

FOLATOS Y SU DISPONIBILIDAD EN ALIMENTOS EVALUADOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC). VALIDACIÓN Y APLICACIONES EN CALIDA NUTRICIONAL DE ALIMENTOS

Folates and their Availability in Foods Evaluated by Liquid Chromatography (HPLC). Validation and Application in Food Nutritional Quality.

Olivares A.B.*, Bernal M.J., Ros G., Martínez C., Periago M.J.

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Grupo de Investigación de Nutrición y Bromatología (E098-02). Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia.

* Autor de referencia: abomar@um.es

RESUMEN

En este artículo se presenta el método cromatográfico de mayor precisión para la determinación de las formas químicas (folatos) de la vitamina B₉ (ácido fólico o folacina) en alimentos, así como su disponibilidad (mono o poliglutamatos). Se trata de un método basado en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cuyo protocolo permite la extracción de la vitamina, su purificación y posterior separación de las distintas formas de los folatos. Este método ha sido validado sobre estándares y alimentos de referencia certificados y comparado con otros grupos de investigación frente a métodos microbiológicos.

Palabras clave: folatos, ácido fólico, derivados folato, conjugasa, cromatografía líquida

ABSTRACT

In this article it is presented the most precise chromatographic method to determine the different forms of B₉ vitamin (folic acid or folacin) in foods, besides their availability (mono or polyglutamates). It is based in high performance liquid chromatographic method (HPLC) which protocol permits the extraction, purification and separation of folic acid and its different derivatives forms. This method has been validated with the standards and certified reference materials and compared with others investigation groups versus microbiological assays.

Keywords: folates, folic acid, folates derivatives, conjugase, liquid chromatography

INTRODUCCIÓN

El término «folato» se utiliza de forma genérica para denominar las distintas formas químicas derivadas del ácido fólico, una de las vitaminas del grupo B (concretamente la vitamina B₉) que se encuentra mayoritariamente en las verduras de hoja ancha, hígado y cereales. Los folatos (más conocidos genéricamente como ácido fólico) son un componente esencial de la dieta, necesario para la formación de las células de las series blanca y roja de la sangre, y las células epiteliales del tracto digestivo. Especialmente en estas células de rápida multiplicación y en otras células, los folatos forman parte de las reacciones de transferencia de carbono, destacando por su importancia las implicadas en el metabolismo del ADN, ARN y amino ácidos. Es por tanto comprensible que durante periodos de rápida multiplicación y crecimiento celulares los requerimientos de folato en la dieta sean mayores (Vahteristo, 1998). Así, por ejemplo, durante los periodos de gestación o lactancia las ingestas diarias recomendadas (IDR) pasan de 200 a 400 µg/día (Centers for Disease Control, 1992).

Los folatos, debido a su destacada función metabólica, tienen una importante repercusión en la salud. Juegan un papel esencial reconocido en la prevención de los defectos del tubo neural tal y como es la prevención de la aparición de espina bífida en neonatos (Czeizel y Dudás, 1992), y existen claras evidencias epidemiológicas que sugieren que unos niveles elevados de homocisteína en plasma (>15µmol/L) constituye un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares (Boushy *et al.*, 1995). Sin embargo, una ingesta elevada de ácido fólico reduce los niveles de homocisteína de modo que una dosis extra de 200µg de ácido fólico diaria provoca una reducción de 11-12% de los niveles de homocisteína plasmática (de Jong *et al.* 2004). También estudios en poblaciones han permitido establecer una relación negativa entre una alta ingesta de folatos y la

aparición de adenomas colorectales (Giovannucci *et al.*, 1993). Queda claro, como hemos expuesto anteriormente, que el ácido fólico y/o los folatos juegan un papel esencial en la dieta, tanto por su necesidad basal como por su efecto preventivo frente a distintas alteraciones de la salud. Sin embargo, la eficacia de ambas formas es distinta. Así, el ácido fólico utilizado como suplemento posee una eficacia 1,7 veces mayor que los folatos que naturalmente existen en los alimentos (West Suitor y Bailey, 2000). La forma en los alimentos (ácido fólico o folatos) y su disponibilidad (mono o poliglutámica) son esenciales para conocer nuestras necesidades reales en la dieta. Surge, por tanto, la necesidad de establecer un método fiable de determinación de folatos en alimentos. Es deseable y necesario caracterizar la exacta naturaleza y distribución de estos compuestos en la dieta para obtener un mayor conocimiento de su estabilidad y reactividad en los distintos alimentos o su biodisponibilidad en las diferentes dietas, y con todo ello poder brindar unas recomendaciones más reales y científicas, así como consejos para la obtención de una nutrición más óptima, en cuanto a folatos se refiere, para todos los grupos de población.

El contenido total de folatos venía determinándose tradicionalmente mediante métodos microbiológicos (Finglas, 1993). Estos sólo estiman el contenido total de folatos, pero no discrimina entre las diferentes formas químicas. Los folatos en los alimentos están presentes en distintas formas químicas (tetrahydrofolato, metilfolato, formilfolato) y en varios estados de oxidación (5,6,7,8-tetrahydropteroilglutamato, etc), con diferentes sustituyentes del átomo de carbono y diferente grado de conjugación con el ácido glutámico. Se ha estimado que un 80% de los folatos presentes de forma natural en los alimentos se encuentran en forma poliglutámica, y el resto como monoglutamatos, principalmente metiltetrahydrofolato. Las formas poliglutámicas no son asimilables por el organismo humano, ya que necesitan una desconjugación pre-

via hasta formas monoglutámicas las que si son biodisponibles (Gregory, 1996). Esta transformación es realizada por la enzima g-glutamihidrolasa o folato conjugasa, la cual se localiza en el borde apical de las vellosidades de la mucosa yeyunal (Figura 1) (Chandler *et al.*, 1986; Gregory, 1997; Brouwer *et al.*, 2001). A fin de separar estas formas, se han ensayado métodos cromatográficos más precisos que los microbiológicos pero que poseen algunas peculiaridades que deben ser tenidas en cuenta.

Las recientes investigaciones desarrolladas para mejorar los métodos de determinación de folatos han dado lugar a una mayor fiabilidad en la calidad de los datos en las tablas de composición de alimentos, aunque el conocimiento de las formas de folatos naturales y su contenido y distribución en alimentos es todavía muy limitado (Kehlenbach y Nau, 2004) ya que algunos de estos derivados folatos son muy hábiles (debido a su sensibilidad a la luz y a que se reducen en presencia de oxígeno) (Gregory, 1989), además de estar en muy baja cantidad en los alimentos. Por ello, el objetivo de este trabajo es mostrar un método optimizado y validado que permite separar y cuantificar las formas monoglutámicas, procedentes de distintas matrices alimentarias, que por otro lado, son las biológicamente activas (Vahteristo, 1998).

MATERIAL Y MÉTODOS

En la Figura 1 se presenta el esquema general de las etapas del método cromatográfico empleado para el análisis de folatos en alimentos basado en el método de Vahteristo *et al.* (1996).

Materiales

Materiales biológicos

Muestras de alimentos de referencia

Las muestras empleadas para este estudio fueron Materiales Certificados de Referencia

(MCR o CRM en inglés) procedentes del «Institute for Reference Materials and Measurements» (IRMM, Geel, Bélgica) fueron suministrados por el Proyecto Europeo «Folate: from Food to Functionality and Optimal Health». Se trataba de cuatro muestras liofilizadas de distintos alimentos: mezcla de diferentes verduras (maíz dulce, tomate y zanahoria) (CRM 485), hígado de cerdo liofilizado (CRM 487), leche en polvo enriquecida con ácido fólico (CRM 421), y harina integral (CRM 121). El CRM 421 es un material de referencia reconocido como tal, los otros tres son candidatos a materiales de referencia.

Materiales analíticos

Reactivos

Los reactivos usados eran específicos para cromatografía líquida como era el caso de Acetonitrilo y Metanol, y el resto eran degradado para análisis (p.a). Todos los reactivos fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua utilizada debía ser doblemente destilada, lo que se conseguía a través de un sistema Milli-Q (Millipore, USA).

Patrones

El ácido fólico (AF o PGA), el ácido pteroyltri- γ -L-glutamico (Pte-Glu₃) y las formas reducidas de folatos monoglutámicos: ácido (6R,S)-5,6,7,8-tetrahidrofólico sal de calcio (THF), ácido (6R,S)-5-HCO-5,6,7,8-tetrahidrofólico sal de sodio (5-FTHF) y ácido (6R,S)-5-CH₃-5,6,7,8-tetrahidrofólico sal de sodio (5-MTHF) fueron obtenidas de Dr. Schirck's Laboratorios (Jona, Switzerland) y almacenados en oscuridad a -40°C hasta su uso en una cámara frigorífica Radiber, S.A. La pureza de los estándares fue determinada según el procedimiento desarrollado por Van den Berg *et al.* en 1994, usando los coeficientes de extinción molar detallados en el Cuadro 1 (Vahteristo, 1998).

Cuadro 1. Coeficiente de absorción molar y peso molecular de las formas usadas para la determinación actual de la concentración en las soluciones stock

Calibrante	ϵ (l mmol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ max (nm)	pH	Peso molecular
THF	29,1	297	7	445,4
5-MTHF	31,7	290	7	457,4
5-FTHF	37,2	285	7	473,5
AF	27,6	282	7	441,4

ϵ = Coeficiente de extinción molar

λ = longitud de onda

Las soluciones estándar para almacenar fueron preparadas a concentración de 100mg/ml en tampón fosfato 0,1M a pH 6, conteniendo 1% de ácido ascórbico y 0,1% de 2-mercaptoetanol. Alícuotas de 1ml de estas soluciones fueron sometidas a atmósfera de nitrógeno, separadas en eppendorf y almacenadas a -40°C. De esta manera las soluciones de calibración eran preparadas antes de su uso a partir de las soluciones de almacenamiento, las cuales eran descongeladas y diluidas en un tampón de elución de sodio acetato 0,1 M, conteniendo 10% (p/v) de cloruro sódico, 1% (p/v) de ácido ascórbico y 0,1% (v/v) de 2-mercaptoetanol.

Solución enzimática

La solución enzimática fue preparada siguiendo las pautas descritas por Gregory *et al.* (1984), a partir de riñones de cerdo frescos recién sacrificados, que se obtenían en el matadero de Mercamurcia (El Palmar, Murcia). La enzima purificada se denomina pteroylpoliglutamil- γ -carboxipeptidasa o folato conjugasa; EC3.4.22.12. Para su obtención los riñones fueron descapsulados, y una porción de 400g de tejido renal se homogeneiza en un Omnimixer modelo 17106 (OMNI) con 1200ml de 2-mercaptoetanol 10mM a 2°C (baño de hielo). La

suspensión obtenida se ajusta a pH 5,0 con ácido acético 1,0M. Seguidamente, se centrifugó a 10.000giros (o 7.500 rpm) a 2°C durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada Beckman, modelo J2-21. El sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2L, el cual se introdujo en un baño a 50°C durante 2 horas en agitación continua. Trascorrido este tiempo se recentrifugó a 7.500 rpm durante 20 minutos a 2°C. La fracción sobrenadante se precipitó entre el 50 y el 75% de saturación con amonio sulfato. Se recentrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante reservando el precipitado, el cual fue resuspendido en un volumen mínimo de 0,05 M de acetato potásico, pH 5,0, conteniendo 2-mercaptoetanol 10mM. Este volumen de precipitado se introdujo en una membrana de diálisis de unos 40cm de longitud, 21,5mm de diámetro y con tamaño de poro para el paso de moléculas de 12-14.000 daltons de peso, que se introduce en un matraz Erlenmeyer con 2L de tampón 0,05 M durante toda una noche.

El dializado con la preparación de conjugasa dio lugar a un volumen aproximado de 110ml (24mg de proteína /ml), los cuales fueron almacenados en pequeñas porciones a -35°C hasta su uso. Esta preparación es estable al menos 10 meses bajo estas condiciones de almacenamiento.

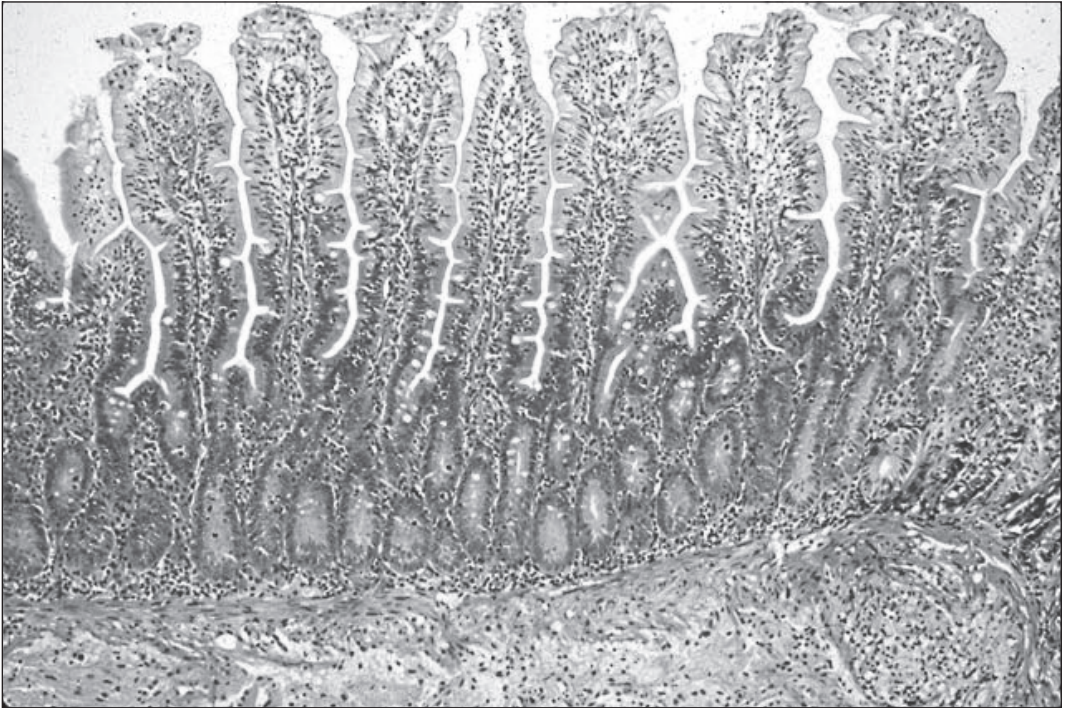


Figura 1. **Mucosa yeyunal normal, corte histológico a bajo aumento que muestra las vellosidades, que constituyen más de los 2/3 superiores de la mucosa: son delgadas y de bordes laterales ondulados. En el extremo apical se localiza la enzima γ -glutamihidrolasa o folato conjugasa**

Preparación de las muestras

Extracción de folatos

Los folatos, generalmente, son extraídos de la matriz del alimento mediante dilución en tampón (pH próximo a la neutralidad entre 6,5 y 7,85) con adición de antioxidantes y aplicando un tratamiento de calor (Figura 1). La preparación de las muestras y los estándares se debe realizar en condiciones de reducida luminosidad (casi a oscuras) y evitando el contacto con el aire, preferiblemente bajo atmósfera de nitrógeno a fin de proteger los compuestos folatos. En el caso de muestras frescas se deben tomar de 10 a 12g, y si la muestra es liofilizada se

pesará aproximadamente 1g. Se le adiciona 25ml de tampón Ches-Hepes (Sigma-Aldrich), 50mM Ches/50 mM Hepes (ajustado pH 7,85 con KOH) y conteniendo 2% de ascorbato sódico y de 2-mercaptoetanol 10 mM. Se homogeneizó la muestra en Omnimixer, sometiendo a las muestras a atmósfera de nitrógeno durante 10 segundos. Los tubos se introdujeron en un baño en ebullición durante 10 minutos, mantuvieron el baño en agitación constante. Tras este tiempo, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en hielo. Una vez las muestras están frías, se homogeneizan y transfieren a matraces de 50ml donde se enrasan con tampón de extracción. Se ajusta el pH hasta 4,9 (con HCl 6N), y se aplica de nuevo nitrógeno a las muestras a fin de evitar

la oxidación. Estos extractos se pueden almacenar a -20°C hasta su utilización (Pfeiffer *et al.*, 1997, Konings, 1999).

Purificación de los folatos

La mayoría de los folatos en los alimentos se encuentran en forma de poliglutamatos en los alimentos, requieren para su análisis cromatográfico ser hidrolizados enzimáticamente a formas mono o di-glutamatos antes de poder ser cuantificados. Las fuentes más comunes de enzimas conjugadas (γ -glutamildhidrolasa, EC 3.4.22.12) son las provenientes de páncreas de pollo (utilizada preferentemente en el método microbiológico), la proveniente de riñón (de cerdo), y las de plasma (humano o de rata) (Leichter *et al.*, 1979). En el caso del método cromatográfico las enzimas más usadas son las de riñón de cerdo y plasma, ya que dan lugar a monoglutamatos como producto final de reacción. La elección de la enzima correcta es, por tanto, esencial para obtener unos resultados óptimos. Para la obtención de los folatos de los alimentos se toman 5ml de extracto de cada una de las muestras objeto de estudio (ajustadas previamente a pH 4,9 debido a que es el óptimo de actuación de la enzima conjugada) y se les adiciona 1ml de solución de α -amilasa (20 mg de amilasa/ml de ascorbato 1%, A-0273, Sigma Chemical Co.) y 1ml de solución de conjugada de riñón de cerdo (Gregory *et al.*, 1984). Se les aplica nitrógeno para crear una atmósfera no oxidante, y posteriormente se les introduce en un baño de agua durante 3 horas a 37°C con agitación constante. Pasado este tiempo, el pH se ajusta a 7,0, añadiendo posteriormente 1ml de proteasa (2 mg de proteasa/ml de ascorbato 1%, P-5147, Sigma Chemical Co). Se les aplica de nuevo nitrógeno y se introducen en un baño a 37°C durante 1 hora, llevándose seguidamente a ebullición durante 5 minutos, a fin de inactivar la actividad enzimática. Inmediatamente tras la ebullición las muestras son enfriadas en hielo, tras lo cual, se filtran (filtros desechables

Whatman, de nylon con lecho de polipropileno, de 25 mm de diámetro y 0,45 mm de tamaño de poro). Las muestras así preparadas deben ser purificadas. Muchos procedimientos de purificación incluyen el intercambio iónico fuerte a través de sílice u otras resinas (Rebello, 1987), de tal forma que los folatos son retenidos en base a sus cargas y recogidos con tampones apropiados o soluciones de elución (Vatheristo *et al.*, 1996). Es precisa la preparación de las columnas de afinidad o cartuchos (Figura 1) (columnas LiChrolut, para extracción en fase sólida intercambio fuerte de aniones -SAX-, 500 mg), ya que se debe evitar que la columna quede seca. Para ello se lava el cartucho con hexano, seguido de metanol, agua mili-Q y finalmente se hace pasar el tampón pH 7,0 (solución de purificación). Se vierten entonces las muestras en los cartuchos y se les deja pasar lentamente. Antes de que acaben de pasar las muestras se debe ir lavando con agua mili-Q las paredes del cartucho. Posteriormente, se les añade entre 2 y 2,5ml de solución de elución que serán recogidos en viales previamente pesados. El volumen recogido será pesado, y esta es la muestra que será analizada en HPLC.

Análisis de folatos con HPLC

Previamente al análisis el sistema debe ser estabilizado para lo que se hace pasar un gradiente de acetonitrilo y tampón fosfato potásico 30 mM, pH 2,2, reactivos que conforman la fase móvil, en la misma proporción con la que comienza el gradiente para la separación de las muestras.

El tiempo de adquisición de datos en cada muestra es de 15-30 minutos. Entre la inyección de una muestra y la siguiente se establece un tiempo de estabilización del sistema que puede oscilar entre 30 y 40 minutos. El flujo se fija en 0,9ml/min. Dependiendo de las muestras el volumen de inyección usado puede variar entre 25-300 μl , aunque el volumen más común es de 40 μl (Pfeiffer *et al.*, 1997; Konings, 1999). El

sistema HPLC empleado (Merck-Hitachi, 7000) está equipado con una bomba cuaternaria de gradiente, loop de inyección de 100 µl, sistema de muestreo automático, columna en interior de horno con temperatura ajustada a 35° C, detector de fluorescencia con unos valores de excitación y emisión de 280 y 350 nm respectivamente, y detector de ultravioleta con una longitud de onda de 290 nm (LaChrom, Merck-Hitachi). La columna usada es LiChrocart® 250-4 mm, HPLC Cartridge, con precolumna: LiChrocart®4-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)guard columns, a fin de evitar la entrada de impurezas.

Las formas monoglutámicas THF, 5-MTHF y 5-FTHF pueden ser detectadas tanto en el detector de fluorescencia como en ultravioleta (Figura 2). El ácido fólico únicamente es visible en el rango de ultravioleta.

Cuantificación:

La cuantificación está basada en un método de estándar externo (Vahteristo, 1998). Se utiliza una recta de calibración. El área del pico problema se obtiene sustituyendo en la ecuación de la recta. Las rectas y ecuaciones obtenidas para cada patrón son las siguientes: $y = 23.089x - 12.916$, para el THF; $y = 36.762x - 22.419$, para el 5-MTHF; $y = 1498,6x - 1533,5$, para el 5-FTHF; $y = 111,94x - 224,44$ para el AF, en las que «x» representa la concentración en ng/ml e «y» representa el área obtenida en el cromatograma.

Test de recuperaciones:

Los test de recuperación fueron realizados por adición de soluciones estándar a la muestra antes de la homogenización. Las muestras así marcadas fueron sometidas al proceso completo. Las recuperaciones fueron calculadas de acuerdo con Rodríguez *et al.*, 1995 como $R = (C_{\text{hallada}} - C_{\text{muestra}}) / C_{\text{añadida}}$, donde C_{hallada} es la concentración en la muestra marcada, C_{muestra} es la

concentración en la muestra antes de marcar y $C_{\text{añadida}}$ es la cantidad conocida de estándar añadido.

Análisis estadístico:

Para ver la variabilidad de los resultados entre los laboratorios y las formas de folato individualmente por MCR, y entre el método de HPLC y el método microbiológico se realizará un análisis multivariante (ANOVA), aplicando niveles de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación

La separación de las distintas formas monoglutámicas es óptima mediante los detectores de ultravioleta y fluorescencia (Figura 2 A y B). En el caso del detector de ultravioleta se observaron nítidamente las cuatro formas (THF, 5-MTHF, 5-FTHF y PGA); mientras que el detector de fluorescencia no permitió observar el PGA, ya que no es sensible a la luz fluorescente. La columna usada es LiChrocart® 250-4 mm, con la que se consiguió una óptima separación de las diferentes formas. Para conseguir una mayor separación de los compuestos folatos de las impurezas, previa a la columna se colocó una precolumna compatible: Lichrocart,4-4. Los tiempos de retención, en minutos, para cada compuesto eran repetibles y reproducibles y estaban fijados en: $8,58 \pm 0,05$ para el THF, $10,65 \pm 0,038$ para el 5-MTHF, $15,85 \pm 0,01$ para el 5-FTHF y $16,72 \pm 0,01$ para el PGA. La adición de antioxidantes como el ácido ascórbico y el 2-mercaptoetanol no interfiere en la detección de dichos compuestos ni en sus tiempos de retención. El uso de antioxidantes está indicado debido a la susceptibilidad de los folatos en condiciones oxidativas. El más comúnmente usado es el ácido ascórbico, pero tioles como el 2-mercaptoetanol o el ditiotreitól también están indicados. Se recomienda el uso de ácido ascórbico (2%)

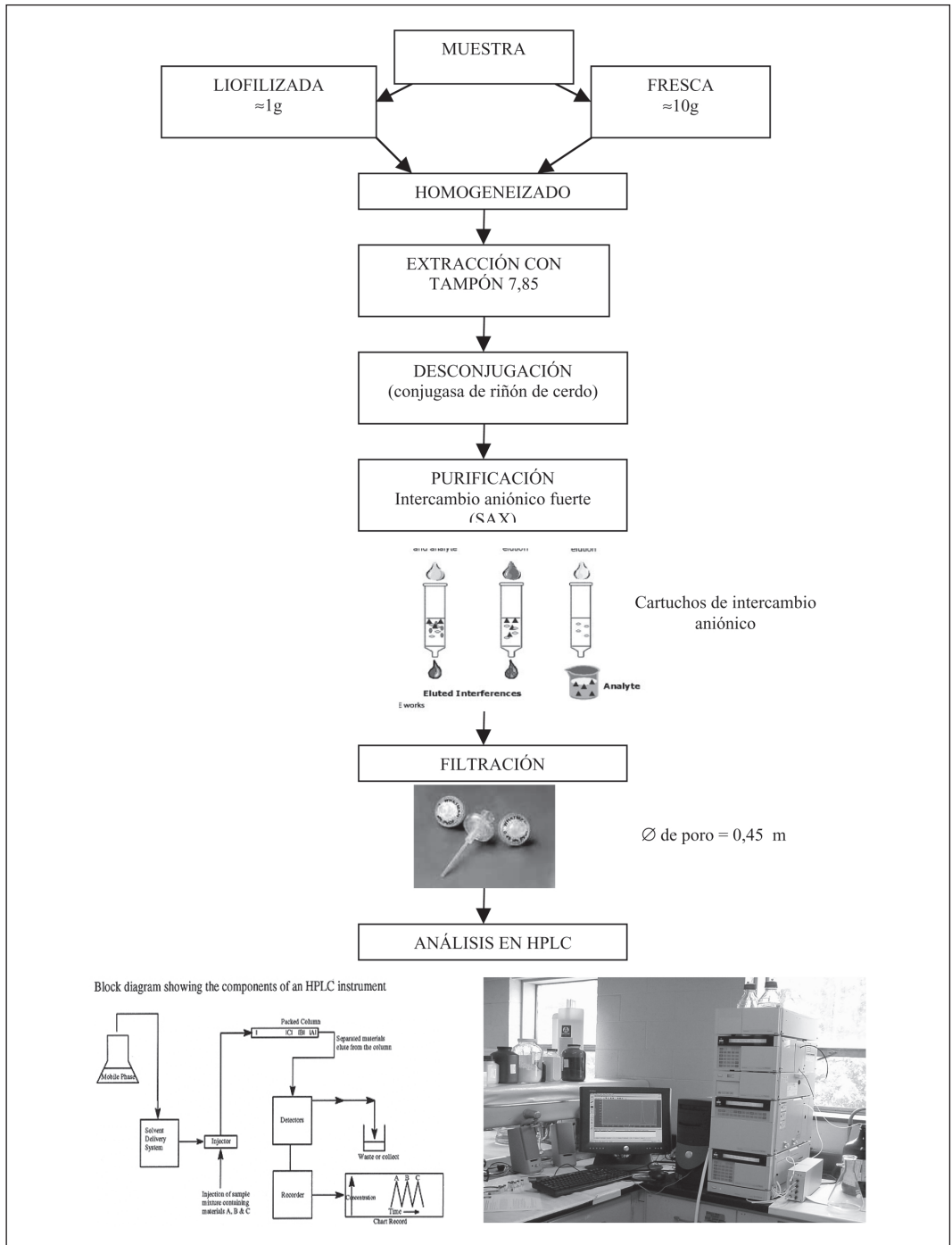


Figura 2. Esquema de procesado en el método cromatográfico.

junto al 2-mercaptoetanol ya que aseguran la estabilidad de compuestos tan lábiles como el 10-formil tetrahidrofolato y otros a pH 7,85, al mismo tiempo que el ácido ascórbico otorga una mayor estabilidad en estas condiciones alcalinas (Wilson y Horne, 1984).

Las recuperaciones obtenidas en la fase de purificación a través de los cartuchos oscilaron entre el 75 y el 100% para THF, 70-99% para 5-MTHF, 80-100% para el 5-FTHF y 99-100% para el PGA. Estas recuperaciones fueron verificadas con diferentes estándares, marcando las muestras antes de la extracción, con las que se realizaban ensayos por triplicado y a diferentes concentraciones. Recuperaciones menores del 100% indican que los niveles de folatos determinados pueden ser demasiado bajos. Por otro lado, se han estimado altas variaciones en las recuperaciones de formas como el 5-MTHF entre diferentes productos lácteos, con lo que se utilizaron diferentes factores de corrección para cada alimento (Wigertz *et al.*, 1997).

La estabilidad de las soluciones de patrones en stock era comprobada regularmente, previo a cada análisis por inyección de las soluciones de trabajo en el sistema LC, a fin de comprobar que las concentraciones se correspondían con las determinadas cuando dichas soluciones fueron preparadas para su almacenamiento.

La respuesta del sistema fue lineal en el rango de concentraciones entre 0-100ng/ml para todos los derivados folatos. Estos límites se establecen porque es el rango que comprende los valores o concentraciones que se estiman en alimentos. El límite de detección se estableció en 25 ng/ml en el caso de AF, de 2,11 ng/ml para el 5-MTHF, 23,87ng/ml para el 5-FTHF y 1,78 ng/ml para el THF.

La optimización del método cromatográfico ha llevado a la selección del tampón de extracción pH 7,85 con sodio ascorbato y 2-mercaptoetanol (Vahteristo *et al.* 1996 y Pfeiffer *et al.* 1997). La enzima utilizada fue conjugasa de riñón de cerdo (Gregory *et al.* 1984), por ser sus

productos de desconjugación derivados monoglutamatos. Esta enzima tiene un pH óptimo de acción de 4,9. Cada vez que es preparada debe ser comprobada su actividad frente al ácido Pteroilglutámico (PteGlu3). Una vez preparada se almacena a -80°C, con un tiempo máximo de almacenamiento en estas condiciones de 3 meses.

La adición de α -amilasa y proteasa fue indicada por autores como De Souza y Eitenmiller en 1990 y Martin en 1995, sobre todo para la purificación de muestras con alto contenido en almidón, como es el caso de los vegetales o de proteína como en el caso de muestras cárnicas. En este estudio la optimización del proceso llevó a la utilización de conjugasa únicamente, debido a los resultados más claros obtenidos con esta enzima.

Tras el proceso de desconjugación, se procede a la purificación de los extractos de muestra. El procedimiento de elección fue el intercambio aniónico fuerte (o SAX) combinado con SPE o extracción en fase sólida. Para ello, se utilizan cartuchos con lecho de resina (columnas LiChrolut®), para concentrar los folatos. Tras el paso de los extractos a través de dichos cartuchos, estos son recogidos con la solución de elución y quedan así preparados para su detección en el HPLC.

Aplicación en la valoración de la calidad nutricional de folatos en alimentos

La validación del método se llevó a cabo mediante el análisis de los Materiales Certificados de Referencia o CRM, siguiendo las indicaciones de la FDA (2001) y de la IUPAC (Thompson *et al.*, 2002). Dichos CRM, fueron sometidos a los procesos de extracción, desconjugación, purificación y separación, a fin de determinar y cuantificar las formas monoglutámicas presentes en cada uno de ellos (Cuadro 2). Así se puede comprobar que los datos obtenidos son similares a los existentes en la bibliografía acerca de contenido de folatos en estos CRM (Figura 3).

Cuadro 2. Determinación del contenido de monoglutamatos en los diferentes materiales de referencia

MCR	Formas monoglutámicas	1	2	3	Media±Ds (µg/100g PS)	Total (µg/100g PS)
Hígado de cerdo (487)	THF	402,78	436,1	429,77	422,63±17,70 252,30±13,60	674,93
	5-MTHF	257,68	237,13	262,84		
	5-FTHF	nd	nd	nd		
	AF	nd	nd	nd		
Leche en polvo (421)	THF	0,69	1,04	0,41	0,66±0,32 21,33±3,38 68,01±4,19	90,00
	5-MTHF	23,31	23,63	17,63		
	5-FTHF	nd	nd	nd		
	AF	67,54	72,52	64,20		
Harina integral (121)	THF	12,05	6,06	9,42	8,83±3,00 81,74±7,99	90,57
	5-MTHF	74,7	90,53	80,77		
	5-FTHF	nd	nd	nd		
	AF	nd	nd	nd		
Mezcla de hortalizas (485)	THF	nd	nd	nd	210,52±9,59	210,52
	5-MTHF	218,43	199,95	213,61		
	5-FTHF	nd	nd	nd		
	AF	nd	nd	nd		

MCR= material certificado de referencia.

nd = no detectado o cantidades inferiores a los límites de detección (ver sección Validación)

PS = peso seco.

1, 2, 3 = ensayo por triplicado de las muestras.

Comparando los datos procedentes de la técnica cromatográfica con los obtenidos mediante el método microbiológico (Konings *et al.*, 1999) se observa que, en general, el contenido de folatos es superior en el método microbiológico. Este es el método Oficial aprobado de la AOAC, y que permite valorar el contenido de folatos totales en alimentos. Por su comodidad es el método utilizado de forma usual (Finglas *et al.*, 1993). Este método no puede diferenciar entre formas distintas de folatos. El organismo comúnmente usado es el *Lactobacillus rhamnosus* variedad *Casei* quien responde a la presencia de monoglutamatos, así como a los di y triglutamilfolatos (Martín, 1995) pero con crecimiento diferente. No obstante, ciertos compuestos pue-

den estimular o inhibir el crecimiento bacteriano dando lugar a resultados no reales. La extracción de folatos de la matriz del alimento sigue un proceso similar en ambas técnicas, basado en la extracción mediante un tampón fosfato. Tras la extracción sigue el tratamiento enzimático, la desconjugación y tras esto la siembra en placa de la muestra junto al microorganismo. Tras 18-22 horas de incubación a 37°C se valora el crecimiento y se cuantifica la cantidad de folatos totales. Así se demuestra que los métodos usados anteriormente pueden no haber sido aplicados con las óptimas condiciones de extracción (DeSouza *et al.*, 1990, Pfeiffer *et al.*, 1997, Tamura *et al.*, 1997). El uso de métodos optimizados para el análisis de folatos en ali-

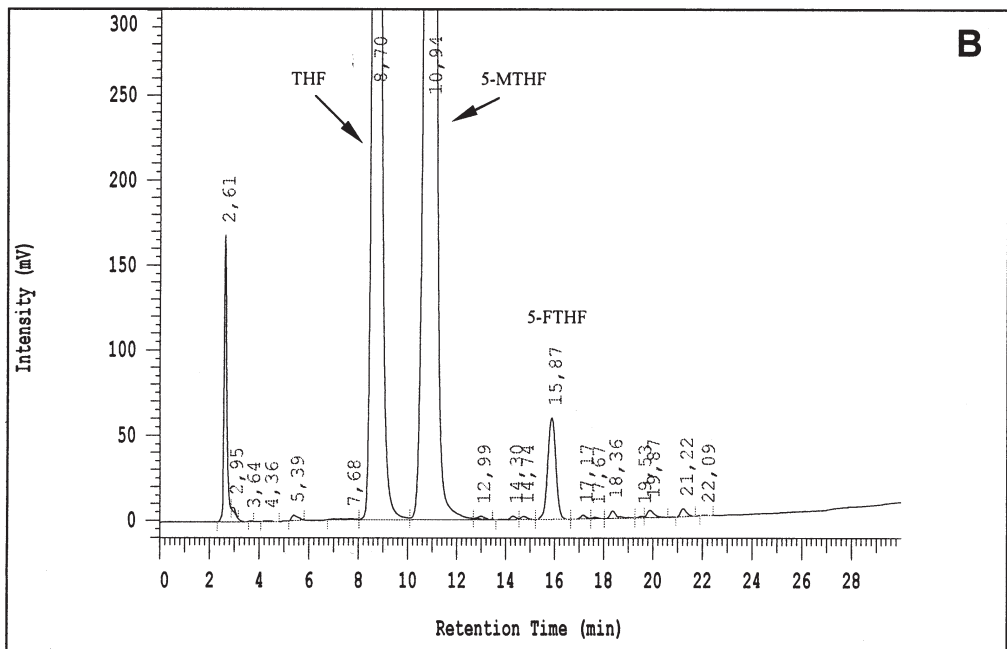
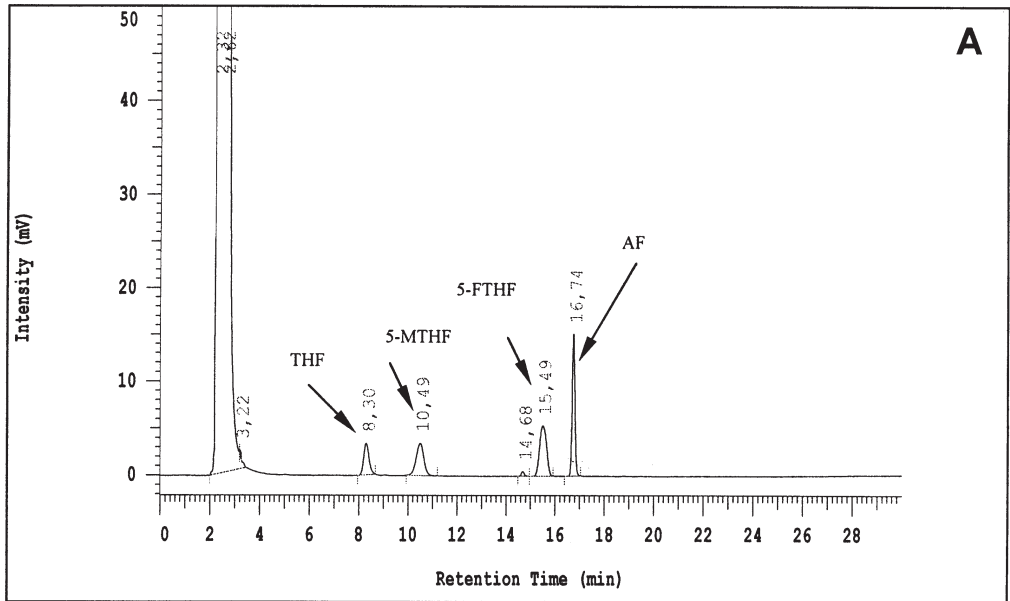


Figura 3. Cromatograma obtenido mediante el detector de Ultravioleta (A) y Fluorescencia (B) de una mezcla de los estándares; THF = tetrahidrofolato; 5-MTHF = 5-metiltetrahidrofolato; 5-FTHF = 5-formiltetrahidrofolato y AF = ácido fólico.

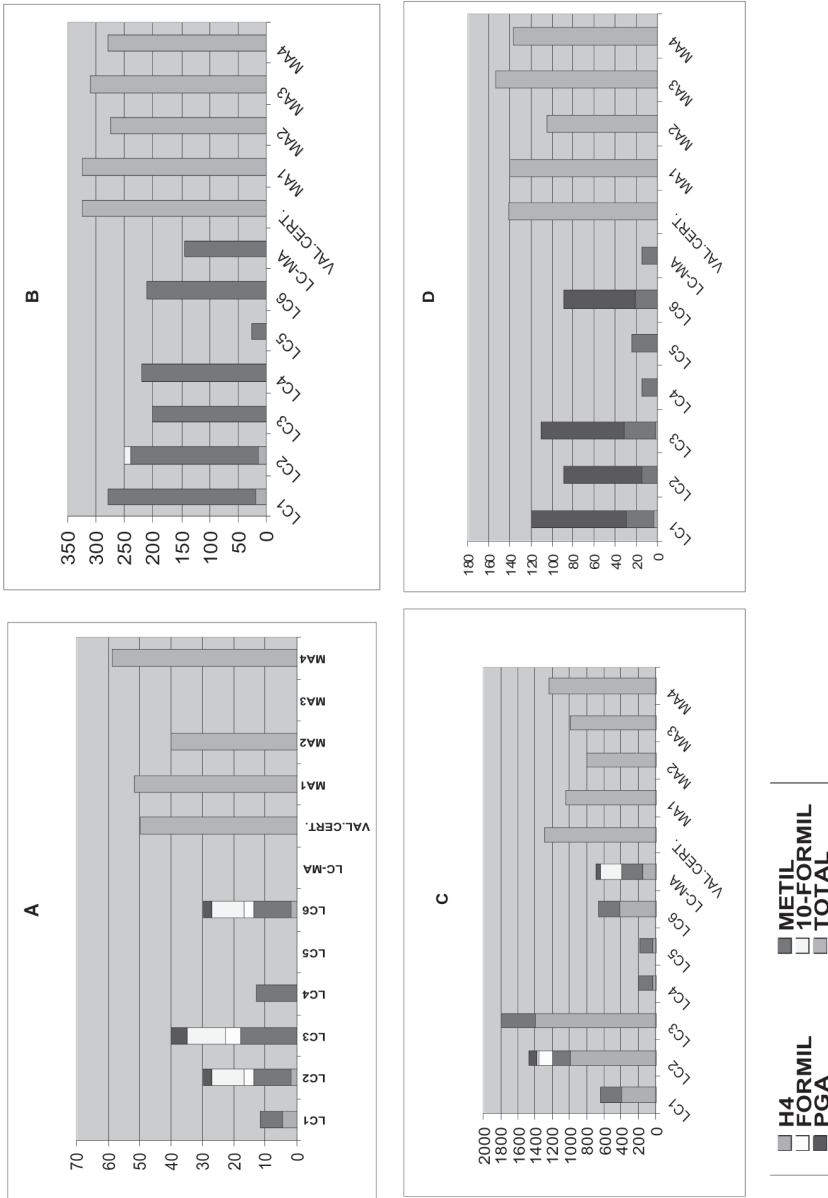


Figura 4. Esquema comparativo de los resultados para los MCR (A= Harina integral; B= Mezcla de hortalizas; C= Hígado de cerdo; D= Leche en polvo) descrito en la sección de materiales y métodos, por técnicas de cromatografía líquida (LC) y por diferentes laboratorios: Suecia (LC1); Finlandia (LC2); Holanda (LC3), (Konings, 1999); Reino Unido (LC4, BRI, Brewing Research Internacional); Reino Unido (LC5, IFR, Institute of Food Research) y España (LC6, Universidad de Murcia); así como métodos combinados de cromatografía líquida y microbiología (LC-MA) de Alemania; frente a los resultados microbiológicos (MA) de Italia (MA1), Holanda (MA2), Reino Unido (MA3) y Suecia (MA4). El valor certificado (VAL-CERT) hace referencia al método microbiológico.

mentos pueden tener como resultados unos datos más reales.

El interés del método cromatográfico (Figura 1), en consecuencia, radica en el hecho de que es capaz de detectar y discriminar las diferentes formas monoglutámicas presentes en los alimentos analizados, lo que permite la cuantificación de cada una de ellas por separado. Numerosos estudios han demostrado que la biodisponibilidad de los folatos presentes de forma natural en la dieta es menor que la del ácido fólico sintético utilizado para el enriquecimiento de alimentos (Saubertlich *et al.*, 1987, Brouwer *et al.*, 1999). Esto es debido a que los folatos presentes en la dieta están, en su mayoría, en forma de poliglutamatos conjugados y, como ya se explicó, estos poliglutamatos deben ser desconjugados hasta formas monoglutámicas para su correcta absorción a nivel intestinal. El ácido fólico es una forma monoglutámica y esto explica su mayor accesibilidad. De ahí que para conocer la proporción real de folatos de la que el organismo va a disponer cuando se ingiere un alimento, lo ideal es conocer la cantidad de formas monoglutámicas y cuales son, puesto que la accesibilidad también depende del tipo de monoglutamato del que se trate. Este objetivo se consigue con el método cromatográfico, lo que es esencial para el conocimiento del aporte exacto de folatos de la dieta y si estos folatos serán realmente útiles para el organismo. Así, comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros laboratorios para los mismos CRM (Figura 4), utilizando los dos métodos, cromatográfico y microbiológico, se observa que, en general, los resultados procedentes del método microbiológico son superiores en todos los casos, excepto en la muestra de hígado de cerdo (CRM 487). El hecho de obtener resultados más altos mediante el método microbiológico es debido a que esta técnica sobrestima la cantidad de folatos totales, puesto que no discrimina entre las diferentes formas de folatos (Martin, 1995), y además pueden existir determinados compuestos no folatos contenidos en la mues-

tra, que pueden estimular o inhibir el crecimiento microbiano, con lo que pueden obtenerse datos no reales (Konnings, 1999). Los datos de contenido de folatos en nuestro laboratorio, son muy similares a los datos obtenidos por cromatografía en los laboratorios de Suecia (LC1), Finlandia (LC2) y Holanda (LC3) en todos los casos. No obstante, se puede observar que nuestros resultados son siempre inferiores a los aportados por los laboratorios mencionados, en un rango de 2 al 30%. Esto puede deberse al hecho de que en nuestro método optimizado solamente se utiliza la enzima conjugasa (no α -amilasa ni proteasa), y está demostrado que con el método trienzimático se obtiene una más completa extracción de los folatos desde la matriz de los alimentos (De Souza y Eitenmiller, 1990; Martin, 1995). Así en el CRM de hígado de cerdo, el contenido en folatos totales obtenido en nuestro laboratorio es algo inferior que en el resto debido a la no utilización de proteasa; lo mismo ocurre con la harina integral al no añadir amilasa, ya que estas muestras son ricas en proteína y almidón respectivamente. En el caso del hígado de cerdo la diferencia entre los datos es mayor de 30%, pero también se puede ver en la gráfica que en este MRC la variabilidad de los resultados es mayor que en el resto de muestras analizadas. No obstante, los resultados presentan unos niveles aceptables de acuerdo a los resultados presentados de otros autores, tanto en el caso de método cromatográfico como mediante el método microbiológico (Konnings, 1999).

CONCLUSIÓN

Este método puede ser considerado como un método fiable y reproducible para alimentos con diferentes matrices. Las estimaciones de formas monoglutámicas en las muestras analizadas guardan una relación satisfactoria con los resultados obtenidos por otros laboratorios en muestras similares. De esta manera, podemos afirmar que la optimización del método cromatográfico, pre-

sentada en este estudio permite unos resultados fiables para la determinación de las distintas formas de folatos en alimentos de diferentes orígenes.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión europea por la financiación del Proyecto: «Folate: From food to functionality and optimal health» (QLK1-1999-00576). Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por los proyectos AGL2000-2482-CE y AGL2003-03598 (Funcionalidad de los folatos naturales frente a suplementos en zumos de frutas y sopas de hortalizas).

BIBLIOGRAFÍA

- Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S., Motulsky A.G. 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J. Am. Med. Assoc.* 274: 1049-57.
- Brouwer I.A., van Dusseldorp M., Wets C.E., Steegers-Theunissen R.P.M. 2001. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in humans. *Nutr. Res. Rev.* 14:267-293.
- Brouwer I.A., van Dusseldorp M., West C.E., Meyboom S., Thomas C.M., Duran M., van het Hof K.H., Eskes T.K., Hautvast J.G., Steegers-Theunissen R.P. 1999. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled study. *J. Nutr.* 129(6):1135-9.
- Centers For Disease Control. 1992. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR (morbidity and mortality Weekly Report)* 41 (RR-14):1-7.
- Chandler C.J., Wang T.T.Y., Halsted C.H. 1986. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human yeyunal brush borders. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 261: 928-933.
- Czeizel A.E., Dudás I. 1992. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. England J. Med.*; 327: 1832-5.
- de Jong R.J., Verwei M., West C.E., van Vliet T., Sebelink E., van der Berg H., Castenmiller J.J.M. 2004. Bioavailability of folic acid added to pasteurized and UHT-treated milk in humans. En: *First international conference on folates: analysis, bioavailability and health.* Warsaw Agricultural University Press. pp 217-218.
- De Souza S., Eitenmiller R. 1990. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radio assay. *J. Micro Nutr. Anal.* 7: 37-57.
- Finglas P.M., Faure U., Southgate D.A.T. 1993. First BCR-intercomparison in the determination of folates in food. *Food Chemistry.* 46: 199-213.
- Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001. U.S. Department of Health and Human Services; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM). pp. 2-16.
- Giovannucci E., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rimm E.B., Trichopoulos D., Rosner B.A., Speizer F.E., Willett W.C. 1993. Folate, methionine and alcohol intake and risk of colorectum adenoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 875-84.
- Gregory J.F. 1997. Bioavailability of folate. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51:S54-S59.
- Gregory J.F. 1989. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv. Food Nutr. Res.* 33: 1-101.
- Gregory, J.F. 1996. Vitamins. En: *Food Chemistry*, 3rd. Fennema, O.R. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 531-616.
- Gregory J.F., Sartain D.B., Day B.P.F. 1984. Fluorometric determination of folacin in bio-

- logical materials using high performance liquid chromatography. *J. Nutr.* 114: 341–353.
- Kehlenbach U., Nau H. 2004. HPLC coupled with Microbiological Assay for the determination of folate monoglutamates in foodstuff and biological samples. En: First international conference on folates: analysis, bioavailability and health. Warsaw Agricultural University Press. 'pp 20-22.
- Konings E.J.M. 1999. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *J.A.O.A.C. International.* 82(1): 119–127.
- Martin C.A. 1995. Folate analysis in foods. *BNF Nutrition Bulletin.* 20:8-15.
- Leichter J., Landymore A.F., Krumdieck C.L. 1979. Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effects on the determination of free folate content. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 92-95.
- Pfeiffer C.M., Rogers L.M., Gregory J.F. 1997. Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 45(2): 407–413.
- Rebello T. 1987. Trace enrichment of biological folates on solid phase adsorption cartridges and analysis by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 166: 55-64.
- Rodríguez L.C., Campana A.M.G, Barrero F.A, Linares C.J., Ceba, M.R. 1995. Validation of an analytical instrumental method by Standard addition methodology. *J.A.O.A.C. International* 78(2), 471-476.
- Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. 1987. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.* Dec. 46(6):1016-28.
- Tamura, T., Mizuno, Y., Johnston K.E., Jacob, R.A. 1997. Food folate assay with pectinase, α -amylase and folate conjugase treatments. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 135-9.
- Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R. 2002. IUPAC Technical Report. Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835-855.
- Vahteristo L. 1998. Food folates and their analysis: Determination of folate derivatives and their stability by high-performance liquid chromatography. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Doctoral Thesis. University of Helsinki. pp. 10-18.
- Vahteristo L.T., Ollilainen V., Koivistoinen P.E., Varo P. 1996. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 44(2): 477–482.
- Van den Berg H., Finglas P.M., Bates C. 1994. FLAIR intercomparisons on serum and red cell folate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 64: 288–293.
- West Saiter C., Bailey L.B. 2000. Dietary folate equivalents: Interpretation and application. *J. Am. Dietetic Association.* 100: 88-94.
- Wigertz K., Svensson U.K., Jägerstad M. 1997. Folate and folate-binding protein content in dairy products. *J Dairy Res.* 64: 293-252.
- Wilson S.D., Horne D.W. 1984. High-performance liquid chromatographic determination of the distribution of naturally occurring folic acid derivatives in rat liver. *Anal. Biochem.* 142: 5529-535.

