno.

-geno. La muestra es disuelta en cloroformo-metano (2:1); la concentración se ajusta de 0.5 a 2.5 moles/2 ml; se adiciona hidróxido de potasio 0.05 N en metanol, hasta que la concentración molar de la base sea de 9:1 con respecto al ácido potencial, se adiciona una gota de fenolftaleína al 0.1%; la muestra se pone en un evaporador rotatorio y se mezcla durante 2 minutos; el recipiente de la muestra se sumergió en un baño de aceite a 45-55°C, girando constantemente hasta evaporación del solvente (esto se nota con la desaparición del color rosa de la muestra).

Derivación. Se adiciona el bromuro de p-bromofenacil/éter en acetonitrilo a una concentración de por lo menos 25 veces más que el contenido potencial de ácidos grasos. El tiempo de derivación es de 30 minutos a 75-80°C en un bloque de digestión de aluminio.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con Spherisorb ODS; la fase móvil es metanol-agua (90:10); el detector es de UV fijo a 254 nm. Los ácidos grasos determinados son, miristico, palmítico, margárico (heptadecanoico), esteárico, li nolénico, linoleico, mezcla de palmítico y oleico.

Los resultados son similares a los obtenidos por cromatografía gas-líquido.

Borch (6) separó ácidos grasos de cadena larga en forma de sus esteres de fenacil.

Preparación de la muestra. Se hace reaccionar los ácidos grasos con soluciones de bromuro de fenacilo (12 mg/ml) y trigilamina (10 mg/ml) en acetona en proporción de 10:1:1 respec-

-tivamente, dejando reposar un día.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil es acetonitrilo-agua programada de una relación de 67:33 a 95:5; el detector de UV se fija a 254 nm.

Los ácidos separados son: láurico, mirístico, linolénico, mirístico, araquidónico, linoleico, eicosatrienoico, palmítico, oleico, petroselinico, eicosadienoico, esteárico, araquídico, behénico, lignocérico, heptadecanoico, nonadecanoico, eurfíico, heneicosanoico y nervónico.

La técnica proporciona resolución de las mezclas de ácidos grasos hasta en niveles de microgramo.

Determinación de colesterol. La determinación de colesterol en los alimentos ha tomado importancia, debido a los cuidados que en su consumo deben tener personas con problemas circulatorios.

Newkirk y Sheppard (7) desarrollaron un método que emplea el ester benzoato del colesterol para medir el colesterol en los alimentos.

Cromatografía. Las muestras extraídas se separan en una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil es metanol al 100% el detector de UV fijo a 230 nm.

El mínimo detectable son 10 ng; los porcentajes de recuperación para el colesterol adicionado a una variedad de alimentos es de $98.7 \pm 1.8\%$.

El contenido de colesterol determinado por HPLC es similar al obtenido por cromatografía gas líquido.

3.3 Compuestos Nitrogenados.

Los principales compuestos nitrogenados, son las proteínas.-- Por su importancia fisiológica y estructural son indispensables en la dieta humana. Las proteínas están compuestas por péptidos y estos a su vez por aminoácidos, esenciales y no esenciales; estos últimos pueden ser sintetizados en el organismo humano.

Las proteínas vegetales son escasas por lo general en uno o más aminoácidos esenciales (zeína escasa en triptófano, frijol en metionina, trigo en lisina, etc.), mientras que las proteínas animales son más completas, pero debido a su alto costo, en comparación con las vegetales, su consumo en lo general es reducido entre la gente de escasos recursos.

Este problema se ha tratado de combatir en muchos países por medio de suplementación o por fortificación de los alimentos deficientes en algunos aminoácidos esenciales.

Otro problema es la pérdida de valor nutritivo en los alimentos procesados, ya sea por desnaturalización de las proteínas o debido a reacciones de oscurecimiento tipo "Maillard".

Metodologías.

DeVries et. al. (1) determinaron triptófano en varios productos alimenticios; el método es simple y rápido en comparación con los ya existentes.

Preparación de las muestras. Las muestras secas son molidas y pulverizadas y pasadas por una malla número 40.

Hidrólisis. Las muestras son hidrolizadas con una solución de Pronase (Calbiochem grado B, 45x10 PUK/g) disuelta en una sol-

ción reguladora de fosfatos a un pH de 7.5.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μBondapak C₁₈); la fase móvil está compuesta por acetato de sodio-acetonitrilo-agua (1g+8ml+991ml), el pH se ajusta a 4.0 con ácido acético; el detector es un espectrofluoromonitor a una excitación de 295nm y emisión a 320nm.

La detección es a niveles de $\mu\text{g/ml}$, los porcentajes de recuperación varían de 91.8 a 100% para los diferentes alimentos analizados.

Schuster (2) determinó aminoácidos libres en bebidas (jugo de naranja, vino, cerveza) sin preparación alguna.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con LiChrosorb-NH₂; la fase móvil consiste de un solvente A, fosfato monobásico de potasio 0.01M a un pH de 4.3, y un solvente B, acetonitrilo-agua (50:7), con un gradiente lineal inicial de 95% de B, a los 20 minutos 70% de B, a los 27 minutos 50% de B y a los 30 minutos 95% de B; el detector es de longitud de onda variable a 200nm.

Peterson y Warthesen (3) determinaron lisina total y disponible, en mezclas de proteína-carbohidratos. La lisina es un aminoácido limitante en muchas proteínas vegetales, y debido a la presencia de un grupo ϵ -amino, esta sujeta a reacciones que nos pueden dar como resultado un aminoácido esencial nutricionalmente no disponible. La medición de lisina disponible es necesaria en alimentos que han sido procesados o almacenados en presencia de azúcares reductores.

Preparación de muestras. Una cantidad de muestra es humedecida con una solución de bicarbonato de sodio al 8% se le agrega -

etanol conteniendo FDNB, se agita durante dos horas y posteriormente se evapora el etanol.

La muestra se refluja por 16 horas con ácido clorhídrico 8.1N, después de la hidrólisis, la muestra es filtrada en caliente y diluida con agua, se toma una alicuota y se filtra por una membrana de 0.2 μ m.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bonda pak C₁₈); la fase móvil esta compuesta por acetonitrilo-solución reguladora de acetatos 0.01M pH 4.0 (20:80); el detector de absorbancia se fija a longitudes de onda de 436 o 254nm.

En comparación con el método espectrofotométrico, los valores de lisina son menores, pero se presume que es debido a la presencia de compuestos de interferencia en el método espectrofotométrico que da valores más altos.

Determinación de lisina total. La muestra se refluja por 18 horas con ácido clorhídrico 6.0N. El pH se ajusta a 9.0 con hidróxido de sodio 6N; se forma un derivado didansilo agregando una solución reguladora de borato 0.5M pH 9.0 y cloruro de dansilo 150mM en acetona; se mezcla y deja reposar en la oscuridad por una hora, y finalmente se filtra.

Los porcentajes de recuperación son de 95%.

Warthesen y Kramer (4) desarrollaron un método para evaluar la estabilidad de lisina libre en productos de harina de trigo fortificados con lisina.

Debido a que las proteínas del trigo son bajas en lisina, se ha propuesto la fortificación de alimentos derivados del trigo con lisina, para mejorar su valor nutricional. Reacciones de la-

lisina con azúcares reductores puede llevar a pérdidas de lisina durante tratamientos térmicos. La estabilidad de lisina adicionada en productos de cereal es de importancia, ya que la cantidad de lisina que queda después del tratamiento térmico puede ser -- considerablemente menor al adicionado antes del tratamiento.

Preparación de las muestras. Las muestras de harina se mezclan con ácido tricloroacético al 12%, se agita y centrifuga; el pH del sobrenadante es ajustado a 9.0 con hidróxido de sodio 5N y diluido con una solución reguladora de borato 0.1M pH 9.0; las muestras de masa y harina se extraen, mezclando primeramente con agua y con ácido tricloroacético al 40%, se centrifuga y se manejan de la misma forma que las muestras de harina.

Densilación. Esta es llevada a cabo agregando a una alícuota de la muestra preparada una solución reguladora de borato 0.1M, posteriormente adicionando cloruro de dansilo 10mM en acetona, mezclando e incubando en la oscuridad a 40°C. La muestra se filtra en una membrana de 0.2 μ m.

Cromatografía. La columna empleada es de fase inversa (μ Bondapak C₁₈); la fase móvil esta compuesta por acetonitrilo-solución reguladora de fosfato disódico 0.01M pH 7.0 (2:5); el detector de absorbancia se fija a una longitud de onda de 254nm.

Los porcentajes de recuperación son de 85.5% en presencia de celulosa, 70.6% con sacarosa y de 20.9% con jarabe de maíz alto en fructuosa. El pan de levadura elaborado con harina fortificada (0.5% de hidrocioruro de lisina) da una recuperación de 23% para la corteza y 97% para el migajón, con un promedio de 85% para el total del pan.

O'Keefe y Warthesen (5) determinaron la estabilidad de metionina libre en alimentos fortificados.

La metionina es un aminoácido esencial sulfurado que al agregarse a alimentos deficientes provoca un aumento del PER en animales de laboratorio y un aumento de retención de nitrógeno en humanos. La sobrefortificación de metionina nos puede llevar a efectos dañinos, resultantes del desbalance o de los efectos tóxicos de la metionina en exceso.

Preparación de muestras. La muestra seca (proteína de soya -- 40%, D-glucosa 0 a 4%, DL-metionina 0.5% y cuanto baste para 100% de celulosa microcristalina) y molida es adicionada de metanol al 10%, posteriormente se agrega ácido tricloroacético al 40%; se filtra a vacío y el residuo es lavado con agua. El pH del filtrado se ajusta a 9.5 con hidróxido de sodio 5N, aforando con agua.

Dansilación. Una alícuota de la muestra es mezclada con cloruro de dansilo 10mM (1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfocloruro) en acetona; cantidades iguales de muestra y solución reguladora de borato 0.1M pH 9.5 se mezclan por una hora a 40°C.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Mbondapak C₁₈); la fase móvil está compuesta por acetonitrilo-solución reguladora de fosfato disódico 0.01M pH 7.9 (1:4); el detector de absorbancia se fija a 254nm.

El mínimo detectable es de 10ng; el método también sirve para medir el sulfóxido de metionina (nutricionalmente aprovechable, y la sulfona de metionina.

Saetre y Rabenstein (6) determinaron cisteína y glutatión en

frutas. Estos son los principales tioles no-proteicos de las -- plantas. Se cree que estos tioles están relacionados con varios aspectos fisiológicos de las plantas, tales como, transporte de electrones y fosforilación durante la fotosíntesis, división celular, mantener el ácido ascórbico en su forma reducida, endurecimiento por congelado y en la regulación de la maduración de peras.

Preparación de muestras. Una muestra de jugo de fruta se mezcla con una cantidad similar de ácido fosfórico al 2%, se centrífuga y el sobrenadante es filtrado en un filtro Millipore de --- 0.45 μ m.

Cromatografía. La columna empleada se empaca con una resina de fuerte intercambio aniónico (zipax SCX); la fase móvil está - constituida por ácido fosfórico al 0.5%, desaireado con oxígeno-libre de nitrógeno; se emplea un detector electroquímico operado a +0.1 V contra un electrodo saturado de calomel.

Los límites de detección son de 2 μ M para glutation y de 3 μ M - para cisteína.

3.4 Vitaminas.

Uno de los aspectos que dan mayor calidad al suministro de -- alimentos es su contenido vitamínico. Desde un punto de vista -- biológico, comemos para sobrevivir y el patrón de nuestros requerimientos nutricionales se ha desarrollado durante un largo proceso evolutivo en el cual el hombre se ha adaptado al medio. Aun que ciertos procesamientos de alimentos, tales como el cocido, - son muy viejos, es solo hasta los últimos 150 años que se ha empezado a consumir una parte significativa de nuestros alimentos

en una forma procesada (fábricas).

La industria moderna de alimentos ha contribuido enormemente a los estatus de la salud pública. Esto es considerando que en la actualidad es posible alimentarse con una dieta balanceada -- con todo tipo de alimentos, en cualquier temporada del año y/o -- en cualquier localización geográfica.

Al mismo tiempo, la tecnología moderna ha introducido una parte de problemas. Algunas veces ha sido resultado de un conoci--- miento inadecuado; pero casos trágicos de enfermedad y algunas -- veces muerte, han ocurrido cuando valores de nutrientes esencia-- les se han perdido, debido a ignorancia, falta de cuidado o a -- una falta de principios a la práctica de buena manufactura. En el pasado, nuevos métodos de procesamiento rara vez han sido in-- culpados de su contribución en la retención o pérdida de nutrientes.

Varios procesos, tales como el congelado o reconstitución de alimentos deshidratados, pueden traer beneficios en el desarro-- llo del procesamiento, pero también pueden llevar a pérdidas de vitaminas más altas de lo normal. Un producto alimenticio, para tener una calidad nutricional aceptable, tiene que proveer gene-- ralmente aquellos nutrientes normales, característicos de su grupo alimentario.

3.4.1 Vitaminas Hidrosolubles.

Los métodos oficiales o de uso común para el análisis de vitaminas hidrosolubles por lo general son tediosos, lentos y en algunos casos emplean reactivos tóxicos, tales como el uso de bromuro de cianógeno para la determinación de niacina. Es por lo --

cual se han desarrollado técnicas de HPLC para facilitar y disminuir el tiempo de análisis.

Metodologías.

Willis et. al. (1) desarrollaron una técnica general para el análisis de vitaminas hidrosolubles.

Cromatografía. Se emplean dos diferentes tipos de columnas, - una μ Bondapak C_{18} y una Bondapak NH_2 . Con la primera se pueden obtener la resolución de 7 vitaminas (piridoxina, riboflavina, niacina, B_{12} , tiamina, ácido ascórbico, ácido fólico) de una mezcla de estas en un solo análisis, requiriendo menos de 40 minutos para llevar a cabo la determinación. Con la segunda columna se determinan todas las vitaminas a excepción del ácido fólico, pero el tiempo de análisis es menor, aproximadamente 15 minutos.

La fase móvil utilizada es una mezcla de metanol-agua a concentraciones de (70:30) a (80:20). Empleando diferentes sales, soluciones reguladoras y reactivos PIC (fosfato de terbutil amonio y ácido tetrabutil amonio), para mejorar la resolución; el detector es de UV operado a 254nm.

Toma y Tabekhia (2) determinaron la presencia de vitaminas B (tiamina, riboflavina y niacina) en arroz y productos derivados.

Preparación de las muestras. Primero se cuece el arroz por 10 minutos, se enfría inmediatamente y seca por congelación al vacío; las muestras son molidas, se les adiciona H_2SO_4 0.1N, sometiéndolas a autoclave durante treinta minutos a 15 psig. Después de enfriar, el pH es ajustado a 4.5 con acetato de sodio 2.0M. - Takahadiastasa 1.0M y papafna son agregadas e incubadas a 35°C. -

las muestras se diluyen con agua desionizada y filtra en papel.- Una alícuota es refiltrada en un filtro de clarificación.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (M Bon-dapak C₁₈); la fase móvil está compuesta por metanol-agua-ácido_ácetico (39:60:1) adicionada de los reactivos de partición par-iónico PLC-5 (ácido pentano sulfónico) y PIC-7 (ácido heptano -- sulfónico); el detector de UV es fijado a 254nm.

Los porcentajes de recuperación son semejantes a los obteni-- dos por los métodos de la AACC, pero la técnica de HPLC es más - fácil y rápida.

Ang y Moseley (3) determinaron tiamina y riboflavina en carne y productos derivados.

Preparación de muestras: Muestras de carne de gallina, carne molida, salchicha, mortadela y carne de puerco son molidas e hi-drolizadas con HCl 0.1N a 121°C en autoclave por 30 minutos. El pH se ajusta entre 4.0 y 4.5 con acetato de sodio 2M. y se le -- adiciona soluciones de enzima, takahadiastasa al 5% y papaína al 10% y se incuba a 42°-45°C. Las proteínas son precipitadas con ácido tricloroacético al 50%, la solución es calentada, diluida y filtrada.

Determinación de riboflavina.- Para convertir riboflavina - en lumiflavina, se toma una alícuota de la muestra filtrada y - se ajusta el pH entre 10 y 12 con hidróxido de sodio al 15%. - La muestra se irradia con luz UV durante 30 minutos, inmediata- mente se adiciona ácido acético glacial, un 10% de la alícuota.

La muestra se extrae con cloroformo, el extracto es deshidra- tado con sulfato de sodio anhidro.

Determinación de tiamina.- Una alicuota del filtrado es oxidada con una solución alcalina de ferricianuro de potasio al 1% y el tiocromo resultante es extraído con alcohol isobutílico.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con spherisorb sílica 20 micras; la fase móvil está compuesta por cloroformo-metanol (90:10); el detector de fluorescencia es fijado a una longitud de onda de 367 nm para tiamina y a 270 nm para riboflavina.

Los límites de detección para tiamina y riboflavina son de -- 0.05 ng y 0.02 ng respectivamente, y los porcentajes de recuperación variaron de 84.4 a 94.2% para tiamina y de 88.1 a 99.9% para riboflavina.

Kamman et. al. (4) también determinaron tiamina y riboflavina pero en alimentos fortificados (hojuelas de maíz, trigo, harinas de trigo y arroz precocido). A diferencia del método anterior, este ocupa un detector de UV, eliminando así los pasos para obtener un compuesto fluorescente, pero se observa un aumento en el mínimo de detección.

Preparación de la muestra: Una muestra molida es disuelta en ácido clorhídrico 0.1N y sometida a autoclave por 30 minutos a 15 psi. Después del enfriamiento se centrifuga; el sobrenadante es decantado y filtrado.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Bondapak C₁₈); la fase móvil consiste de una mezcla de acetonitrilo solución reguladora de fosfatos 0.01M (pH7.0) con una relación correspondiente en volumen de 12.5:87.5; conteniendo la sal de sodio del ácido heptano sulfónico 0.005M. El detector de UV se fija a 254nm.

El mínimo detectable es de 30ng y 5 ng para tiamina y riboflavina respectivamente.

Son varios los investigadores que han desarrollado técnicas para la determinación de ácido fólico y sus derivados. Clifford et. al (5) y Reed et. al. (6) emplearon columnas de intercambio-aniónico, mientras que Branfman et. al. (7) recomienda la fase inversa con ion-pareado dando como ventajas, el evitar los problemas de control de pH y vida corta de la columna.

Debido a su aplicación directa al análisis de alimentos la técnica de Clifford et. a. es la que se describe a continuación.

Preparación de la muestra: Las muestras sólidas se muelen completamente (almendras, germen de trigo, cacahuates, etc.) y homogenizan con una solución reguladora de fosfato de potasio a pH 7.5, conteniendo mercaptoetanol 0.2M, se pone a baño maría y enfría posteriormente en hielo. Finalmente la muestra es centrifugada, tomando alicuotas del sobrenadante para la HPLC.

Para muestras de jugos de frutas, se ajusta el pH a 7.0 con hidróxido de potasio sólido y diluye con un volumen similar de una solución reguladora de fosfato de potasio 0.01M conteniendo mercaptoetanol 0.2M centrifugando posteriormente a una temperatura de 2°C.

Cromatografía.- Se emplea una precolumna y una columna empacada con una resina de fuerte intercambio aniónico (Pellionex---SAX); la fase móvil es un gradiente compuesto por cloruro de potasio 0.01M y fosfato de potasio 0.01M conteniendo cloruro de potasio 1.0M; el detector de UV es fijado a 280nm.

Los derivados del ácido fólico que son determinados vienen siendo: el ácido tetrahidrofólico, ácido N⁵-metiltetrahidrofólico y ácido dihidrofólico.

La mínima cantidad de ácido fólico la cual puede ser medida con fiabilidad es de 0.035nmoles/10µl.

Son varios los autores que han reportado la separación de los componentes de la vitamina B₆ (piridoxal, piridoxol, piridoxamina) entre ellos encontramos a Lim et al (8), Gregory y Kirk (9,10) y Wong (11), el primero realizó una determinación cualitativa en muestras de leche; el segundo analizó cuantitativamente modelos de alimentos enriquecidos, siendo sus determinaciones cuantitativas.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Zipax SCX); y la fase móvil está compuesta por una solución de fosfatomonopotásico 0.1N a un pH de 4.35; el detector UV se fija a 21nm.

Los porcentajes de recuperación son de 60 y 85% para el piridoxal y la piridoxamina respectivamente.

Con el método de Gregory (10) se obtienen porcentajes de recuperación mayor (93.9± 7.6%), pero la vitamina se determina en su totalidad en forma de piridoxina.

Se emplea una columna ODS (Octadecil silica) y una fase móvil de fosfato de potasio ácido; el detector es de fluorescencia. En comparación con el método del *Sacharomyces uvarum* resultó ser más satisfactoria debido a su simplicidad, mayor cantidad de muestras determinadas, precisión y exactitud.

3.4.2 Vitaminas Liposolubles.

La aplicación del HPLC al análisis de vitaminas liposolubles ha aumentado considerablemente en los últimos años, esto se observa en la gran cantidad de artículos publicados relacionados con este tema.

Debido también a esto, solo se describirán las técnicas más recientes y de mayor aplicabilidad.

Metodología.

Entre las técnicas más completas en relación con la cantidad de vitaminas determinadas simultáneamente está la de Barnett et. al. (12) el que analizó leche, productos lácteos y alimentos para infantes basados en soya; requiriendo sólo de 50 minutos para separar las vitaminas A, D₂, D₃, E y K₁.

Preparación de la muestra: Las muestras se someten a una hidrólisis enzimática de sus componentes grasos. Después de la hidrólisis las muestras son alcalinizadas con una solución de hidróxido de sodio 10N y diluidas con etanol al 95%. Inmediatamente se realizan extracciones con n-pentano; éstas son lavadas con agua hasta que la fase acuosa sea neutra a la fenolftaleína. Bajo luz tenue los extractos son filtrados a través de sulfato de sodio anhidro y evaporados bajo presión reducida con ayuda de un baño de agua tibia.

La muestra se enfría a temperatura ambiente bajo vacío y se transfiere a un matraz conteniendo éter etílico; el éter etílico es evaporado con una corriente de nitrógeno; la muestra seca se disuelve en una solución a partes iguales de fenilacetato de colesterol (estándar interno), acetato de etilo y acetonitrilo;

el volumen final se obtiene diluyendo en una solución de acetato de etilo y acetonitrilo (1:1).

Cromatografía. Se utilizan dos columnas empacadas con Zorbax ODS colocadas en serie; la fase móvil es una elución de gradiente compuesta por un eluyente primario de metanol-acetato de etilo (86:14) y como eluyente secundario acetonitrilo. El detector de UV de longitud de onda variable se fija a 325 y 365nm para -- las dos formas de vitamina A (alcohol y palmitato) y a 265nm para las vitaminas D₂, D₃, E (alcohol y acetato) y K₁.

Los porcentajes de recuperación son mayores de 93% para todas las vitaminas.

Determinación simultánea de vitamina A y E.

Entre los investigadores que han desarrollado técnicas para la determinación simultánea de las vitaminas A y E se encuentran:

Soderhjelm y Anderson (13), DeVries et. al. (14) y Widicus y Kirk (15); siendo la técnica de este último la descrita a continuación, debido a su rapidez (no es necesario saponificar en la extracción, al contrario de los otros dos métodos) y a su mayor porcentaje de recuperación.

Preparación de la muestra: Una cantidad de muestra molida (ce real) se somete a reflujo durante 20 minutos en baño de agua a 50°C. y con una agitación constante, en presencia de cloroformo, solución de etanol al 95%-cloroformo (135:65) y agua éstas en -- proporción de 2:3:1 respectivamente. Después del reflujo, se filtra y se termina la extracción de los compuestos solubles con cloroformo. Los extractos se filtran a través de sulfato de sodio anhidro, que son evaporados a continuación, el residuo se di

suelve en la fase móvil y es filtrado a través de una jeringa - filtro de 0.45 micras.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con sílica -- (M Porasil); la fase móvil está compuesta por hexano-etanol al 1% en cloroformo (85:15); en la detección se puede utilizar tanto un detector de absorbancia como un fluorómetro, el primero se fija a 280 nm para el acetato de tocoferol y a 280 y 313nm para el palmitato de retinol y el fluorómetro es operado a una excitación de 360nm y una emisión de 415nm.

Los porcentajes de recuperación son de $99.2 \pm 4.28\%$ y $94.9 \pm 4.1\%$ para el palmitato de retinol y el acetato de tocoferol respectivamente en muestras de cereal conteniendo maíz, trigo, arroz y avena.

Por la técnica de Soderhjelm y Anderson se puede analizar mantequilla, margarina, alimentos para infantes y alimentos de ganado teniendo porcentajes de recuperación de $86 \pm 3\%$ y $91 \pm 3\%$ para el acetato de retinol y el acetato de tocoferol respectivamente.

Determinación de Vitamina y Provitamina A (carotenoides).

El desarrollo de técnicas para la determinación de vitamina A en los alimentos ha sido muy amplia; existiendo poca similitud entre ellas.

Thompson et. al. (16) determinaron la presencia de vitamina A en margarina, leche entera, parcialmente descremada y descremada.

Sin necesidad de saponificar las muestras. Aitzetmueller et. al. (18) la determinó sólo en margarinas, tampoco saponifica,

pero utiliza un paso extra de limpieza de los extractos en una columna empacada con sulfato de sodio y cloruro de sodio. Ambos autores ocupan columnas de fase directa. Entre los investigadores que utilizan columnas de fase inversa se encuentran Landen y Eitenmiller (19,20) que determinaron palmitato de retinol en cereales (procesados), aceite y margarina, necesitando purificar parcialmente la vitamina en una columna de permeabilidad en gel para eliminar triglicéridos antes de aplicar su muestra a la columna analítica. Egberg et. al. (21) cuantificaron los isómeros trans y 13-cis del retinol después de saponificar sus muestras, en una columna de fase inversa.

Thompson y Maxwell (17) en un artículo previo al ya mencionado determinaron vitamina A en margarina, alimentos infantiles y leche fortificada, saponificando primero las muestras y analizando en una columna de fase inversa.

Bui-Nguyen y Blanc (22) cuantificaron vitamina A en leche y queso, saponificando también las muestras y empleando una columna de fase inversa para el análisis.

En general se obtienen buenos resultados en las técnicas mencionadas. Bui-Nguyen y Blanc y Egberg et. al. comparando sus resultados con los del método convencional de Carr-Price, los encuentran muy similares; pero los métodos de HPLC resultan ser más ventajosos principalmente en rapidez y simplicidad.

Determinación de Provitamina A. Los principales precursores de vitamina A son los α y β carotenos, y la β -criptoxantina.

Stewart (23,24) determinó en jugo de naranja los precursores de vitamina A.

suelve en la fase móvil y es filtrado a través de una jeringa - filtro de 0.45 micras.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con sílica -- (M Porasil); la fase móvil está compuesta por hexano-etanol al 1% en cloroformo (85:15); en la detección se puede utilizar tanto un detector de absorbancia como un fluorómetro, el primero - se fija a 280 nm para el acetato de tocoferol y a 280 y 313nm - para el palmitato de retinol y el fluorómetro es operado a una excitación de 360nm y una emisión de 415nm.

Los porcentajes de recuperación son de $99.2 \pm 4.28\%$ y $94.9 \pm 4.1\%$ para el palmitato de retinol y el acetato de tocoferol - respectivamente en muestras de cereal conteniendo maíz, trigo, - arroz y avena.

Por la técnica de Soderhjelm y Anderson se puede analizar -- mantequilla, margarina, alimentos para infantes y alimentos de ganadero teniendo porcentajes de recuperación de $86 \pm 3\%$ y ----- $91 \pm 3\%$ para el acetato de retinol y el acetato de tocoferol respectivamente.

Determinación de Vitamina y Provitamina A (carotenoides).

El desarrollo de técnicas para la determinación de vitamina A en los alimentos ha sido muy amplia; existiendo poca similitud entre ellas.

Thompson et. al. (16) determinaron la presencia de vitamina A en margarina, leche entera, parcialmente descremada y descremada.

Sin necesidad de saponificar las muestras, Aitzetmueller et. al. (18) la determinó sólo en margarinas, tampoco saponifica. -

pero utiliza un paso extra de limpieza de los extractos en una columna empaquetada con sulfato de sodio y cloruro de sodio. Ambos autores ocupan columnas de fase directa. Entre los investigadores que utilizan columnas de fase inversa se encuentran Landen y Bittenmiller (19,20) que determinaron palmitato de retinol en cereales (procesados), aceite y margarina, necesitando purificar parcialmente la vitamina en una columna de permeabilidad en gel para eliminar triglicéridos antes de aplicar su muestra a la columna analítica. Egberg et. al. (21) cuantificaron los isómeros trans y 13-cis del retinol después de saponificar sus muestras, en una columna de fase inversa.

Thompson y Maxwell (17) en un artículo previo al ya mencionado determinaron vitamina A en margarina, alimentos infantiles y leche fortificada, saponificando primero las muestras y analizando en una columna de fase inversa.

Bui-Nguyen y Blanc (22) cuantificaron vitamina A en leche y queso, saponificando también las muestras y empleando una columna de fase inversa para el análisis.

En general se obtienen buenos resultados en las técnicas mencionadas. Bui-Nguyen y Blanc y Egberg et. al. comparando sus resultados con los del método convencional de Carr-Price, los encuentran muy similares; pero los métodos de HPLC resulta ser más ventajosos principalmente en rapidez y simplicidad.

Determinación de Provitamina A. Los principales precursores de vitamina A son los α y β carotenos, y la β -criptoxantina.

Stewart (23,24) determinó en jugo de naranja los precursores de vitamina A.

Cromatografía. Se emplea un precolumna y una columna empacada con magnesia (MgO); la fase móvil es una elución de gradiente compuesta por acetona-hexano (99:1) como solvente primario y acetona como eluyente secundario; utilizando un detector con un filtro de 440 nm.

Los porcentajes de recuperación son de 89.0 y 98.4% para el α y β caroteno respectivamente.

Reeder y Park (25) emplearon una columna empacada con alúmina para determinar α y β carotenos y una columna empacada con Spherisorb 10 micras para Criptoxantina en muestras de jugo de naranja; la fase móvil para los carotenos es benceno-n-hexano (1:5) con BHT al 0.01% el detector es de UV con un filtro de 440 nm.

Se pueden detectar hasta 0.02 μ g/ml de β caroteno y 0.04 g/ml de α -caroteno y Criptoxantina.

Zakaria et. al. (26) determinaron α -, β -caroteno y licopeno en jitomates a nivel de nanogramos.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa; la fase móvil está compuesta por cloroformo al 8% en acetonitrilo, el análisis del extracto saponificado y lavado se realiza en 15 minutos.

Determinación de Vitamina D y sus metabolitos, Henderson et. al. (27) y Thompson et al (28) determinaron vitamina D en leche fortificada, obteniendo mejores resultados Thompson et. al.

Preparación de la muestra. Saponificación, una muestra de leche se mezcla con un volumen igual de piragadol etanólico al 1%, adicionando posteriormente hidróxido de potasio sólido, se disuel-

-ve en frío y deja reposar durante un día. Se transfiere a un embudo de separación, lavando con agua, etanol y éter. La mezcla se extrae con éter y con hexano, y finalmente se lava con agua, los extractos son evaporados y el residuo disuelto en hexano; y se purifica en una columna de baja presión empacada con hidroxialkoxipropil Sephadex, detectando en UV a 254 nm.

Cromatografía. Una alícuota de la fracción separada se cuantifica en una columna empacada con Lichrosorb Si60; la fase móvil se compone por isopropanol al 0.6% en hexano (saturado al 50% con agua); el detector de longitud de onda variable se fija a 265 nm.

La recuperación de Vitamina D es mayor de 97% para las diferentes muestras.

Determinación de metabolitos de Vitamina D (2,5-hidroxicolcalciferol). Koshy y Van DerSlik (29,30) determinaron en leche y yemas de huevo el metabolito de la Vitamina D (2-5 hidroxicolcalciferol).

Preparación de la muestra. Las muestras son extraídas con etanol-éter etílico y sometidas a partición con cloruro de metileno y con acetonitrilo, finalmente se purifica en sílica gel.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Zorbax ODS, C₁₈); la fase móvil está compuesta por acetonitrilo-metanol-agua (94:3:3); el detector de UV se fija a 254 nm.

El método es cuantitativo hasta niveles de 10 ng/ml.

Determinación de Vitamina E (Tocoferoles).

Silas et al. (31) determinaron α -tocoferol en hígado de -

pescado.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ -Bondapak C_{18}); la fase móvil es metanol-agua (90:10); el detector de absorbencia se equipa con un filtro de 280 nm.

Preparación de la muestra. La técnica no requiere de saponificación, el hígado homogenizado es extraído con dihexano-isooctano (20:80), se evapora al vacío, el residuo se disuelve en acetónitrilo y el α -tocoferol es extraído con isooctano. Se evapora al solvente y se disuelve en la fase móvil. La cantidad mínima que puede ser determinada con precisión $1 \mu\text{g/g}$ de hígado; el porcentaje de recuperación promedio es de 86.2%. Carpenter (32) determinó en aceites vegetales los cuatro tocoferoles naturales (α -, β -, γ -, δ), sin necesidad de preparar la muestra, solo se necesita disolver en la fase móvil.

3.3 Aditivos

Los aditivos son sustancias o mezclas de sustancias que se agregan a los alimentos con dos propósitos principales, el mejorar su caracter organoléptico y el conservarlo, manteniendo sus propiedades y previniendo el deterioro químico y microbiológico.

De los artículos revisados se encontraron cinco principales grupos de aditivos, antioxidantes, conservadores, edulcorantes, tensoactivos y colorantes, este último se considera en un tema aparte debido a su extensión.

3.5.1. Antioxidantes.

Los antioxidantes, como su nombre lo indica, se emplean en aquellos alimentos que pueden sufrir oxidación, siendo ésta perjudicial para el producto, presentándose este problema en alimentos con alto contenido de grasas.

Varios métodos han sido desarrollados para la determinación de antioxidantes, encontrándose en la mayoría de ellos un alto rendimiento. La diferencia más notable entre las técnicas existentes, es el número de antioxidantes determinados en un análisis; Ciraolo et. al. (1) y Pieter y Lourens (2) reportaron la determinación de dos y uno, respectivamente, mientras Page (3) reportó la determinación de nueve antioxidantes; ya que además la técnica de este último es rápida, sencilla y sensible, se ha tomado como el método a describir.

Metodología

Los antioxidantes (TBHQ, BHT, Ionox-100, TBHP, PG, OG, DC

y NDGA) son extraídos de muestras de aceite, manteca y grasa con hexano, posteriormente son extraídas con acetonitrilo, éste se concentra bajo vacío, quedando la muestra lista para inyectarse.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (LiChrosorb RP-18 de 10 μ m); y una de seguridad, empacada con LiChrosorb RP-18 de 38 μ m; La fase móvil es una elución de gradiente, compuesta por ácido acético al 5% en agua como solvente A y acetonitrilo como solvente B, la fase inicial es de 30% de B en A, hasta un 100% de B en 10 minutos; el detector de UV se fija a 280 nm.

Los porcentajes de recuperación son mayores de 90%, exceptuando el del BHT que es de 84-87%.

3.5.2 Conservadores

Los conservadores que se han determinado utilizando HPLC son: el ácido sórbico, benzoato de sodio y los ésteres metilo y propilo del ácido p-hidroxibenzoico; éstos son comúnmente utilizados en la industria alimentaria en una gran variedad de productos, para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras asociados con la descomposición de los alimentos.

Metodología

Leuenberger y Baumgartner (4) describen el análisis cuantitativo de una gran variedad de alimentos para determinar el contenido de ácido benzoico, ácido sórbico, los ésteres metilo y propilo del ácido p-hidroxibenzoico y sacarina.

Preparación de muestras. Los jugos de fruta, vinos y otros alimentos acuosos, generalmente no necesitan tratamientos para

eliminar impurezas, a lo más, una filtración para eliminar los sólidos no solubles. Las muestras con contenido alto de triglicéridos o similares tales como la mantequilla y margarina se disuelven en éter dietílico y se extraen con una solución de hidróxido de sodio 0.1N, el extracto acuoso se acidifica con ácido sulfúrico 5N y se diluyen con metanol, filtrando posteriormente. Para los demás tipos de alimentos tales como quesos, pasteles, yogurts y otras muestras que tiendan a formar emulsiones durante la extracción; primero se homogenizan con ácido sulfúrico - 0.5N (50 ml), y se afora a 100 ml con agua, una alícuota se vierte a una columna Extrelut (estructura granular de poro amplio), se deja filtrar por 15 minutos y se eluye con cloroformo-isopropanol (9:1), el filtrado se evapora y los últimos mililitros - son tratados con una corriente de nitrógeno; el residuo se disuelve en metanol.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (MBondapak C₁₈); la fase móvil es una elución de gradiente, compuesta por una solución de fosfatos como solvente A y por metanol - como solvente B; las condiciones iniciales son 20% de B, pasando a 80% en un minuto; se emplea un detector de longitud de onda variable.

Se obtienen porcentajes de recuperación de 80 a 101% para las diferentes muestras y conservadores.

Bennet y Petrus (5) determinaron ácido sórbico y benzoato de sodio en muestras de jugos cítricos.

Preparación de muestras. Las muestras se centrifugan y - filtran, quedando listas para la cromatografía.

Cromatografía. Una columna de intercambio aniónico (Parti-

sil 10-SAX) es empleada; la fase móvil es una solución de fosfato de potasio monobásico 0.225M; el detector es un espectrofotómetro de longitud de onda variable. Los porcentajes de recuperación para el ácido sórbico y el benzoato de sodio son de 96.5% y 96.8% respectivamente.

Woodward et. al. (6) determinaron en refrescos la presencia de benzoato de sodio, sacarina y cafeína.

Preparación de muestras. Las bebidas carbonatadas son desgasificadas por agitación o tratamiento ultrasónico; las bebidas conteniendo sólidos en suspensión se filtran a través de filtros Millipore (0.45 μ).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C₁₈); la fase móvil está compuesta por una solución de ácido acético al 20%, regulado con una solución saturada de acetato de sodio a un pH de 3.0; el detector de UV se fija a 254 nm.

Los porcentajes de recuperación son de 98.6, 101.5 y 100.8% para sacarina, benzoato de sodio y cafeína, respectivamente.

Esta técnica fue sometida a un trabajo colaborativo. Por los resultados satisfactorios obtenidos, fue reconocida como primera acción oficial por la AOAC.

3.5.3 Edulcorantes

Los principales edulcorantes empleados como sustitutos del azúcar (sacarosa) en productos dietéticos o simplemente carentes de ésta, son: sacarina, manitol y sorbitol, éstos dos últimos han tomado mayor importancia en la industria alimentaria, ya que el primero, ha sido prohibido su uso en los alimentos.

Metodología

Las técnicas para determinar sacarina se encuentran descri-

-tas en el tema de conservadores.

Las determinaciones de manitol y sorbitol realizadas por Samarco (7) y Dokladalova et. al. (8), éste último solo determinando sorbitol, son muy semejantes; Samarco realizó su determinación en goma de mascar, mientras Dokladalova et. al. lo hicieron sobre volúmenes de sorbitol, obteniendo mejores resultados el primero, por lo que su técnica es la que se describe.

Preparación de muestras. Una muestra de goma de mascar se disuelve en tolueno, y después se extrae con agua, se dejan separar las fases, y se filtra la fase acuosa.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con una resina de intercambio catiónico (Aminex Q-15); la fase móvil es agua; y el detector de índice de refracción.

Los porcentajes de recuperación son de 98.9 y 99.2% para manitol y sorbitol, respectivamente.

3.5.4 Determinación de tensoactivos

Mauro et. al. (9) desarrollaron una técnica para determinar el grado de descomposición que sufre el 6-0 palmitoil-L-ascorbato de sodio (empleado para prevenir rancidez y como acondicionador de masa) durante la panificación.

Preparación de muestras. Las muestras de pan conteniendo el 6-0 palmitoil-L-ascorbato de sodio son secadas por congelación y molidas hasta que un 50% pase por una malla de 13XX (104), -- las muestras molidas se mezclan con dodecil sulfato de sodio, -- adicionando una solución reguladora de fosfatos 0.1M conteniendo α -amilasa; la muestra se digiere a 48°C, con agitaciones ocasionales, durante una hora; posteriormente se filtra sobre fil-

-tros de fibra de vidrio.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Ubon-dapak C₁₈); la fase móvil seleccionada se compone por metanol-agua (75:25); el detector es de UV diferencial fijo a 254 nm.

La máxima recuperación para los patrones de pan es de 95.5% y de 81.7% para el acondicionador que queda después de la panificación.

El método puede ser aplicable a la mayoría de los tensoactivos en pan.

3.6 Ácidos Orgánicos

La importancia de determinar ácidos orgánicos en los alimentos es debida a varios aspectos, entre los principales encontramos, estudio de sabores, razones nutricionales, indicadores de actividad bacteriológica, etc..

Marsili et. al. (1) analizaron productos lácteos para determinar la presencia de una variedad de ácidos orgánicos. Estos pueden encontrarse como resultado de la hidrólisis de la manteca de quilla (ácidos grasos), adición directa como acidulantes (cítrico, láctico y propiónico) procesos normales del metabolismo bioquímico de los bovinos (cítrico, hipúrico, úrico, orótico y ascórbico) o por crecimiento bacteriológico (pirúvico, láctico, acético y propiónico).

Tangendjaja et. al. (2) determinaron ácido fítico en arroz; el ácido fítico es un compuesto cíclico (inositol) que contiene seis grupos fosfato, siendo un constituyente común del tejido vegetal. Debido a sus propiedades quelantes con iones metálicos

di- y trivalentes, como calcio, magnesio, zinc, cobre y fierro, formando compuestos insolubles que no son rápidamente absorbidos por el tracto intestinal; ha sido responsabilizado de la interferencia que existe comúnmente en fuentes proteicas vegetales para el aprovechamiento de dietas minerables. El significado nutricional del fitato en la dieta humana ha tomado gran importancia en los últimos años debido a sus implicaciones en la deficiencia mineral prevalcientes en algunas partes del mundo, donde su dieta proteica está basada en cereales.

Turkelson y Richards (3) determinaron los ácidos del ciclo - de Krebs, en orina de humano y rata, así como en jugos de frutas (naranja, uva).

Metodología.

Preparación de muestras. Los productos lácteos son prepara-- dos de la siguiente manera: muestras de leche entera, crema agria, queso cottage, yogurt, queso cheddar y roquefort, son adiciona-- das de agua y acetonitrilo, agitadas y centrifugadas, los sobre-- nadantes son filtrados en jeringas que contienen filtros de mem-- brana de teflón. Para muestras de mantequilla, se utiliza mayor cantidad y no se adiciona agua.

Las muestras de jugos de fruta solo son filtradas y diluidas. En las muestras de arroz, el ácido fítico se extrae con ácido tri-- cloroacético al 3%, agitando por 30 minutos y centrifugando poste-- riormente, el sobrenadante se filtra, quedando listo para inyec-- tarse.

Cromatografía. Marsili et. al. emplearon la técnica de Tutkel-- son y Richards con ciertas modificaciones. Ambos utilizan una so-

-lumna empacada con una resina de fuerte intercambio iónico (Aminex HPX y Aminex 50wx4, respectivamente); como fase móvil ambos emplean ácidos inorgánicos (ácido sulfúrico 0.009N y ácido clorhídrico 0.001N, respectivamente), la detección se realiza con un detector de UV variable, el cual se fija entre 220 y 275 nm para las muestras lácticas y a 210 nm para los jugos. Los ácidos determinados en los productos lácteos son: ácido orótico, cítrico, pirúvico, úrico, fórmico, propiónico y butírico; los porcentajes de recuperación son mayores de 90% a excepción del ácido butírico que es del 86%; los mínimos detectables varían de 0.1 a 22 μ -g/g para los diferentes ácidos.

En los jugos de frutas los ácidos determinados son: cis-aconítico, α -cetoglutarico, oxaloacético, cítrico, isocítrico, L-málico, fumárico y succínico; las concentraciones mínimas detectables son de 21, 1, 2, 15, 20, 15, 21 y 30 ppm, respectivamente.

Tangendjaja et. al. emplearon una técnica diferente, con columna de fase inversa (μ Bondapac C₁₈) y fase móvil compuesta por acetato de sodio 0.005M. El detector puede ser de UV a 254nm o uno de índice de refracción.

No se reportan porcentajes de recuperación o cantidades mínimas detectables.

3.7 Colorantes

Incuestionablemente, el color es un constituyente vital de los alimentos. Es probablemente una de las primeras características percibidas por los sentidos y es indispensable para el consumidor moderno como un medio de identificación rápida y aceptación

final del alimento. Casi todos los alimentos, desde los productos agrícolas naturales hasta los procesados, tienen un color asociado a la aceptabilidad del consumidor en base de su naturaleza social, geográfica, étnica e histórica. Desviaciones de estos patrones provocan generalmente consecuencias drásticas.

Desde el punto de vista de manufactura de alimentos, los colorantes son indispensables. Tintes y pigmentos son empleados para crear nuevos productos y para modificar el color de productos ya establecidos, que muestran pérdida de éstos como resultado de procesamiento y/o almacenamiento.

Para apoyar este trabajo, el fabricante puede escoger de una variedad de tintes y pigmentos comprendidos en dos clases, los colores certificados y los no certificados. Los tintes y lacas autorizados son de manufactura sintética, los cuales deben cumplir con estrictas especificaciones gubernamentales, mientras que los no certificados son generalmente sustancias naturales derivados. Las dos clases son controladas por la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

3.7.1 Colorantes Naturales.

En los últimos años han tomado suma importancia los colorantes naturales, esto debido principalmente a la prohibición que han sufrido una cantidad de colorantes sintéticos, ya que en estudios publicados, se cuestiona la seguridad de algunos de estos.

La extracción de los colorantes a partir de sus fuentes naturales requiere de un control de calidad, tanto para cuantificar el pigmento extraído como la identificación de productos secunda

-rios; por estas razones se han desarrollado diversas técnicas de HPLC para complementar o sustituir los métodos ya existentes. Metodología.

Entre los extractos (pigmentos) que se encuentran actualmente bajo desarrollo, están los del betabel, como alternativa a ciertos colorantes sintéticos rojos.

Vincent y Scholz (1) determinaron betacianinas y betaxantinas, y Schwartz y Von Elbe (2) solo betacianinas, ambos en betabeles.

Preparación de muestras. Para identificar solo los pigmentos se filtra el jugo de betabel a través de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$.

Para cuantificar las muestras, los dos utilizaron la técnica de Adamson y Von Elbe. Primero se cromatografía en una columna de Sephadex G-25 o similar, con ácido acético al 1% como fase móvil, la fracción de betacianinas se seca a congelación; el residuo se disuelve en un volumen mínimo de agua, las muestras obtenidas de betadina y betanina se recristalizan con ácido clorhídrico al 0.1% para su purificación.

Cromatografía. Schwartz y Von Elbe emplean un sistema preparativo antes del analítico, el que consta de una columna μ Bondapak C_{18} /Porasil B, con una fase móvil de metanol- KH_2PO_4 0.05 M-ácido acético (17.8:81.2:1.0), ajustando su pH a 2.75 con ácido fosfórico; el detector de UV se fija a 254nm. El sistema analítico está compuesto por una columna Bondapak C_{18} ; se pueden utilizar dos tipos de fase móvil, una isocrática y otra de gradiente,

la primera compuesta por metanol-KH₂PO₄ 0.05M (18:82) ajustando el pH a 2.75 con ácido fosfórico (solvente A); para el gradiente, los solventes se emplean de la siguiente forma, inicial, -- 100% de A, final, 80% del solvente A y 20% del solvente B (metanol). El sistema de gradiente es más rápido; el detector utilizado en los dos sistemas es de longitud de onda variable operado a 535 nm. El método resulta cuantitativamente preciso, sin interferencia de otros compuestos.

Vincent y Scholtz también emplean dos diferentes sistemas de elusión, pero con otros solventes, la fase isocrática está compuesta por agua-metanol (90:10) con fosfato de tetrabutil amonio (PIC A) 0.005M; el sistema de gradiente consta de un solvente A, PIC A 0.005M en agua y un solvente B, PIC B (ácido heptano sulfónico) 0.005M en metanol, la concentración inicial es 90% de A/10% de B, y la final es 70% de A/30% de B.

La columna empleada es de fase inversa (Bondapak C₁₈); el detector es de longitud de onda variable UV-visible a 476 y/o - 538nm.

El porcentaje de recuperación de la betaína, el compuesto en mayor concentración, responsable del color, es de 94 a 99%.

Otros pigmentos que han sido investigados son las antocianinas; Camire y Clydesdale (3) reportaron la determinación de las 4 principales antocianinas (cianidin-3-galactosido, peonidin-3-galactosido, cianidin-3-arabinosido y peonidin-3-arabinosido) en arándano.

Preparación de muestras. El jugo de cocktail de arándano se

purifica en una columna de intercambio iónico (Amberlite GC-50), para eliminar carbohidratos y ácidos orgánicos.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (ODS); una fase móvil de metanol-ácido acético-agua (37:10:15); el detector es de UV fijo a 280nm. La técnica es cuantitativa y rápida.

Wulf y Nagel (5) determinaron ácidos fenólicos y flavonoides en uvas; los constituyentes fenólicos (ácido gálico, ácido protocatequico, ácido p-hidroxibenzoico, catequina, ácido cafeico, ácido salicílico, ácido cloragénico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico y ácido cinámico) de las uvas son los responsables del color, astringencia y amargura del vino. Debido a que el tiempo de almacenaje es largo, muchos compuestos fenólicos sufren cambios químicos durante el añejado, que modifica las características del vino y determina la calidad final del producto.

Preparación de muestras. Solo se utilizan muestras estándar.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (4Bonda pak C₁₈); la fase móvil para la determinación de los compuestos fenólicos, es agua-ácido acético (95:5), y para los flavonoides (naringina, hesperidina, eriodictiol, rutina, miricetina, quercitrina, narigenina, morina, cuercetina y luteolina) la fase móvil es de agua-ácido acético-metanol (65:5:30); el detector es de UV fijo a 254 y 280nm.

La técnica: ofrece selectividad, rapidez y sensibilidad (mínimo detectable menor de 50 ng) superior a la que ofrecen las técnicas clásicas, tales como la cromatografía en papel.

3.7.2 Colorantes Sintéticos

Los colorantes sintéticos son adicionados a los alimentos para suplir el color natural perdido durante el procesamiento, para dar una mayor uniformidad entre lote y lote y para elaborar productos atractivos al consumidor, donde no existe color natural. Los aditivos alimentarios en general, y los colorantes en particular, han sido investigados para evaluar la seguridad de su uso. De información toxicológica y niveles de no-efecto, se han establecido valores de consumo diario para un número de colorantes. Debido a la descomposición que sufren algunos colorantes durante el proceso y almacenaje, métodos cuantitativos de análisis para determinar la naturaleza y cantidad de colorante presente en un alimento a consumirse son esenciales para establecer los niveles de consumo diario de estos colorantes.

Metodología.

Entre las técnicas generales para determinar colorantes sintéticos se encuentra la de Chudy et al. (5) y la de Boley et al. (6), la primera no se aplica directamente sobre los alimentos, sino sobre una mezcla de colorantes, la segunda, considerándola más completa, se describe a continuación (las dos técnicas emplean el mismo tipo de columna).

Preparación de muestras. Muestras acuosas y alimentos solubles en agua; una muestra de alimento se disuelve en agua, se pasa a través de una columna de poliamida, lavando con agua y acetona. Se eluyen los colores con un volumen mínimo de una solución de acetona-agua-amonio (40:9:1), el eluyente se evapora

a baño María y el residuo se disuelve en un mililitro de agua (o 1 ml de fase móvil, si se encuentra presente Eritrosina BS o Café FK). Alimentos insolubles en agua; la muestra se muele con -- una cantidad similar de Celita y de ácido clorhídrico 0.1N, se -- pasa a un embudo Buchner, se le adiciona cloroformo, se agita y deja reposar, se filtra y desecha el filtrado, una solución resina-in-butanol (Amberlita LA-2 en butanol-1-ol, 5% v/v) es mezclada y filtrada, la extracción se repite, los extractos son lavados con una solución de cloruro de sodio al 3% (omite el lavado cuando café FK), la fase acuosa es eliminada. Se adiciona heptano, solución de amonio y una solución de cloruro de sodio-amonio; se agita vigorosamente y deja reposar, separando la fase acuosa, la extracción se repite pero solo con la solución de cloruro de sodio-amonio; los extractos acuosos son lavados con éter dietílico. El amonio es eliminado con un baño caliente y aire. Se neutraliza con ácido acético; si hay Eritrosina BS, la neutralización se efectúa antes de la eliminación de amonio. La solución es pasada por una columna de poliamida, y se prosigue como el procedimiento anterior. Muestras en las que se observa una extracción incompleta. Solo es agregado un paso enzimático al procedimiento anterior.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (SAS-Hypersil); la fase móvil es de metanol-agua-cetrimida a diferentes relaciones (77ml+23ml+0.25g; 80+20+0.25 y 75+25+0.25); el detector empleado es un espectrofotómetro fijado a diferentes longitudes de onda, a 480nm para naranja/café, 430nm para amarillo

-llo, 640nm para verde/azul y 600nm para negro. Los colorantes determinados son: rojo allura AC, Rojo 2G, Carmosina, Amaranto, Eritrosina BS, Ponceau 4R, Pon-eau SX, Ponceau 6R, Amarillo sunset FCF, Naranja RN, Naranja GGN, Naranja G, Tartrazina, Amarillo Quinolina, Amarillo 2G, Verde S, Azul Patente V, Azul Brillante FCF, Indigo Carmina, Verde Rápido FCF, Negro PN, Café FK y Café Chocolate HT.

El método tiene un límite de detección de 1 mg/Kg y la recuperación para la mayoría de los colorantes es de 80% o más.

La determinación de intermediarios y colores subsidiarios, ha tomado importancia en el control de los colorantes.

Cox (7) y Marmion (8) determinan los intermediarios del Amarillo FD&C No. 6. Los dos métodos han sido considerados como primera acción oficial por el AOAC..Cox determina la presencia de ácido sulfanílico, sal de Schaeffers, ácido 4,4'-(Diazoamino)-dibencensulfónico y 6,6' -oxy bis (ácido 2-naftalensulfónico); mientras Marmion solo determina el ácido 4,4' -(diazoamino) dibencensulfónico. Las técnicas son muy similares (columna, fase móvil y detector), por lo que se describe solo una de las técnicas (Cox).

Preparación de muestra. La muestra es disuelta en agua, se adiciona $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1M y diluye con agua.

Cromatografía. Se emplea una columna de intercambio aniónico (Zipax SAX); La elución es de gradiente, con un solvente primario compuesto por $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.01M y NaClO_4 0.2M en $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.01 M como eluyente secundario; el detector es de multionada operado a 254nm y de 325 a 385 nm.

Los porcentajes de recuperación son de 85 a 108% para los diferentes intermediarios.

Bailey y Cox (7) determinan 4,4' -(diazamino)-bis(ácido 5 - metoxi, 2-metilbencensulfónico) en el colorante Rojo FD&C No. 40.

Preparación de la muestra. La muestra se disuelve en agua destilada.

Cromatografía. Se emplea una columna de fuerte intercambio iónico (Dupont SAX); la fase móvil es de gradiente, el solvente primario es borato de sodio 0.01M y el secundario es perclorato de sodio 0.25M mas borato de sodio 0.01M, el gradiente en su fase inicial es 100% del solvente primario y la rapidez de cambio es de 4%/minuto; el detector es de multi-longitud de onda operado de 325 a 385nm.

Los porcentajes de recuperación están en un rango de 98-102%.

Singh (10) determinó los intermediarios del Rojo No. 2 (Amaranto), ácido naftiónico, ácido 2-naftol-3,6,8-trisulfónico, ácido 2-naftol 3,6-disulfónico y el ácido 2-naftol 6,8-disulfónico.

Preparación de muestras. Las muestras se disuelven al 1% en borato de sodio 0.01M.

Cromatografía. La columna es de intercambio aniónico fuerte (Dupont SAX); la fase móvil es un gradiente, como solvente primario se emplea borato de sodio 0.01M y borato de sodio 0.01M + perclorato de sodio 2M en agua, como solvente secundario. La variación del solvente secundario es de 0-100% a una rapidez de 5%/minuto.

Los porcentajes de recuperación están entre 92 y 103 para los diferentes intermediarios.

Singh (11) también determinó los intermediarios y colores subsidiarios del Naranja B, ácido naftiónico, ácido fenil hidrazin p-sulfónico, pirazolona T y un ester etílico de pirazolona T, ácido 3-((4-sulfo-1-naftalenil)-azo)4-amino-1-naftalensulfónico y Naranja K.

Cromatografía. Se emplea una columna de fuerte intercambio aniónico (SAX); la fase móvil es un gradiente, se establece de una concentración de 0 a 100% de solvente secundario a una rapidez de 4%/minuto, siendo el solvente primario borato de sodio - 0.01M y el secundario, borato de sodio 0.01M + perclorato de sodio 0.2M; el detector es de multi-longitud de onda, operado de 325 a 385nm.

Los porcentajes de recuperación son de 95 a 103%, a excepción del ácido fenilhidrazin p-sulfónico que es de 95 a 140%.

Jones et al. (12) separó los componentes del Café FK, 1,3-diamino-2,4-(p-sulfofenilazo) benceno, 1,3-diamino-4,6-bis(p-sulfofenilazo) benceno, 2,4-diamino-5-(sulfofenilazo) tolueno, 2,4-diamino-3,5-bis (p-sulfofenilazo) tolueno, 1,3-diamino-3,4-bis(p-sulfofenilazo) benceno y 1,3-diamino-2,4,6-tris(p-sulfofenilazo) benceno y los componentes no colorantes, ácido sulfanilico, m-fenilendiamina, 2,4-diaminotolueno.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Lichrosorb Si 100), con 21% de fase octadecil; la fase móvil es un gradiente, se establece de 5 a 40% acetonitrilo en agua, ésta contiene 1.2g/l de fosfato monobásico de sodio y 2.4g/l de fos-

-fato dibásico de sodio; el detector es de UV fijo a 254nm.

Bailey (13). determinó los intermediarios y colorantes subsidiarios del Azul No. 2.

Preparación de muestras. Las muestras de ácido isatin-5-sulfónico y 5-sulfoíndigo se diluyen en agua a una concentración de 0.5% y a 0.1% el 5,7'-sulfoíndigo.

Cromatografía. La columna empleada es 5µm ultraesfera ODS (Altex); la fase móvil es un gradiente, con un solvente A de acetato de amonio al 1.5% m/v-acetonitrilo al 0.5% en agua y un solvente B de acetato de amonio al 1.5%-agua al 50% en acetonitrilo; el gradiente se establece de 0 a 60% de B en A en 25 minutos y de 0% de B en A a los 30 minutos, manteniéndose por 10 minutos; el detector es de longitud de onda variable fijo a 254nm.

Los porcentajes de recuperación varían entre 80.5 y 122%.

3.8 Compuestos de Sabor y Aroma

Al igual que el color, los componentes del sabor y aroma son factor importante para la aceptación de los productos alimenticios.

Las técnicas de análisis servirán tanto en el control de calidad, como en la investigación para el desarrollo de sabores y aromas sintéticos. Las ventajas de la HPLC sobre las técnicas comúnmente utilizadas, cromatografía gas-líquido y de gases, es que con ésta se pueden analizar compuestos no volátiles o poco estables.

Debido a la gran cantidad de artículos publicados y a la ha-

terogenidad de los compuestos analizados, sólo se describirán algunas de las técnicas y se mencionarán las referencias de la mayoría de las restantes.

Metodología.

Los aldehidos y cetonas son por lo general constituyentes característicos de varios aromas. Su concentración varía grandemente en frutas y vegetales. El método comúnmente empleado para determinar trazas de estos componentes es la formación de derivados del 2,4-dinitrofenilhidrazona y la utilización de columnas de fase inversa.

Selim (1) describe un método cuantitativo de conversión de aldehidos y cetonas a sus derivados 2,4-dinitrofenilhidrazona, esto a temperatura ambiente. La cuantificación se puede realizar en dos sistemas diferentes; en el primero se emplea una columna empacada con sílica (4Porasil); una fase móvil de acetato de etilo-hexano (1:49); el segundo sistema emplea una columna de fase inversa (4Bondapak C₁₈); y una fase móvil de acetonitrilo-agua, siendo éste el más efectivo. La relación de acetonitrilo-agua de la fase móvil varía con respecto al número de carbonos, una relación (3:2) para aldehidos y cetonas de C₁-C₅, de (3:1) para C₈-C₁₀, para aromáticos (tolualdehido, salicilaldehido) de (13:7); el detector es de UV fijo a 336nm.

Vigh Gy et al. (2) analizaron aldehidos saturados C₁C₁₂, cetonas saturadas C₃-C₁₁, cetonas simétricas saturadas C₃-C₈, y aldehidos de cadena lineal monoinsaturados C₃-C₈.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Nucleosil C₁₈); la fase móvil es metanol al 78.4%; el detector es

de longitud de onda variable UV fijo a 360nm.

Fisher y Wheaton (3) determinaron naringina y rutinosid naringenina en jugo de toronja. La naringina es el principal componente del amargor, y debido a que la amargura es el principal impedimento para un mercado provechoso de productos de toronja, un método más selectivo y eficiente era necesario.

Preparación de muestras. Las muestras de jugo solo necesitan filtrarse.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Mondapak C₁₈); la fase móvil se constituye con agua-acetonitrilo (80:20); el detector es de UV-visible fijo a 280nm.

Los porcentajes de recuperación son de 100±10%, el rango de naringina encontrado es de 390-400 ppm.

Williams y Slavin (4) determinaron metil antranilato en bebidas de uva (principal saborizante en bebidas de uva concord).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (ODS -- Sil-X-1); la fase móvil está compuesta por acetonitrilo al 3% en agua, regulado el pH a 6 con una solución de fosfatos; se utilizan dos tipos de detectores, uno de fluorescencia a una excitación de 330nm y emisión de 430nm y otro de longitud de onda variable UV a 217nm.

El mínimo detectable es de 0.03 µg/ml.

Hoefler y Coggon (5) determinaron los constituyentes del té (flavonoles y teaflavinas).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Mondapak C₁₈); tres diferentes fases móvil son utilizadas, ácido acético-acetona-agua (1:60:139), solución reguladora de citrato-50%

-fato 0.02M, pH 4.5 y metanol-citrato-fosfato 0.01M pH 7.0 --
(20:80); el detector es de UV con filtros de 254, 280 y 365nm.

Walter et al. (6) determinaron los fenoles del camote (ácido cloragénico, ácido isocloragénico, ácido 4-O-cafeoilquínico y ácido neocloragénico).

Cromatografía. Se emplea una precolumna y una columna de fase inversa (Co: Pell ODS y Bondapak C₁₈, respectivamente); la fase móvil está compuesta por metanol-solución reguladora de fosfatos 0.033M, pH 3.0 (3:2); el detector es de UV fijo a 313nm.

Lee y Chang (7) separaron compuestos de sabor y olor poco volátiles en carne cocida (undecano, butil acetato, alcohol nonilo 3-heptanona, 3-decanona, butilbenceno, γ -valerolactona y fenil éter.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (SIL-X); la fase móvil es un gradiente, compuesto por hexano y cloroformo; el detector es de UV fijo a 254nm.

Fisher y Trama (8) determinaron coumarinas y psoralenos en aceites de cítricos sin cáscara, éste se extrae hipodérmicamente.

Cromatografía. Se emplean dos tipos de columnas y eluyentes diferentes; una columna Porasil de 10 μ m, con una fase móvil compuesta por heptano-acetato de etilo a tres concentraciones (90:10), (95:5) y (80:20); el otro sistema está compuesto por una columna CN Dupont, el eluyente es agua-acetonitrilo a tres diferentes relaciones (65:35), (70:30) y (75:25); el detector es de UV-visible operado a 320 y 305nm.

Ross (9) analizó aceites de canela para determinar la presencia de cinamoaldehído, eugenol, benzaldehído, acetato de cinami-

-lo y alcohol cinamflico.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con Corasil II; -- la fase móvil es una elución de gradiente, compuesta por ciclohexano como solvente A y por acetato de etilo como solvente B; el detector es un espectrofotómetro fijo a 260nm.

Galetto et al. (10) determinó piperina, principal compuesto del sabor picante de la pimienta negra.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con Porasil A de 37-75 μ m; la fase móvil es sólo cloroformo grado reactivo; - el detector es de UV fijo a 254nm.

Los porcentajes de recuperación son de 98.9 a 99.7% para pimienta entera y de 96.3 a 101.5% en oleoresina.

Lund (11) analizó aceite de semilla de apio para determinar ptalaidas (sedanénolide y 3-n-butil ptalaida) compuestos responsables del sabor, en combinación con β -selinena.

Cromatografía. Se emplea una columna polar, fase ligada a un grupo hidróxilo (Durapak-Carbowax 400/Corasil); la fase móvil es hexano-isopropanol al 0.1%; el detector es de UV fijo a 254-nm.

Beasley et al. (12) determinaron los componentes más importantes del regáliz (glicirrizinato de amonio y ácido glicirretínico), el extracto es un producto comercialmente importante en la industria del tabaco, alimentos y farmacéutica.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (C₁₈-Corasil); la fase móvil es un gradiente, el eluyente primario es ácido fórmico al 2% en agua y el secundario es acetonitrilo, que pasa de 0 a 60% en 40 minutos; el detector es de UV fijo a 254nm.

Ballean y Dadic (13), Charalambous (14), Charalambous et al.

(15,16) y Palamand y Aldenhoff (17), realizaron la determinación de humulonas y lupulonas (responsables de la calidad final de la cerveza) y otros compuestos del sabor, en granos, mosto y cerveza.

3.9 Contaminantes y Productos de Descomposición.

De gran importancia en los alimentos, es la determinación de compuestos nocivos a la salud. Para poder llevar un control adecuado de estos compuestos, es necesario contar con técnicas de análisis confiables, que proporcionen la rapidez, precisión y sensibilidad deseada. La HPLC es la técnica que da una opción para conseguir este propósito.

Para poder localizar con mayor facilidad las técnicas, el tema se divide en cinco grupos principales.

3.9.1 Carcinógenos

En las últimas décadas se ha demostrado el poder carcinogénico de cientos de compuestos químicos, cuando son administrados experimentalmente a animales de laboratorio. Mucha atención se ha puesto en aquellos compuestos que están en relación directa con el hombre, como es el caso de los aditivos alimentarios y contaminantes que han sido introducidos al ambiente, intencional o accidentalmente como resultado de la actividad humana.

Nitrosaminas. Recientes avances en carcinogénesis ambiental han demostrado que los compuestos N-nitrosos son una clase importante de carcinógenos químicos los cuales dan lugar a una gran variedad de tumores en muchos animales. Estos compuestos se pueden formar in vitro por la reacción de nitrito con una amina secundaria o terciaria, e in vivo, en el estómago o intestino delgado de animales de experimentación que han ingerido en su dieta,

nitritos y las aminas precursoras. Algunas nitrosaminas carcinógenas han sido determinadas en heces de humanos (normales); indicando que se produjeron endogenamente en el tracto intestinal. - Estos resultados sugieren que las aminas naturales, que se encuentran en los alimentos, juegan un papel importante en la incidencia de algunas formas de cáncer humano.

El uso de nitratos y nitritos en embutidos, la amplia distribución de las aminas en varios alimentos, hacen necesario contar con una información confiable y completa, para ver si estos compuestos constituyen un problema biológico ambiental.

La mayoría de los compuestos N-nitrosos, son derivados de -- aminas, las que debido a su inestabilidad térmica, polaridad y -- alto peso molecular, presentan dificultades para su determina-- ción por cromatografía de gases.

Metodología.

De las técnicas de HPLC con aplicación a los alimentos, se encontraron dos procedimientos generales, uno a partir de la derivación del grupo amino y el otro a través del rompimiento catalítico del grupo N-NO; el primero es utilizado generalmente en la determinación de derivados de aminas alifáticas y el segundo, básicamente en compuestos aromáticos no volátiles.

Aminas alifáticas volátiles. Jen Kun Lin et al. (1) realizó su determinación de aminas sobre pescados y mariscos.

Preparación de muestras. La muestra se mezcla y homogeniza con ácido clorhídrico 0.1N, se centrifuga y el sobrenadante es mezclado con acetona y centrifugado de nuevo; una alícuota del sobrenadante es mezclada con carbonato de sodio, cloruro y dansi

-lo y acetona, se deja reposar a temperatura ambiente y se adicion na más cloruro de dansilo y acetona, la mezcla resultante se extrae con n-hexano-n-butanol (1:1), las fases orgánicas son lavadas con agua y posteriormente deshidratadas con sulfato de sodio anhidro.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil está compuesta por etanol al 95%-acetonitrilo-agua (6:6:7); la detección se lleva a cabo por medio de un fotómetro de longitud de onda variable a 425nm.

Los porcentajes de recuperación para las aminas analizadas (metil amina, etilamina, dimetilamina, dietilamina y amoniaco) son de 94 a 98% para concentraciones de 10g/l.

Heyns et al. (2) analizó varios alimentos para determinar la presencia de dimetilamina, dietilamina, dipropilamina, iso-dibutilamina, pirrolidina y piperidina.

Preparación de muestras. La derivación de las muestras es con 5-dimetilamino naftalen sulfonoamida (DANS).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18} /Corasil).

La fase móvil está compuesta por agua-acetonitrilo (1:1); el detector es un espectrofotómetro UV fijo a 254nm.

El mínimo detectable es de 10ng; pero éste puede ser reducido con el empleo de un fluorómetro.

Aminas no-volátiles. Fine et al. (3) analizaron diversos alimentos (tocino, licores y productos cárnicos) para determinar la presencia de N-nitrosaminas; empleando una nueva técnica llamada análisis de energía térmica (TEA), el que se basa en el rompimiento catalítico del enlace N-NO y la subsecuente detección del radical -

nitrosil.

Preparación de muestras. Las muestras líquidas se extraen -- con diclorometano, deshidratadas con sulfato de sodio, filtradas y lavando el sulfato, los filtrados son secados a vacío y disueltos los residuos con una pequeña cantidad de diclorometano. Para muestras sólidas (tejidos de pescado sin grasa), se congelan con nitrógeno líquido y se forma una pasta, el nitrógeno es evaporado, formándose un polvo fino al que se adiciona sulfato de sodio anhidro y diclorometano. Se mezcla, lava y filtra y el residuo - es lavado con diclorometano, éste se concentra y el solvente sobrante es eliminado con nitrógeno. Para muestras sólidas con alto contenido de grasas (tocino y carnes) se mezclan con nitrógeno líquido, agregando posteriormente acetonitrilo y nitrógeno líquido, por partes; se adiciona sulfato de sodio anhidro en polvo, filtrando sobre gránulos de sulfato de sodio anhidro, la masa es lavada con acetonitrilo y a su vez éste es lavado con 2,2,4-trimetil pentano, los extractos de acetonitrilo son evaporados a vacío y disuelto el residuo en diclorometano; éste también es evaporado pero con una corriente de nitrógeno.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con μ Porasil; la fase móvil está compuesta por acetona de 1 al 5% en 2,2,4-trimetil pentano; la detección es con un analizador de energía termal, específico para compuestos N-nitrosos, equipado con una interfase TEA-HPLC; se obtienen cromatogramas paralelos de UV y TEA al conectar en serie un detector UV a 254nm y un TEA. Los componentes analizados son: N-nitroso carbaril y N-nitroso carbazol.

Los porcentajes de recuperación varían de 50 a 90%, para una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Wolfram et al. (4) desarrollaron un método para determinar una nitrosamina no volátil, la nitrosoprolina; se ha encontrado que al someter este compuesto a temperaturas altas, da como producto la nitrosopirrolidina, que es carcinogénica a varias especies de animales. La aplicación más lógica de esta técnica sería sobre tocino o sus derivados, ya que se han determinado N-nitrosoprolinas sobre estos productos, además de que la temperatura de freído del tocino es casi igual a la necesaria para pasar de N-nitrosoprolinas a N-nitrosopirrolidinas.

Preparación de muestras. La técnica está basada principalmente en la desnitración y derivación de la N-nitrosoprolina (NPro).

Desnitración. El extracto de NPro es evaporado al vacío, se le adiciona ácido acético glacial conteniendo ácido bromhídrico al 15%, calentando a baño maría (50°C por 30 minutos) y agregando agua destilada, se evapora al vacío; la muestra ya desnitrada es sometida a derivación; el residuo se hace reaccionar con 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), agua destilada y se satura con carbonato de sodio, calentando a baño maría (50°C, 30 minutos).

Cromatografía. La columna es una MicroPak Lichrosorb Si 60-10; la fase móvil está compuesta por n-hexano-acetato de etilo-ácido acético (50:50:0.5); el detector es de fluorescencia a una excitación de 465nm y 520nm para la emisión.

El mínimo detectable es de 0.0035 nmoles de NBD-prolina, que corresponde a 0.5ng de NPro.

Hidrocarburos aromáticos y polinucleares (PAH). Los PAH son compuestos de una biodegradabilidad lenta, muchos de ellos son considerados carcinógenos, por lo que su presencia es un peligro para la salud. Una de las principales fuentes de estos compuestos, es el petróleo, y debido a la contaminación existente en los mares, es necesario analizar los productos marinos, principalmente los mariscos. La FDA del distrito de Dallas, Texas, ha realizado varias investigaciones sobre la presencia de estos carcinógenos en mariscos.

Hanus et al. (6,7) determinaron en mariscos la presencia de los PAH (fluoranteno, pireno, trifenileno, criseno, benzo(a) antraceno, benzo(e) pireno, perileno, benzo(b) fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, Benzo(a) pireno, dibenzo(ah) antraceno, benzo(ghi) perileno y coroneno) en mariscos.

Preparación de muestras. La muestra es homogenizada con 300ml de acetonitrilo, se mezcla con una solución de acetato de sodio y se filtra, el filtrado es extraído con éter de petróleo, agua y una solución saturada de cloruro de potasio, la fase acuosa es extraída en otro embudo de separación con éter de petróleo, la fase oleosa se pasa a través de sulfato de sodio, lavando con éter de petróleo, éste es evaporado a baño maría, el éter sobrante se evapora con nitrógeno. El residuo es disuelto en alcohol USP y saponificado con hidróxido de potasio, posteriormente es lavado con alcohol USP y agua, y se agrega una solución saturada de cloruro de potasio; la solución se extrae dos veces con éter de petróleo, las fases oleosas se pasan por sulfato de sodio y se concentra a baño maría, el concentrado es pasado por una co--

-lumna de sílica gel y sulfato de sodio; la elución es realizada primeramente con éter de petróleo, seguido por acetonitrilo-éter de petróleo (1:99), los solventes son evaporados y el residuo disuelto en tolueno, éste se somete a cromatografía de permeabilidad en gel (GPC), utilizando dos columnas de μ Styragel conectadas en serie y un espectrofotómetro a 300nm. Las muestras obtenidas son evaporadas y redisueltas en acetonitrilo-tolueno (95:5).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil es una elución de gradiente, con el siguiente sistema de eluyentes, solvente A, metanol al 50% en agua, solvente B, acetonitrilo, el solvente B pasa de 40% de la fase inicial a un 80% en 90 minutos; se utilizan un espectrofotómetro y un detector de UV fijo a 254nm.

El mínimo detectable es de 2 μ g/Kg, con porcentajes de recuperación mayores de 80%.

Guerrero et al. (5) determinaron benzo(a) pireno y benzo(ghi)perileno en mariscos. Utilizan el mismo método de extracción y cromatografía analítica que el anterior, pero eliminan el paso de la cromatografía de permeabilidad en gel. Sus porcentajes de recuperación son de 104%.

Nakagawa et al. (8) analizó aceite de parafina (aditivo alimentario) para determinar la presencia de benzo(a) pireno.

Preparación de la muestra. La muestra es disuelta en n-hexano y extraída con sulfato de metilo, se adiciona agua y extrae con hexano, finalmente el solvente es evaporado.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil está compuesta por acetonitrilo-agua (5:5);

el detector es un fluorómetro con una excitación a 366nm y una emisión a 406nm:

El porcentaje de recuperación es de 94%, con un mínimo detectable de 50×10^{-12} partes en aceite de parafina.

3.9.2 Drogas Residuales.

La importancia del análisis de drogas residuales radica en -- que existen ocasiones en las cuales los animales que han sido tra-tados médicamente ante alguna enfermedad, son sacrificados en cu-anto están sanos o los productos que éstos proporcionan son enviados al mercado, sin dar tiempo a que se eliminen los medicamentos; el caso más común es la leche, en la cual se pueden encontrar dife-ren-tes tipos de drogas, las que pueden ocasionar problemas a corto o largo plazo en los consumidores.

A continuación se dan una serie de drogas residuales que han sido encontradas y cuantificadas en diferentes productos.

Cloranfenicol. Es un antibiótico utilizado comúnmente en el trata-
miento de infecciones en vacas, generalmente en la mastitis; está
demostrado que después de inyectar parenteralmente el cloranfeni-
col pasa de la sangre a la leche, y se elimina gradualmente de la
leche por vía mamaria.

Un tipo de daño medular de los huesos de humanos ha sido rela-
cionado con los tratamientos de cloranfenicol en individuos suscep-
tibles. La falta de un método lo suficientemente sensible y especí-
fico, dio como resultado el desarrollo de una técnica de HPLC.

Metodología.

Wall et al. (9) desarrollaron una técnica para determinar la pre-
sencia de cloranfenicol en leche.

Preparación de muestras. La muestra se extrae con acetato de etilo, se evapora, el residuo es disuelto en acetonitrilo y extraído con isooctano para eliminar los lípidos; la fase de acetonitrilo se concentra (a sequedad) y transfiere a un matraz con acetato de etilo, el solvente es evaporado con nitrógeno y el residuo disuelto en cloroformo, finalmente se le adiciona una solución de propilén glicol-agua (50:50).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (C₁₈ -- Spherisorb ODS); la fase móvil es agua metanol (70:30), el detector es un fotómetro UV a 0.01 AUFS (unidades de absorción escala total).

Los porcentajes de recuperación varían entre 72 y 99.5% dependiendo de la cantidad de cloranfenicol inyectada, el mínimo detectable es de 5 µg/Kg. Se observó que 32 horas después de haber inyectado una vaca por última vez, no hubo detección del antibiótico. Nitrofurazona. El uso de compuestos del 5-nitrofurano en medicamentos veterinarios para el tratamiento de mastitis, puede dar como resultado la contaminación con niveles bajos de esta droga; McCalla (10) en una revisión realizada, reporta los efectos biológicos adversos provocados por los nitrofuranos, tales como, carcinogénesis, mutagénesis y toxicidad. Debido a que la leche es una importante parte de la dieta de lactantes y niños, el empleo de esta droga ha sido prohibido en muchos países, pero no en todos, de ahí la necesidad de un método sensible y preciso.

Metodología.

Vilim et al. (11) desarrollaron un método para determinar nitrofurazona en suero de leche.

Preparación de muestras. La muestra de suero es mezclada con ácido clorhídrico 0.25N, cloruro de sodio y acetato de etilo, en un agitador rotatorio, se centrifuga y la capa de acetato de etilo es separada y filtrada en carbonato de sodio y fibra de vidrio; se repite la extracción con acetato de etilo, el solvente se evapora a una temperatura de 50°C para evitar la descomposición de la nitrofurazona, el residuo se disuelve en la fase móvil.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C₁₈); la fase móvil es metanol-agua (30:70); el detector es de UV fijo a 365nm.

El mínimo detectable es de 5 μ g/Kg, y los porcentajes de recuperación son de 57 a 67%, los valores bajos son debido principalmente a las uniones de las proteínas.

Dexametasona. Es un corticosteroide utilizado en el tratamiento de citosis en animales productores de leche. En los humanos su empleo es como antiinflamatorio; teniendo efecto sobre el metabolismo de carbohidratos (aumenta la gluconeogénesis). A pesar de que ha sido utilizada durante varios años, no existe un método disponible para determinar niveles residuales de dexametasona en leche; por lo que se han aprovechado las cualidades de la HPLC para desarrollar una técnica rápida y sensible, que ayude principalmente a conocer el tiempo necesario para que la droga sea eliminada.

Metodología.

Anneli et al. (12) y Mollica (13) determinaron dexametasona en leche y crema, respectivamente; no encontrando una diferencia marcada en los resultados obtenidos por ambas técnicas, se escogió el método del primero, debido a la importancia de la muestra a nivel de

consumo, además de que la crema es un producto derivado de la leche.

Preparación de la muestra. La muestra es adicionada de sulfato de sodio anhidro granulado y extraída con acetato de etilo, éste se evapora y el residuo es disuelto con acetonitrilo y extraído con hexano para eliminar lípidos, el acetonitrilo es concentrado hasta sequedad y el residuo disuelto en metanol conteniendo triancinolona acetona.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Partisil ODS); la fase móvil está compuesta por agua-acetonitrilo (77:23); el detector es un fotómetro UV a 0.04 AUFS.

El mínimo detectable es de 5 µg/Kg, con un mínimo cuantificable a 20 µg/Kg, los porcentajes de recuperación están en un rango de 72 a 94%.

No se detectó dexametasona en la leche de las vacas utilizadas en esta investigación, ni en la primera, ni en la última ordeña seis días después.

Fenotiazina. Es una droga empleada como antihelmíntico, para la eliminación de parásitos que son resistentes a otros antihelmínticos, especialmente bencimidazol. Los animales que han sido tratados con esta droga, pueden contener residuos en sus tejidos, por lo que su determinación es necesaria. Los métodos comúnmente utilizados, emplean técnicas colorimétricas, las que tienen procedimientos de extracción dificultosos, y una sensibilidad deficiente. La HPLC proporciona un método simple y sensible.

Metodología.

Blackman et al. (14) determinaron en riñones, hígado, músculo

y grasa de guajolote la presencia de fenotiazina.

Preparación de la muestra. La muestra se homogeniza con metanol, se centrifuga, y una parte del sobrenadante es evaporada y mezclada con ciclohexano y nuevamente es centrifugada.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada por Partisil-10, una precolumna de protección es utilizada, empacada con partículas peliculares de 30 μ m; la fase móvil es n-propanol al 0.3% en ciclohexano; el detector es de UV-visible fijo a 254nm.

Los porcentajes de recuperación son de 70 a 87%; cuando se adiciona 1 ppm de fenotiazina, el mínimo detectable es de 0.05 ppm.

La fenotiazina tiene un período de retención menor que los demás antihelmínticos. Se recomienda un tiempo de 120 horas después del tratamiento con la droga para que el animal sea sacrificado.

Furazolidona. Es empleada como factor de crecimiento en guajolotes, para prevenir cólera de aves, coccidiosis, tratamientos de enteritis porcina y mastitis en vacas. No existe en la literatura métodos para determinar niveles bajos de furazolidona. La prueba espectrofotométrica sólo detecta hasta 0.2 μ g/ml. Otro método empleado es en el que se realiza una conversión de los residuos del 5-nitrofurano a 5-nitro-2-furaldehído y se analiza por cromatografía de gases, este método resulta inespecífico.

Metodología.

Hoener et al. (15) desarrollaron una técnica para determinar nitrofurazona, furazolidona y nitrofurantoina en plasma, orina, leche y homogenizados de hígado, sin necesidad de extracción o derivación, con lo que detectan hasta 20 ng/ml.

Hoener et al (16) publican posteriormente una modificación -

de la técnica anterior, con el cual aumentan el poder de sensibilidad, hasta 2 ng/ml.

Preparación de la muestra. Una muestra congelada es mezclada con soluciones frías de nitrofurantoina y furazolidona, se tritura y decanta a un tubo de centrifugación, lavando con agua fría - redestilada y centrifugando, el sobrenadante se evapora hasta 0.5 ml y se filtra. Para niveles bajos de droga, se redisuelve en metanol-acetato de sodio (20:80) y se filtra.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil está compuesta por metanol-acetato de sodio 0.01M pH 5 (20:80); el detector es de absorción UV fijo a 365nm.

Los porcentajes de recuperación a niveles de 2-40 ng/ml son de $104.8 \pm 11.5\%$ y el mínimo detectable de 2 ng/ml.

3.9.3 Pesticidas, Fungicidas y Herbicidas.

La determinación de pesticidas, fungicidas y herbicidas en los alimentos, es un problema concerniente principalmente a la agricultura y no al análisis de alimentos; además de ser un tema muy extenso, debido a la gran cantidad de pesticidas existentes; a continuación sólo se dan las referencias de los artículos encontrados.

Pesticidas. De las determinaciones más completas (en cantidad de pesticidas detectados) revisadas se encuentra la de Hoodless et al. (17) en la cual realizan la separación e identificación de todos los pesticidas incluidos en la Directiva de la Comunidad Económica Europea de frutas y vegetales, que son 42. De estos 8 son organoclorados, 19 organofosforados y los restantes una mez-

-cia de carbamatos, dinitro compuestos, triazinas, compuestos -- tiol-triclorometilos, ácidos fenoxi sustituidos, fenilureas sustituidas, etc.

Krause (18) realizó la determinación de N-metilcarbamatos, 7 carbamatos (aldicarb, bufencarb, carbaril, carbofurano, meticarb, metomil y oxamil) y 4 metabolitos (sulfona aldicarb, sulfóxido - aldicarb, 3-hidroxicarbofurano y sulfóxido metiocarb) en frutas y vegetales.

Lawrence (19) determinó 8 carbamatos (swep, carbaril, zectron, mataul, mobam, enolsin, carbofurano y banol) en alimentos. Existen dos artículos más de este autor (20, 21) en el que determinó carbofurano y dos metabolitos (3-hidroxicarbofurano y 3-cetocarbofurano) en cosechas y analiza papas y maíz, para determinar la presencia de carbaril.

Fogy et al. (22) realizó la determinación de carbamatos en - frutas y verduras; además de una revisión (23) con 12 referencias sobre la misma determinación.

Lee et al. (24) analizó directamente en plantas de nabo la - presencia de carbofurano y 3-hidroxicarbofurano.

Blaiche (34) revisó los problemas relacionados con la aplica - ción rutinaria del análisis de carbamatos.

Fungicidas. Cabras (25) determinó los fungicidas, vinclozolin, - benomyo, BMC, y metiltiofanato, en muestras de uva.

Farrow (26) analizó frutas cítricas para determinar residuos de bifenil, benomyl, carbendazima, 2-fenilfenol y tiabendazol.

Norman y Fouse (27) determinaron imazolil en frutas cítricas que tenían 4 semanas de almacenaje.

Tafari et al. (28) e Isshiki et al. (29) realizaron un análisis de tiabendazol en frutas y plátanos, respectivamente.

Herbicidas. Lawrence (30) analizó muestras de col, maíz, papa, nabo y trigo para determinar residuos de herbicidas de urea (linuron, monuron, diuron, clorbromuron, flumeturon, cloruxuron y fenuron). En otro artículo del mismo autor (31), determinó la presencia de linuron, propanil, terbacil y ácido etil benzoilpropilo en varios alimentos.

Selim y Cook (32) analizaron herbicidas de dioxano en soya.

Bramlett (33) realizó su determinación en vegetales de ácido clorofenoxiacético, fenol policlorado, dinitrobutil fenol, dinitrocresol y pentacloroanisol. Debido a la gran cantidad de artículos publicados referente a este tema, solo se tomaron los más recientes.

3.9.4 Productos de Descomposición Natural o por Procesamiento.

Productos de descomposición natural. El principal uso de los análisis de productos de descomposición, es su aplicación al control de calidad de los alimentos. Las técnicas de HPLC han sido encaminadas en su mayoría a detectar descomposición en pescados y mariscos. Ya que el método comúnmente empleado para realizar esta determinación es el organoléptico, el que además de ser subjetivo, se necesita contar con gente entrenada, que pueda realizar una determinación con un relativo alto grado de exactitud.

Warthesen et al. (35) determinó hipoxantina en pescados refrigerados. La técnica comúnmente empleada para determinar el contenido de hipoxantina, como criterio de frescura, es el método enzimático, empleando la enzima xantinoxidasa, que convierte la hipox-

-xantina a xantina y eventualmente a ácido úrico, el que se mide espectrofotométricamente. En comparación de este método con el de HPLC, resulta más rápido y directo el segundo.

Preparación de la muestra. Muestras de músculo de pescado son homogenizadas con ácido tricloroacético al 7.5%, el homogenizado es filtrado y lavado 3 veces con ácido tricloroacético, el pH del extracto es ajustado entre 4 y 5 con hidróxido de sodio 0.1N, se afora con una solución reguladora de fosfato monopotásico al 4% a un pH de 4.4; la muestra se refrigera durante una semana.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μ Bondapak C_{18}); la fase móvil es una solución de fosfato monopotásico al 4% a un pH de 4.4; el detector de absorbencia se coloca a una longitud de onda de 254nm.

El porcentaje de recuperación es de $92.5 \pm 4\%$, el mínimo detectable es de 2 ng/10 μ L.

Mietz y Karmas (36,37) analizaron pescados y mariscos para determinar el contenido de histamina, cadaverina, putrecina, espermidina y espermina. Se ha encontrado que el contenido de histamina de ciertas variedades de pescado incrementa grandemente al aumentar la descomposición. Pero, los niveles de histamina varían materialmente de una especie a otra, el contenido de histamina ni siquiera es consistente en una misma especie, ya que varía de acuerdo a la manera en que se descompuso el pescado, por lo que es necesario determinar otros componentes. Se encontró que la espermidina y la espermina están distribuidas ampliamente en los sistemas biológicos y están relacionados con el factor de crecimiento de la síntesis de tejidos animales. También se encontró en

materia animal descompuesta la presencia de cadaverina y putrecina (precursores de las dos poliaminas anteriores).

Mietz y Karnas realizaron una correlación de estos compuestos y desarrollaron una fórmula para determinar el índice de frescura o descomposición de una muestra; basados en la siguiente información, al aumentar la descomposición, incrementa el contenido de histamina, cadaverina y putrecina y disminuye la cantidad de espermidina y espermina.

$$\text{Índice} = \frac{\text{ppm histamina} + \text{ppm putrecina} + \text{ppm cadaverina}}{1 + \text{ppm espermidina} + \text{ppm espermina}}$$

Preparación de la muestra. La muestra se homogeniza y extrae con ácido tricloroacético al 5%, centrifugando y decantando el sobrenadante. Una alícuota del sobrenadante es mezclada vigorosamente con cloruro de sodio, hidróxido de sodio al 50%, y cloroformo-n-butanol (1:1), se centrifuga y el sobrenadante es extraído con cloroformo-n-butanol; la mezcla de extractos es adicionada de n-heptano y se extrae con ácido clorhídrico 0.2N, la solución se evapora a baño maría.

Derivación. El residuo es disuelto en una solución saturada de bicarbonato de sodio, se adiciona una solución de cloruro de dansilo, se mezcla y deja reposar. Se diluye con agua y extrae con éter etílico; la fase etérea es evaporada y el residuo disuelto en acetonitrilo.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (μBondapak C₁₈); la fase móvil es una elución de gradiente, programada linealmente para que el 60% del solvente B pase a 100% en 30 minutos; siendo el solvente A acetonitrilo al 10% en ácido acético 0.02N y B, ácido acético 0.02N al 10% es acetonitrilo-metanol

(1:1); el detector es un UV diferencial fijo a 254nm.

Comparando el método organoléptico con la HPLC (índice de frescura), se encuentra que el índice de frescura (químico) clasificaba correctamente el 90.5% de las muestras contra un 83.9% de la clasificación correcta por medios organolépticos.

Productos de descomposición por procesamiento. Otra aplicación de la HPLC, es en el control de procesamiento. Las modificaciones que puedan sufrir los alimentos al ser procesados (principalmente por tratamientos excesivos) pueden ser detectados por la presencia de nuevas sustancias o concentraciones mayores de sustancias ya presentes.

Metodología.

Bradford y Chin (38) realizaron una determinación rápida de hidroximetilfurfural (HMF) en pasta de tomate.

El HMF es un compuesto que se forma al calentar un azúcar reductor en solución ácida, o por las reacciones tipos Maillard entre glucosa y aminoácidos. La cantidad de HMF presente en pasta de tomate enlatado, nos indica el grado de daño que ha sufrido el producto debido al exceso de calentamiento. El método comúnmente empleado, es la medición de la densidad óptica del filtrado de la pulpa del tomate; pero esta medida no solo refleja los cambios ocurridos por las reacciones de oscurecimiento, sino también las debido a diferencias químicas existentes entre diferentes cosechas.

Preparación de la muestra. La pasta de tomate es homogenizada y centrifugada, finalmente el suero es filtrado.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (LiChrosorb C₈); la fase móvil es solamente agua; el detector es de longitud de onda variable fijo a 284nm.

El mínimo detectable es de 1 ppm, los porcentajes de recuperación son hasta de 99.6% para concentraciones de 28 ppm.

Fisher (39) realizó la determinación de hesperidina, un glicósido flavonoide encontrado en el jugo de naranja, el que es insaboro y no contribuye a la calidad del jugo, pero su concentración en éste puede ser utilizada como una medida de presión de extracción y relacionarse con la calidad del jugo. La técnica desarrollada de HPLC proporciona una rapidez, precisión y confiabilidad mejor que la de otros métodos existentes.

Preparación de muestras. Las muestras de jugo de naranja son filtradas a través de fibra de vidrio y refiltradas por un sistema clarificador Millipore.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Bondapak C₁₈); la fase móvil está compuesta por agua-acetonitrilo (80:20); el detector es de UV visible fijo a 285nm y 0.1 AUFS.

3.9.5 Residuos Hormonales

La presencia de hormonas en los alimentos puede tener diferentes efectos en el consumidor; la carne es uno de los principales portadores; cuando los animales no están castrados y/o se encuentran en un estado excitado, antes de ser sacrificados, éstos segregan hormonas las que aparecen en la carne obtenida.

Metodología.

Stan et al. (40) determinó residuos de trenbolona y testosterona

-rona en carne. La testosterona es un andrógeno que tiene efectos de conservación de caracteres masculinos, por lo que su ingestión por personas del sexo femenino puede provocar problemas de masculinización.

Preparación de muestras. Las muestras de carne se homogenizan con tetrahidrofurfural, extraída con acetonitrilo y hexano, y después con hidróxido de sodio y éter de petróleo-benceno; posteriormente la muestra se purifica en una columna de sílica gel; la muestra purificada es inyectada al cromatógrafo.

Cromatografía. Se emplea una columna empacada con sílica gel; la detección se realiza con un detector de fluorescencia o un fotómetro. Las mediciones de fluorescencia se llevan a cabo en una celda de flujo empacada con sílica gel.

El mínimo detectable es de 50 ng/g y 5 ng/g testosterona y trembolona, respectivamente.

Frischhorn et al. (41) y Smyth et al. (42) determinaron varios estrógenos (estriol, estrona, estradiol, dietilestilbestrol, dienestrol, hexestrol y zeranol) en carne.

Los efectos tóxicos que pueden causar la ingestión de estrógeno son, anorexia, náuseas y vómitos. También pueden provocar retención de sal y agua, y aumento de la proteína fijadora de tiroxina en el suero.

La técnica de Smyth et al. no es apropiada en el análisis de estriol, aunque las técnicas son semejantes; por lo que la técnica de Frishhorn et al. es la que se describe.

Preparación de muestras. Una porción de carne es molida junto con arena y sulfato de sodio anhidro, se homogeniza y se ex-

-trae con metanol.

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (LiChro sorb RP-2 ó RP-18); la fase móvil es una elución de gradiente, con un solvente A de acetonitrilo-agua (1:9) y uno B de acetoni trilo-agua (9:1), la elución inicial es de 25% de B, a los 5 mi nutos es de 45% de B en A, a una velocidad de flujo de 2 ml/min; el detector es un voltámetro con un electrodo de referencia de Ag/AgCl, uno de vidrio y un contador.

El mínimo detectables es de 0.3 a 0.5 ng, los porcentajes de recuperación son de 60 a 90%.

3.10 Tóxicos Naturales.

Se consideran tóxicos naturales todos aquellos compuestos de procedencia natural en los alimentos, que al ser ingeridos tengan efectos nocivos contra la salud.

El tema se divide en dos grupos principales: micotoxinas y - misceláneos, en el que se incluyen una variedad de tóxicos no - producidos por hongos.

3.10.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de hongos. Entre las más comunes se encuentran las aflatoxinas producidas por algunas especies de *Aspergillus*, zearale none por *Fusarium* y patulina, ácido penicílico, ochratóxina A y rubratoxina B, producidas por varias especies de *Penicillium* y *Aspergillus*.

Aflatoxinas. Las aflatoxinas son metabolitos de *Aspergillus fla vus* y se encuentran como contaminantes de alimentos en muchos -

lugares del mundo, principalmente en cosechas almacenadas en regiones tropicales, las cuales están bajo condiciones extremas de calor y humedad.

Las aflatoxinas producen toxicidad en animales, los que a su vez contaminan los productos derivados, tal puede ser el caso de la leche, cuando la vaca ha ingerido alimentos contaminados. Las aflatoxinas además de ser tóxicas, son carcinogénicas en los animales; en los humanos existe fuerte evidencia circunstancial, basada en datos epidemiológicos, que las aflatoxinas pueden provocar cirrosis y cáncer del hígado en lugares donde los alimentos están sujetos a este tipo de contaminación (India, África). La aflatoxina más común es la B₁, potente carcinógeno del hígado de ratas, también puede inducir daño crónico y neoplasia en animales y humanos.

La HPLC ofrece un sistema instrumental objetivo para obtener la exactitud y precisión necesaria en la determinación de aflatoxinas, en una gran variedad de productos agrícolas.

Ya que las técnicas comúnmente empleadas, en particular la cromatografía de capa fina (comparación visual de la intensidad fluorescente y medidas fluorodensitométricas) están expuestas a ciertas variables, entre ellas exposición a la luz, error en la lectura de los platos, interferencia en la fluorescencia y oxidación de las aflatoxinas; contrarrestan su buena sensibilidad (1ng) con los errores que puedan ser provocados por las variables mencionadas.

Metodología.

Debido a la importancia que ha tomado la determinación de

aflatoxinas en los alimentos, una gran cantidad de artículos han sido publicados.

Preparación de las muestras. Los métodos de extracción son de suma importancia para una buena determinación de aflatoxinas. Entre los artículos revisados, se encontraron los siguientes con aplicación directa sobre los alimentos.

Goto et al. (1) proponen un método de preparación de muestras universal; éste parte de la extracción con cloroformo y purificación en una columna empacada con alumina acidulada-silica gel-sulfato de sodio. Se obtienen resultados altos de recuperación (82-101%) al someterse a la HPLC.

Takahashi (2) realizó su determinación en vinos, jugos de frutas y otros líquidos; las muestras son extraídas con metanol y cloruro de metileno y purificadas en columnas empacadas con sulfato de sodio anhidro-alumina acidulada; los rendimientos son altos (80-115%) al ser analizadas las muestras.

Ponz (3) realizó su determinación en productos derivados del cacahuate; las muestras se extraen con metanol acuoso acidificado, sometiendo a extracción con diclorometano y purificación en una columna de silica gel.

Hunt (4) empleando la técnica de Stoloff (17), realizó su análisis en una variedad de alimentos; las muestras se extraen con cloroformo y se purifican por cromatografía de capa fina, sus rendimientos son de 40 a 95%.

Cromatografía. En la mayoría de los artículos revisados, los autores prefieren el empleo de Silica para empacar sus columnas analíticas; en la selección de la fase móvil prefieren la elución

isocrática; empleando una gran variedad de solventes. Los detectores más utilizados son el de UV a 365nm y el de fluorescencia; éste último es preferido por varios investigadores debido a su mayor sensibilidad, selectividad y menos susceptibilidad a interferencias; pero puede tener el inconveniente de que la emisión necesaria para determinar las aflatoxinas B₁ y B₂ está muy cerca del límite mínimo de longitud de onda (400nm) del detector, en el cual se reduce notablemente la sensibilidad para varias fases móvil. Manabe (7) recomienda un solvente para eliminar este problema. La combinación en serie de los dos tipos de detectores, eliminaría también estos problemas.

A continuación se proporciona una tabla con información sobre tipos de columnas, detectores, fases móvil y detección mínima, empleados para determinar las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁.

| Aflatoxina y referencia | Empaque de columna | Tipo de detector | Fase móvil | Mínimo Detectable |
|--|---------------------------------|----------------------|--|-------------------|
| B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ (1) y (7) | Silica | Espectrofluorómetro. | Tolueno-Acetato de etilo-Acido fórmico-Metanol (89:7.5:2:1.5) | 10-20 g/l |
| B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ (2) | Silica y fase inversa, CN y ODS | UV fluorómetro | Agua-metanol-Acetonitrilo (3:1:1) | 1 g/l |
| B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ (3) | Silica | UV | Agua saturada con cloroformo-Metanol-Acetonitrilo (25:7.5:1) | 1 - 2 ng |
| B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , Ochratoxina A (4) | Silica | Fluorómetro | Cloroformo saturado con agua - Acido acético glacial (10:1) Para M ₁ , Cloroformo-Acido acético-Metanol (50:5:3) | 0.3-12.5 g/kg |

CONTINUA TABLA

| | | | | | |
|--|----------------------------|--------------------------------|---|---------|------|
| B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ (5) | Silica | UV | Cloruro de metileno Metanol | 10-30 | g/l |
| B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ (6) | Fase in- versa - C18 | UV Fluoróme- tro. | Cloruro de sodio-Ace- tonitrilo-metanol (3:1:1) | 5-7 | g/Kg |
| B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ (8) | Silica | UV Fluoróme- tro. | Agua saturada con cloroformo-Ciclo- hexano-Acetonitri- lo (25:7.5:1.0) | 0.3-1.0 | g |
| B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ (9) | Silica | Espectro- fluoróme- tro. | Metanol en agua sa- turada con dicloro- metano 0.3% v/v. | 10 | ng |
| B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ (10) | Silica | UV Fluoróme- tro. | Cloroformo-Ciclohe- xano-Acetonitrilo (250:75:10) | 0.6 | ng |
| M ₁ (11) | Fase in- versa, ODS. | Fluoróme- tro. | Acetonitrilo-Meta- nol (3:2) | 0.3 | g/l |
| B ₁ ,G ₁ ,Ochrato- toxina A, Zea- ralenone,Rubra- toxina B,Patu- lina y Acido Penicílico. | Fase in- versa,C18 | UV | Acetonitrilo-Agua- Acido Acético (55:45:2) o (45:55:2) | 0.04-1 | ng |

Determinación Zearalenone, Patulina, Acido Penicílico, Ochratoxi-
na A y Xanthomegnina.

Zearalenone. Micotoxina producida por varias especies del hongo
(moho) Fusarium, que generalmente se encuentra en los cereales de
países escandinavos (o climas similares a éstos). Su determinación
es requerida debido a su actividad estrogénica ya que causa hiper-
estrogenismo en animales. Se sospecha que también provoca inferti-
lidad en ganado vacuno y porcino.

Patulina. Producido por varias especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Inyecciones subcutáneas de Patulina en ratas causan tumores en el lugar de aplicación; también tiene efectos mutagénicos en células de levaduras.

Debido al efecto de putrefacción en manzanas causado por el *Penicillium expansum*; la determinación de Patulina nos puede servir para un control de calidad en la materia prima utilizada en la elaboración de jugos de manzana.

Ochratoxina A. Desarrollada por *Aspergillus ochroceus*, *Penicillium viridicatum* y otras especies, se encuentra algunas veces en cereales de países escandinavos. En experimentos realizados en porcinos, la toxina ha causado daños en los riñones a concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; después de inyectado a ratones preñados ha mostrado ser teratógeno.

Acido Penicflico. Producido por especies de *Penicilina* y *Aspergillus*; se ha demostrado su efecto carcinogénico en animales de laboratorio.

Xanthomegnina. Producido por varias especies de *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Microsporum*. Tóxico para ratones y ratas; los órganos afectados predominantes son riñones e hígado. Pruebas en mitocondrias aisladas de hígado muestran que la toxina es un fuerte desacoplador de la fosforilación oxidativa. Debido a que su presencia es provocada por varias especies es común encontrarla en una gran variedad de cereales.

Metodología.

Zearalenone. En el estudio realizado por Scott et al. (13), sobre la utilización de métodos (TLC, GLC/MS, HPLC) más adecuados; etc.

-contró que TLC era el más apropiado para estimaciones (análisis) semicuantitativo; los análisis cuantitativos por medio de HPLC y GLC/MS (cromatografía gas-líquido/espectrometría de masas), son el método a escoger por su selectividad, con la desventaja de su empleo limitado por la disponibilidad de sus instrumentos.

Según un artículo japonés, la toxina Zearalenone es un agente modificante del DNA, por lo que es necesaria una gran sensibilidad, la cual puede ser proporcionada por HPLC.

En los artículos revisados, se encontró una sensibilidad similar a niveles de ng para la determinación de la toxina.

La mayoría de las columnas eran de sílica gel (Spherisorb - - ODS, Lichrosorb) y se encuentra una concordancia en la utilización de dos columnas conectadas en serie para una mejor separación.

Hunt et al. (14) que no emplea las columnas en serie, se sirve de una precolumna semipreparativa.

Las determinaciones realizadas son en los cereales o productos derivados de éstos, y en todas se necesitan métodos de extracción, y de limpieza, Scott (13) menciona extracción con metanol, hexano y ajuste de pH; y limpieza en una columna de sílica gel; eluyendo con cloroformo-metanol (97.5:2.5) y se evapora con una corriente de nitrógeno 50°-60°C y se disuelve en tolueno.

Moller et al. (15) recomienda extracción con ácido fosfórico y cloroformo, y limpieza en sílica gel con benceno-hexano (150+50) o ciclohexano-dicloro etileno-éter etílico (150+40+10) y eluyendo con cloroformo y purificado por extracción con solución alcalina, lavando con agua, ajustando el pH, volviendo a extraer con cloroformo.

Hunt emplea la técnica de Stoloff et al. (17) para la extracción. El extracto es disuelto en cloroformo, se limpia en una columna empacada con éter dietílico, sílica gel y sulfato de sodio anhidro y es eluido con éter dietílico.

A pesar de ser la técnica más simple, su inconveniente es el bajo porcentaje de recuperación comparado con las otras técnicas.

Smith realiza su extracción con metanol-agua (75:25), ajuste de pH (11) con NaOH 1M y sometido a partición con n-hexano y la fase acuosa es ajustada a pH 3 con HCl 1M, se extrae nuevamente con diclorometano, la fracción orgánica es evaporada y disuelta en metanol. En esta técnica se evita el uso de columnas para limpieza, pero su inconveniente también es un alto límite de detección y un porcentaje de recuperación bajo.

En la utilización de detectores se encuentran las de fluorescencia UV y el voltamétrico; y al parecer no afecta en la sensibilidad el uso de cualquiera de los detectores. Aunque Smith et al. (16) reporta que para poder determinar los isómeros cis y trans del Zearalenone debe usarse el detector electroquímico, ya que las radiaciones de UV provocan la conversión del isómero trans al cis.

Recomendaciones:

En general se recomiendan las técnicas de Scott y Moller dependiendo del equipo que se posea y las muestras: hojuelas de maíz (Scott), granos de cereales (Moller); ya que en las dos se obtiene una buena sensibilidad y porcentaje de recuperación.

Moller et al. encontraron que el uso de benceno-hexano en el paso de limpieza, a pesar de ser el más eficiente (comparado

con el de ciclohexano-dicloro etileno- y éter etílico) restringe su empleo debido a que es referido como un carcinogénico.

Patulina. El método oficial (AOAC) para la determinación de patulina está basado en extracción, limpieza en una columna de sílica gel y separación por TLC; éste resulta algo inexacto y se complica por el uso de sustancias que causan interferencia.

El método se ha mejorado bastante empleando HPLC con columnas de fase inversa sobre todo en el límite de detección (20 µg/l a 1 µg/l). El empleo de HPLC (fase inversa) es recomendado con respecto al HPLC normal, debido a su mayor sensibilidad (Stray et al. (18) y rapidez (Brackett et al (19), el porcentaje de recuperación es el mismo.

En los artículos revisados las determinaciones son realizadas en jugos de manzana (17,18) y otros alimentos (14) como: cereales, lomo de puerco, queso, crema entera de leche en polvo.

Las extracciones para muestras de jugo de manzana es la misma que la utilizada en TLC (20); pero cambiando el sistema de solventes: de acetato de etilo-benceno por acetato de etilo-tolueno; esto debido a la toxicidad del benceno, sin que esto varíe la polaridad de la mezcla necesitada (18).

La limpieza puede ser realizada en una columna de sílica-gel con tolueno y utilizando tolueno-acetato de etilo (70+30) como eluyente. En otro tipo de muestras la extracción puede llevarse a cabo según el artículo de Hunt (14) haciendo uso de la técnica de Stoloff (17). Stray y Brackett et al. (19) emplean técnicas muy parecidas (columnas, fase móvil, detector), mientras Hunt hace la determinación junto con la de Zearalenone y ácido penicílico, por

lo cual se cree sufre una disminución en su porcentaje de recuperación.

La técnica cromatográfica de Stray se diferencia de la de Bracket en estándar interno, lo cual podría ser un factor en la elección del método, dependiendo de la facilidad con la cual se puedan conseguir éstas. Stray emplea un estándar de patulina, Bracket 7-hidroxi,4-metil coumarina.

Ochratoxina A. Otros métodos en la determinación de Ochratoxina A son por TLC y espectrofluorómetro pero debido a que los métodos basados en TLC son sólo semicuantitativos, fue necesario el desarrollo de otros métodos más precisos.

Se encontraron dos artículos aplicados a los alimentos; el de Hunt (8) que hace su identificación y cuantificación junto con las aflatoxinas, por lo cual su método ya fue mencionado en este subtema. Josefsson et al. (21) y Moller realizaron su determinación en cereales (cebada, maíz, avena, centeno y trigo). Obteniendo mayores porcentajes de recuperación y su límite de detección es menor.

El método de extracción utilizado por Josefsson es por medio de ácido fosfórico y cloroformo, el extracto se limpia en una columna de sílica con ciclohexano-dicloro etileno-éter etílico (150:40:10) y la toxina es eluida con cloroformo-ácido fórmico (99:1). Después es purificada por cromatografía en bicarbonato de sodio-celita acuosa, lavando con cloroformo y eluido con cloroformo-ácido fórmico (99+1). Se evapora y se disuelve en cloroformo-ácido acético (99+1).

También se hace uso de este método para una determinación si

-multánea de Zearalenone y Ochrotoxina, realizando un paso extra de limpieza en una columna Zephadex, pero esto provoca que disminuya el porcentaje de recuperación en centeno.

Se recomienda un ajuste del pH a 4.5 con ácido acético al 20% en la fase móvil (metanol-agua; 99:1) para una mejor resolución.

Acido Penicilico. Su determinación en los alimentos por medio de HPLC sólo se encontró un artículo, la técnica es de Hunt (14) la cual ya fue descrita. Las únicas variaciones que se encuentran son: en la fase de limpieza en la columna de silica gel, la fase eluyente es cloroformo-metanol (97:3); y el empleo de una columna semipreparativa no es siempre necesaria.

Xanthomegnina. Debido a la presencia común de mohos productores de Xanthomegnina y a la toxicidad de ésta, un método de análisis fue necesario.

Haciendo uso de las técnicas para la determinación de Aflatoxinas (20) se plantea un método para el análisis de xanthomegnina.

Extracción.- 50 g de muestra finamente molidos se les adiciona 25 ml de H_3PO_4 0.5M y 250 ml de cloroformo, se agita 30 minutos y se filtra (50 ml).

Limpieza.- En una columna empacada con sulfato de sodio anhidro cloroformo y silica gel, se eluye con hexano y después con éter etílico anhidro seguido por metanol-cloroformo (3:97) y finalmente con ácido acético-cloroformo (2+98). El mínimo detectable es de 750 $\mu g/Kg$, su valor tan alto es debido a que la toxina no es fluorescente.

Los porcentajes de recuperación fueron de 25 a 63%, los valores bajos y variables son producto de la inestabilidad de la Xanthomegnina. Debido a que no se encuentran otros métodos disponi-

-bles para el análisis de la toxina, este método debe ser tomado en cuenta para el desarrollo de otros métodos.

La técnica fue utilizada en el análisis de maza.

3.10.2 Misceláneos.

Determinación de Miristicina y Falcarinol. Miristicina y Falcarinol son tóxicos naturales que se encuentran en algunos alimentos (zanahoria, nuez moscada).

La Miristicina es alucinógeno y teratogénico.

Wulf et al. (22,23) determinan la presencia de Miristicina y Falcarinol en zanahorias.

Técnica.- Preparación de la muestra. La muestra se prepara macerando zanahoria con partes iguales de agua y agregando bisulfito de sodio como antioxidante, la muestra se licúa y se vierte a un aparato de destilación de vapor, y se le adiciona un antiespumante y hexano redestilado más hidroxitolueno butilado como antioxidante, después de destilar el hexano se evapora y se le agrega heptano.

Cromatografía. Se emplea una columna con fase nitrilo (Partisil PAC). La fase móvil es una elución de gradiente la cual está compuesta por heptano como solvente A y tetrahidrofurano al 7% en heptano como solvente B. Las condiciones iniciales son de 8% B en 10 minutos. El detector de longitud de onda variable es operado a 280 nm. Los porcentajes de recuperación son de 93.7% y 80.2% para Miristicina y Fulcarinol respectivamente.

Determinación de 5-viniloxazolidina-2-tiona. Se le atribuye actividad antitiroide al tiocianato y a 5-viniloxazolidin-2-tiona (OET), los que son productos de hidrólisis de glucosinatos pre

-sentes en semillas de nabo y otros miembros de la familia Cruciferae. Puesto que la comida de semilla de nabo es empleada como alimento de ganado en Canadá y Europa, la transferencia de paso del OZT a la leche consumida por humanos ha sido sujeta a varias investigaciones. La detección de niveles bajos de sustancias anti-tiroides es de suma importancia, ya que la leche es consumida en grandes cantidades por infantes y niños.

Benns et al. (24) y Josefsson y Arkerstrom (25) determinaron la presencia de OZT en leche. Ambos utilizan el mismo tipo de columnas (silica), pero varían en la fase móvil, el primero emplea un eluyente de isoctano conteniendo 10% de alcohol isopropílico y 0.1% de hidróxido de amonio mientras el segundo utiliza cloroformo-n-hexano (2:1), los detectores son de longitud de onda fija y de UV respectivamente ambos a 254nm.

Los resultados obtenidos son muy parecidos, el mínimo detectable es de 1 μ g/l para ambos, y el porcentaje de recuperación es un poco mejor el de Josefsson y Arkerstrom, una media de 74% contra 71% de Benns et al.

Debido a que los métodos de extracción son similares, variando únicamente en el solvente principal (éter dietílico por Benns et al. y diclorometano empleado por Josefsson) sólo se proporciona la técnica de este último.

Preparación de la muestra. La muestra se calienta a 85°-90°C - aproximadamente 5 minutos y después se enfría rápidamente. La muestra se extrae con diclorometano, y éste se evapora posteriormente. El residuo se extrae con una solución de amonio al 1% agitando suavemente en un baño de agua tibia. Los extractos combinados se

les ajusta el pH a 6.5-7.5 con ácido acético al 18%. Se extrae la grasa con n-hexano. La fase acuosa se extrae con diclorometano. - Se evaporan los extractos, y se vuelve a disolver en una pequeña cantidad de diclorometano, quedando lista para inyectarse al cromatógrafo.

El método de HPLC se considera más preciso y más rápido que - las técnicas basadas en cromatografía de papel y espectrofotometría.

Determinación de glicoalcaloides. Los glicoalcaloides se han encontrado a la suficiente concentración, como para causar envenenamiento y algunas veces hasta muerte. Recientemente se le ha implicado también como tetratógeno.

Metodología.

Bushway et al. (26) determinaron la presencia de glicoalcaloides en papa.

Preparación de la muestra. Las muestras de papa son homogenizadas con una solución de metanol-cloroformo (2:1) y filtradas a vacío, el filtrado es concentrado hasta unos mililitros empleando un evaporador giratorio; la muestra se acidifica con volumen igual de HCL 0.2N y se trata con un limpiador sónico durante 5 minutos, para ser centrifugado posteriormente; el sobrenadante es decantado y adicionado de hidróxido de amonio concentrado, la solución básica se puso a baño maría a 70°C durante 30 minutos y se refrigeró durante la noche; la solución es centrifugada por 10 minutos a 0°C. Después de que los vapores de amonio se han disipado, se adiciona una solución de tetrahidrofurano-agua-acetonitrilo - - - (50:30:20).

Cromatografía. Se emplea una columna de fase inversa (Mondapak/Carbohidrato); la fase móvil está compuesta por tetrahidrofuran-agua-acetonitrilo (53:17:30); el detector es de UV fijo a 215 nm.

Los glicoalcaloides determinados son α -solanina y α -cacconina, que comprenden del 95 al 99% del total de éstas encontradas en las papas. Los porcentajes de recuperación son de 90 a 100%.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- La gran cantidad de artículos publicados en los últimos años sobre una variedad extensa de compuestos y en su mayoría con resultados positivos, da una idea del promisorio futuro de la HPLC; - tal es el caso, que de cada diez nuevas técnicas de cromatografía aplicadas a los alimentos, ocho son de HPLC.

- La versatilidad de la HPLC queda comprobada con las determina--ciones de compuestos tan simples como un carbohidrato y tan com--plejo como las aflatoxinas; por lo que el desarrollo de nuevas - aplicaciones en los alimentos debe ser fomentado.

- Existen en México varios aparatos para HPLC, pero su manejo, a pesar de no ser complicado, requiere de la participación de gente preparada para tener un mayor aprovechamiento y cuidado del equi--po, ya que el costo de sus materiales y reactivos son altos.

- La HPLC no es una técnica fija a la que no se le puedan hacer - modificaciones, sino al contrario, da una amplia posibilidad de - variables, desde una simple elución isocrática hasta una programa--ción de gradiente, de una columna de sílica gel hasta una comple--ja fase ligada, y así se puede continuar mencionando las opciones que puede proporcionar esta técnica.

- La posible recuperación de muestras y eluyentes después del aná--lisis, da una ventaja incomparable sobre técnicas tan empleadas - como la cromatografía de gases, en la cual las muestras son des--compuestas.

- Dado el gran número de publicaciones relacionadas con la aplica--ción de HPLC a alimentos, que aparecen periódicamente, es recomen--dable actualizar permanentemente el breve catálogo recopilado en este trabajo.

5. BIBLIOGRAFIA POR TEMAS

Capítulos 1 y 2

1. A. Pryde y M. T. Gilbert
Applications of High Performance Liquid Chromatography
Editorial Chapman y Hall LTD, 1979.
2. Majors E. Ronald
Journal of the AOAC, 1977, 60(1), 186-205.
3. Macrae R.
Journal of Food Technology, 1980, 15, 93-110.
4. Tweeten T. N. y Euston C.B.
Food Technology, December 1980, 29-37.
5. Conrad E.C.
Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages, 1979,
2, 237-254.

Capítulo 3

3.1

1. Hurst J. W. y Martin R. A.
Journal of the AOAC, 1977, 60(5), 1180-1184.
2. Hurst J. W. y Martin R. A.
Journal of the AOAC, 1980, 63(3), 595-599.
3. Hurst J. W., Martin R. A. y Zoumas B. L.
Journal of Food Science, 1979, 44, 892-895, 904.
4. Damon C. E. y Pettitt B. C.
Journal of the AOAC, 1980, 63(3), 476-480.
5. Brandao S.C.C., Richmond M.L., Gray J.I., Morton I.D. y Stine
C.
Journal of Food Science, 1980, 45, 1492-1493.
6. Richmond M. L., Brandao S.C.C., Gray, Markakis y Stine
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1981, 29, 4-7.
7. Warthesen J. J. y Kramer P. L.
Journal of Food Science, 1979, 44(2), 626-627.
8. Thean J.E. y Funderburk W. C.
Journal of the AOAC, 1977, 60(4), 838-841.
9. Black L.T. y Bagley E.B.
Journal of the AOCS, 1978, 55, 228-232.

10. Black L.T. y Glover J.D.
Journal of the AOCS, 1980, 57(4), 143-144.
 11. Dunmire D.L. y Otto S. E.
Journal of the AOAC, 1979, 62(1), 176-185.
 12. Cegla G.F. y Bell K. R.
Journal of the AOCS, 1977, 54, 150-152.
 13. Lawson M. A. y Russell G. F.
Journal of Food Science, 1980, 45, 1256-1258.
 14. Lawson M. A., Takeoka G. R. y Russell G. F.
Liquid Chromatographic Analysis Food Beverages, 1979, 2, 379-395
 15. Shaw P. E., Wilson C. W. y Knight R. J.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1980, 28, 379-382.
 16. Euber J. R. y Brunner J. R.
Journal of Dairy Science, 1979, 62(5), 685-690.
 17. Hunt D. C., Jackson P. A., Mortlock R. E. y Kirk R. S.
Analyst, 1977, 102, 917-920.
 18. Engel C. E. y Olinger P. M.
Journal of the AOAC, 1979, 62(3), 527-532.
 19. Aitzetmuller K.
Journal of Chromatography, 1978, 156, 354-358.
- 3.2
1. Plattner R. D., Spencer G. F. y Kleinan R.
Journal of the AOCS, 1977, 56, 511-515.
 2. Herslof B., Podlaha O. y Toregard B.
Journal of the AOCS, 1979, 56, 864-866.
 3. Aitzetmuller K.
Journal of Chromatography, 1977, 139, 61-68.
 4. Kiuchi K., Ohta T., Ebine H.
Journal of Chromatographic Science, 1975, 13, 461-466.
 5. Tweeten T. N. y Wetzel D. L.
Cereal Chemistry, 1979, 56(5), 398-402.
 6. Borch R. F.
Analytical Chemistry, 1975, 47(14), 2437-2439.
 7. Newkirk D. R. y Sheppard A. J.
Journal of the AOAC, 1981, 64(1), 54-57.

3.3

1. DeVries J. W., Koski C. M., Egberg D. C. y Larson P. A.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1980, 28, 896-898.
2. Schuster R.
Analytical Chemistry, 1980, 52, 617-620.
3. Peterson W. R. y Warthesen J. J.
Journal of Food Science, 1979, 44, 994-997.
4. Warthesen J. J. y Kramer P. L.
Cereal Chemistry, 1978, 55(4), 481-488.
5. O'Keefe L. S. y Warthesen J. J.
Journal of Food Science, 1978, 43, 1297-1300.
6. Saetre R. y Rabenstein D. L.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1978, 26(4), 982-983.

3.4

1. Wills R. B. H., Shaw C. G. y Day W. R.
Journal of Chromatographic Science, 1977, 15, 262-266.
2. Toma R. B. y Tabekhia M. M.
Journal of Food Science, 1979, 44(1), 263-268.
3. Ang C. Y. W. y Moseley F. A.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(3), 483-486.
4. Kamman J. F., Labuza T. P. y Warthesen J. J.
Journal of Food Science, 1980, 45, 1501-1504.
5. Clifford C. K. y Clifford A. J.
Journal of the AOAC, 1977, 60(6), 1248-1251.
6. Reed L. S. y Archer M. C.
Journal of Chromatography, 1976, 121, 100-103.
7. Branfman A. R. y McComish M.
Journal of Chromatography, 1978, 151, 87-89.
8. Lim K. L., Young R. W. y Dirskell J. A.
Journal of Chromatography, 1980, 188, 285-288.
9. Gregory J. F. y Kirk J. R.
Journal of Food Science, 1978, 43, 1801.
10. Gregory J. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(3), 486-489.

11. Wong F. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1978, 26(6), 1444-1446.
12. Barnett S. A., Frick L. W. y Baine H. M.
Analytical Chemistry, 1980, 52, 610-614.
13. Soderhjelm P. y Andersson B.
Journal Sci. Food Agric., 1978, 29, 697-702.
14. DeVries J. W., Egberg D. C. y Heroff J. C.
Liq. Chromatogr. Anal. Food Beverages, 1979, 2, 477-497.
15. Widicus W. A. y Kirk J. R.
Journal of the AOAC, 1979, 62(3), 637-641.
16. Thompson J. N., Hatina G. y Maxwell W. B.
Journal of the AOAC, 1980, 63(4), 894-898.
17. Thompson J. N. y Maxwell W. B.
Journal of the AOAC, 1977, 60(4) 766-771.
18. Aitzetmueller K., Pilz J. y Tasche R.
Fette Seifen Anstrichm, 1979, 81(1), 40-43.
19. Landen W. O.
Journal of the AOAC, 1980, 63(1), 131-136.
20. Landen W. O. y Eitenmiller R. R.
Journal of the AOAC, 1979, 62(2), 2830289.
21. Egberg D. C., Heroff J. C. y Potter R. H.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(5), 1127-1132.
22. Bui-Nguyen M. y Blanc B.
Experientia, 1980, 36, 374-375.
23. Stewart I.
Journal of the AOAC, 1977, 60(1), 132-136.
24. Stewart I.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(5), 1132-1137.
25. Reeder S. K. y Park B. L.
Journal of the AOAC, 1975, 58(3), 595-598.
26. Zakaria M., Simpson K., Brown P. R. y Krstulovic A.
Journal of Chromatography, 1979, 176, 109-117.
27. Henderson S. K. y Wichrosky A. F.
Journal of the AOAC, 1978, 61(5), 1130-1134.
28. Thompson J. N., Maxwell W. B. y L'Abbé M.
Journal of the AOAC, 1977, 60(5), 998-1000.

29. Koshy K. T. y Van Der Slik A. L.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1979, 27(3), 650-652.
30. Koshy K. T. y Van Der Slik A. L.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1979, 27(1), 180-183.
31. Hung S. S., Cho Y. C. y Slinger S. J.
Journal of the AOAC, 1980, 63(4), 889-893.
32. Carpenter A. P.
Journal of the AOCS, 1979, 56, 668-671.

3.5

1. Ciraolo L., Calabro G. y Clasadonte M. G.
Rass Chim., 1978, 30(3), 145-149.
2. Van Niekerk J. P. y Du Plessis M. L.
Journal of Chromatography, 1980, 187, 436-438.
3. Page D. B.
Journal of the AOAC, 1979, 26(6), 1239-1246.
4. Leuenberger U., Gauch R. y Baumgariner E.
Journal of Chromatography, 1979, 173, 343-348.
5. Bennett M. C. y Petrus D. R.
Journal of Food Science, 1977, 42(5), 1220-1221.
6. Woodward B. B., Heffelfinger G. P. y Ruggles D. I.
Journal of the AOAC, 1979, 62(5), 1011-1018.
7. Samarco C. E.
Journal of the AOAC, 1977, 60(6), 1318-1320.
8. Diladalova J., Barton A. Y. y Mackenzie E. A.
Journal of the AOAC, 1980, 63(3), 664-666.
9. Mauro D. J., Wetzal D. L., Seib P. A. y Hoseney R. C.
Cereal Chemistry, 1979, 56(3), 152-155.

3.6.

1. Marsili R. T., Ostapenko H., Simmons R. E. y Green D. E.
Journal of Food Science, 1981, 46, 52-57.
2. Tangendjaja B., Buckle K. A. y Wootton M.
Journal of Chromatography, 1980, 197, 274-277.
3. Turkelson V. T. y Richards M.
Analytical Chemistry, 1978, 50(11), 1420-1423.

5.7

1. Vincent K. R. y Scholtz R. G.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1978, 26(4), 812-816.
2. Schwartz S. J. y Von Elbe J. H.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(3), 540-543.
3. Camire A. L. y Clydesdale F. M.
Journal of Food Science, 1979, 44, 926-927.
4. Wulf L. W. y Nagel
Journal of Chromatography, 1976, 116, 271-278.
5. Chudy J., Crosby N. T. y Patel I.
Journal of Chromatography, 1978, 154, 306-312.
6. Boley N. P., Bunton N. G., Crosby N. T. y Johnson A. E.
Analyst, June 1980, 105, 589-599.
7. Cox E. A.
Journal of the AOAC, 1980, 63(1), 61-68.
8. Marmion M. D.
Journal of the AOAC, 1977, 60(1), 168-172.
9. Bailey J. E. y Cox E. A.
Journal of the AOAC, 1976, 59(1), 5-11.
10. Singh M.
Journal of the AOAC, 1977, 60(1), 173-175.
11. Singh M.
Journal of the AOAC, 1977, 60(5), 1067-1070.
12. Jones A. D., Hoar D. y Sellings S. G.
Journal of Chromatography, 1978, 166, 619-622.
13. Bailey E. J.
Journal of the AOAC, 1980, 63(3), 565-571.

3.8

1. Selim S.
Journal of Chromatography, 1977, 136, 271-277.
2. GyVigh, Varga Puchony, Hlavay, Petro-Tureza y SZalfoldi S.
Journal of Chromatography 1980, 193, 432-436.
3. Fisher J. F. y Wheaton T. A.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1976, 24(4), 899.
4. Williams A. T. R. y Slavin W.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(4), 756-759.

5. Hoefler A. C. y Coggon P.
Journal of Chromatography, 1976, 129, 468-469.
6. Walter W. M., Purcell A. E. y McCollum G. K.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1979, 27(5), 938-941.
7. Lee S. y Chang S. S.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1975, 23(2), 337-339.
8. Fisher J. L. y Trama A. L.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1979, 27(6), 1334-1337.
9. Ross M. S. F.
Journal of Chromatography, 1976, 118, 273-275.
10. Galetto W. G., Walger D. E. y Legy S. M.
Journal of the AOAC, 1976, 59(5), 951-953.
11. Lund D. E.
Journal of the AOAC, 1978, 61(5), 1083-1088.
12. Beasley T. H., Ziegler H. y Bell A. D.
Journal of Chromatography, 1979, 175, 350-355.
13. Belleau G. y Dadu M.
Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1974, 5, 5.
14. Charalambous G.
Techn. Quart. Master Brewer's Ass. Am., 1974, 11, 146.
15. Charalambous G., Bruckner K. J., Hardwick W. A. y Linneback A.
Techn. Quart. Master Brewer's Ass. Am., 1974, 11, 193.
16. Charalambous G., Bruckner K. J., Hardwick W. A. y Linneback A.
Techn. Quart. Master Brewer's Ass. Am., 1974, 11, 150.
17. Palamand S. R. y Aldenhoff J. M.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1973, 21, 535.

3.9

1. Jen Kun Lin y Chen-Ching L.
Analytical Chemistry, 1980, 52, 630-635.
2. Heyns R., Roeper H. y Stolzenberg K.
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1978, 5(5), 155-156.
3. Fine D. H. et al.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1976, 24(5), 1069-1077.
4. Wolfram J. H.
Journal of Chromatography, 1977, 132, 34-43.

5. Guerrero H. et al.
Journal of the AOAC, 1976, 59(5), 898-992.
6. Hanus J. P.
EDRO SARAP Res. Tech Rep., 1978, 3, 51-67.
7. Hanus J. P. et al.
Journal of the AOAC, 1979, 62(1), 29-35.
8. Nakagawa T. et al.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1978, 19(6), 703-706.
9. Wall J. M. et al.
Journal of the AOAC, 1980, 63(5), 1044-1048.
10. McCalla D. R.
Journal of Antimicrob. Chemother, 1977, 3, 517-529.
11. Vilim B. A. y Agnes I.M.
Journal of the AOAC, 1979, 62(1), 19-22.
12. Anneli M. D. et al.
Journal of the AOAC, 1977, 60(1), 210-212.
13. Mollica J. A. y Strausz R. F.
Journal of Pharm. Science, 1972, 61, 444-447.
14. Balckman G. L., Ah Chai Ho, Jozsa A. y Kelly J. D.
Journal of the AOAC, 1980, 63(5), 988-991.
15. Aufrere M. B., Hoener B. A. y Vore M.
Clin. Chem., 1977, 23, 2207-2212.
16. Hoener B. A. et al.
Journal of the AOAC, 1979, 62(2), 257-261.
17. Hoodless et al.
Journal of Chromatography, 1978, 166, 279-286.
18. Krause R. T.
Journal of the AOAC, 1980, 63(5), 1114-1123.
19. Lawrence J. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(1), 211-212.
20. Lawrence J. F. y Leduc R.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(6), 1362-1365.
21. Lawrence J. F. y Leduc R.
Journal of the AOAC, 1978, 61(4), 872-876.
22. Fogy I, Schmid E. R. y Huber J. F. K.
Z. Lebensm-Unters Forsch, 1980, 170(3), 194-199.

23. Fogy et al.
Ernaehrung, 1980, 4(1), 4-7.
24. Lee Y. et al.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(4), 719-722.
25. Cabras P.
Journal of Chromatography, 1979, 180, 184-190.
26. Farrow J. E. et al.
Analyst, October 1977, 102, 752-758.
27. Norman S. M. y Fouse D. C.
Journal of the AOAC, 1978, 61(6), 1469-1474.
28. Tafuri F. et al.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(6), 1150-1153.
29. Isshiki K. et al.
Journal of the AOAC, 1980, 63(4), 747-749.
30. Lawrence J. F.
Journal of the AOAC, 1976, 59(5), 1066-1070.
31. Lawrence J. F.
Journal of Chromatographic Science, 1976, 14(12), 557-559.
32. Selim S. y Cook R. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1978, 26(1), 106-110.
33. Bramlett C. L.
EDRO SARAP Res. Tech. Rep., 1976, 1, 52-74.
34. Blaicher et al.
Chromatographia, 1980, 13(7), 438-446.
35. Warthesen J. J., Waletzko P. T. y Busta F. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28(6), 1308-1309.
36. Mietz J. L. y Karmas E.
Journal of the AOAC, 1978, 61(1), 139-145.
37. Mietz J. L. y Karmas E.
Journal of Food Science, 1977, 42, 155-158.
38. Bradford H. A. y Chin H. B.
Journal of the AOAC, 1980, 63(3), 1074-1076.
39. Fisher J. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1978, 26(6), 1459-1460.
40. Stan et al.
Z. Lebensm-Unters Forsch, 1979, 169(4), 266-270.

41. Frischkorn et al.

Eresenius Z. Anal. Chem., 1980, 305, 407-412.

42. Smyth et al.

Eresenius Z. Anal. Chem., 1980, 301(3), 220-223.

3.10

1. Goto T., Masaru M. y Matsuura S.

Agric. Biol. Chem., 1979, 43(12), 2591-2592.

2. Takahashi D. M.

Journal of the AOAC, 1977, 60(4), 799-804.

3. Pons W. A.

Journal of the AOAC, 1976, 59(1), 101-105.

4. Hunt D. C., Bourdon A. T., Wild P. J. y Crosby N. T.

Journal Sci. Food Agric., 1978, 29, 234-238.

5. Seitz L. M.

Journal of Chromatography, 1975, 104, 81-89.

6. Hurst J. W. y Toomey P. B.

Journal of Chromatographic Science, 1978, 16, 372-376.

7. Manabe M., Goto T. y Matsuura S.

Agric. Biol. Chem., 1978, 42(11), 2003-2007.

8. Pons W. A. y Franz A. O.

Journal of the AOAC, 1978, 61(4), 793-800.

9. Garner R. C.

Journal of Chromatography, 1975, 103, 186-188.

10. Panalaks T. y Scott P. M.

Journal of the AOAC, 1977, 60(3), 583-589.

11. Beebe R. y Takahashi D.

Journal of Agric. and Food Chemistry, 1980, 28, 481-482.

12. Engstrom G. W., Richard J. L. y Cysewski S. J.

Journal of Agric. and Food Chemistry, 1977, 25(4), 833-836.

13. Scott P. M., Panalaks T., Kanhere S. y Miles W. F.

Journal of the AOAC, 1978, 61(3), 593-599.

14. Hunt D. C., Bourdon A. T. y Crosby N. T.

Journal Sci. Food Agric., 1978, 29, 239-244.

15. Moller T. E. y Josefsson E.

Journal of the AOAC, 1978, 61(4), 789-792.

16. Smith Malcolm R., Frischkorn C. G.
Anal. Chim. Acta. 1980, 115, 293-300.
17. Stoloff L., Nesheim S., Yin L., Redricks J. V., Stack y Campbe
Journal of the AOAC, 1971, 54, 91.
18. Stray H.
Journal of the AOAC, 1978, 61(6), 1359-1362.
19. Brackett R. E. y Marth E. H.
Liq. Chromatogr. Anal. Food Bev., 1979, 2, 499-508.
20. Official Method of Analysis, 1975, 12th Edition.
AOAC, Washington D. C., secs. 26.099-26.104.
21. Josefsson E. y Moller T.
Journal of the AOAC, 1979, 62(5), 1165-1168.
22. Wulf L. W., Nagel C. W. y Branen L. A.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1978, 26(6), 1390-1393.
23. Wulf L. W., Nagel C. W. y Branen L. A.
Journal of Chromatography, 1978, 161, 271-278.
24. Bennis G., L'Abbé M. R. y Lawrence J. F.
Journal of Agric. and Food Chemistry, 1979, 27(2), 426-428.
25. Josefsson E. y Akerstrom L.
Journal of Chromatography, 1979, 174, 465-468.
26. Bushway R. J., Barden E. S., Bushway A. W. y Bushway A. A.
Journal of Chromatography, 1979, 178(2), 543-549.