



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN
RIBOFLAVINA

Autor: Marta Ceniceros López

Fecha: Julio

Tutor: Elena Rodríguez Rodríguez

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Estructura y propiedades de la riboflavina	3
2.2. Fuentes de riboflavina.....	3
2.3. Transporte y metabolismo de la riboflavina.....	3
2.4. Almacenamiento y excreción de la riboflavina.....	4
2.5. Funciones en el organismo de la riboflavina.....	4
2.6. Ingestas recomendadas de riboflavina.....	5
2.7. Toxicidad de riboflavina.....	6
2.8. Déficit en riboflavina.....	6
2.9. Métodos para determinar el estado nutricional en riboflavina.....	6
3. OBJETIVO.....	7
4. METODOLOGÍA.....	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
5.1. Parámetros funcionales para evaluar el estado nutricional en riboflavina	7
5.2. Parámetros estáticos para evaluar el estado nutricional en riboflavina.....	8
5.2.1. Tipos de muestras	9
5.2.2. Técnicas instrumentales empleadas.....	11
○ Cromatografía de líquidos (HPLC).....	11
▪ Detección UV-Vis.....	13
▪ Detección fluorimétrica	13
▪ Detección por espectrometría de masas....	14
○ Cromatografía electrocinética capilar (MEKC).....	15
▪ Detección con UV-LED	17
▪ Detección LIF	18
6. CONCLUSIONES.....	18
7. BIBLIOGRAFIA.....	18

1. RESUMEN

La riboflavina (vitamina B₂) es una vitamina hidrosoluble que en caso de déficit puede producir diferentes patologías, por ello, es importante su detección clínica.

Para evaluar el estado nutricional en riboflavina existen parámetros funcionales, como la medida del coeficiente de activación del glutatión reductasa de los eritrocitos (EGRAC) y parámetros estáticos, basados en la determinación directa de las diferentes formas de la riboflavina (B₂), flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN).

La medida del EGRAC, junto con los valores urinarios de vitamina B₂, proporciona información completa sobre el estado nutricional del individuo. La FMN eritrocitaria puede ser utilizada como parámetro del estado poblacional además de en individuos específicos mientras que la riboflavina plasmática sólo se utiliza como parámetro poblacional por su variabilidad interindividual o en individuos en regímenes de suplementación.

Para la determinación directa de riboflavina, el método más utilizado es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica por ser el método más económico. Sin embargo, el HPLC acoplado a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) y la cromatografía micelar cinética (MECK) son técnicas más sensibles y selectivas que cada vez son más utilizadas.

Palabras clave: Riboflavina, estado nutricional, métodos analíticos

ABSTRACT

Riboflavin (vitamin B₂) is a water-soluble vitamin that in case of deficit can produce different pathologies, so it is important its clinical detection.

To evaluate the nutritional status in riboflavin there are functional parameters, such as the measurement of the erythrocyte glutathione reductase activation coefficient (EGRAC) and static parameters, based on the direct determination of the different forms of riboflavin (B₂), flavin adenin dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN).

The measurement of EGRAC, together with the urinary values of vitamin B₂, provides complete information on the nutritional status of the individual. Erythrocyte FMN can be used as a parameter of population status in addition to specific individuals while plasma riboflavin is only used as a population parameter because of its inter-individual variability or in individuals on supplementation regimes.

For the direct determination of riboflavin, the most widely used method is high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection as it is the most economical method. However, HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC/MS) and micellar kinetic chromatography (MECK) are more sensitive and selective techniques that are increasingly used.

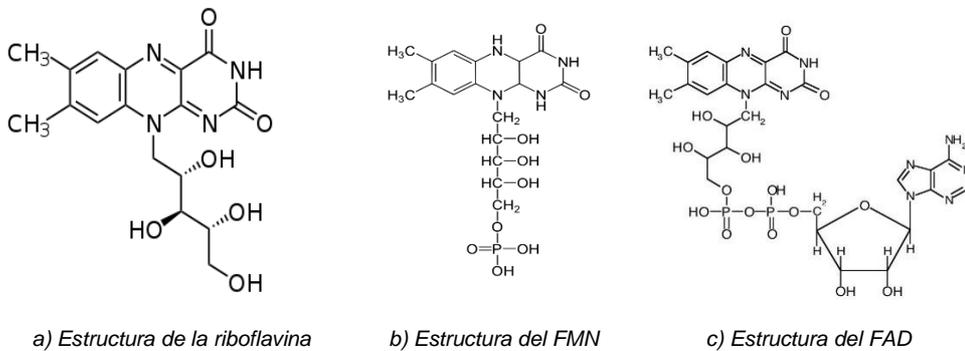
Key words: Riboflavin, nutritional status, methods of analysis

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA RIBOFLAVINA:

La riboflavina o vitamina B₂ forma parte del complejo de vitaminas B hidrosolubles.¹ Su estructura se compone de una base nitrogenada flavina y una pentosa ribitol (derivado de la ribosa)². En el organismo, la riboflavina sufre una fosforilación ATP dependiente dando lugar a su primera coenzima activa, la flavín mononucleótido (FMN) (Figura 1b) también conocida como 5-riboflavin fosfato. Posteriormente, la FMN, a través de una fosforilación ATP dependiente y una unión a uno de los nucleótidos esenciales, la adenina, dará lugar a la flavín adenín dinucleótido (FAD) (Figura 1c). Las dos formas activas, FMN y FAD, que reciben el nombre de flavocoenzimas, participan en una serie de reacciones importantes para el correcto funcionamiento del organismo.^{1,2}

Figura 1. Estructura química de la riboflavina y de sus coenzimas activas.



En cuanto a sus propiedades físico-químicas, en su forma pura es un sólido cristalino amarillo soluble en agua, químicamente estable frente al calor, pero inestable frente a la luz ultravioleta.³ Cuando la riboflavina en solución es irradiada por luz ultravioleta, se degrada dando lugar a dos metabolitos importantes: el lumicromo (LC), predominante a pH ácidos y la lumiflavina (LM), predominante a pH básicos.⁴ La riboflavina es fluorescente bajo la luz ultravioleta.⁵

2.2 FUENTES DE RIBOFLAVINA

La riboflavina se encuentra de manera natural en los alimentos, en diferentes porcentajes. La mayor parte se encuentra en forma de FAD, seguida de una pequeña parte que se encuentra como riboflavina libre, mientras que sólo una ínfima parte, aparece como FMN.¹ La principal fuente de la vitamina son los lácteos y derivados, el hígado, vísceras y carnes como la de ternera, cerdo, cordero y el pescado.^{1,2} El procesado de la comida no disminuye sus niveles debido a su estabilidad frente al calor.^{2,5} Su hidrosolubilidad hace que no sea almacenada en vertebrados.

Para evitar una ariboflavinosis se puede encontrar como suplemento, aunque apenas se usan, ya que no suelen existir deficiencias.²

2.3 TRANSPORTE Y METABOLISMO DE LA RIBOFLAVINA

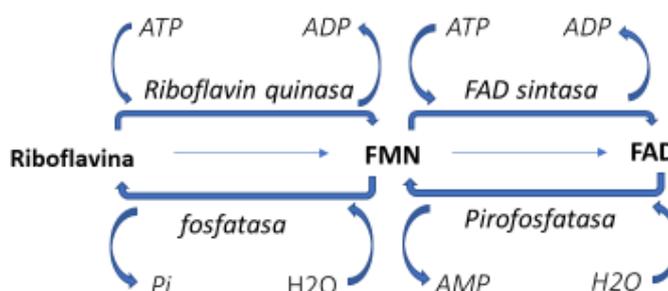
La riboflavina posee una elevada biodisponibilidad, su absorción tiene lugar principalmente en el intestino delgado proximal a través de un proceso de transporte saturable. Las coenzimas FAD y FMN no poseen una biodisponibilidad tan alta como la vitamina libre, deben sufrir un proceso de hidrólisis en las membranas de los enterocitos a través de fosfatasas, antes de ser absorbidas.^{1,5}

La riboflavina libre se transporta ligada a la albúmina o a diversas inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM), que también pueden estar unidas a las coenzimas FAD y FMN.^{3,6}

Las flavoproteínas (FMN y FAD), son biosintetizadas en el organismo a partir de la riboflavina, gracias a la riboflavin quinasa (enzima ATP-dependiente) y a la FAD-adenilil quinasa o FAD sintasa. Estos procesos se producen en el citoplasma intracelular de diferentes tejidos: hígado, intestino delgado, corazón o los riñones.³

El primer paso del metabolismo, catalizado por la riboflavin quinasa, está bajo control hormonal. En el segundo paso, el FMN forma complejos con apoenzimas específicas para formar diferentes flavoproteínas, o es convertido a FAD por la FAD sintasa. Esta conversión a FAD es controlada por el contenido de FAD en los tejidos (si en los tejidos hay exceso, la conversión queda inhibida). (Figura 2)⁵

Figura 2. Metabolismo de la riboflavina.



2.4 ALMACENAMIENTO Y EXCRECIÓN DE RIBOFLAVINA

La mayor parte de la riboflavina en los tejidos, incluidos los eritrocitos, existe predominantemente como FAD y como FMN, unido covalentemente a las proteínas. La FAD y la FMN no ligadas se hidrolizan para liberar riboflavina que se difunde desde las células y se excreta.³

Cuando la ingesta de riboflavina supera la capacidad de los tejidos para almacenarla, ésta se excreta en la orina. En concreto, la riboflavina aparece en un 60-70% en la orina, mientras que el 28-39% aparece en forma de sus metabolitos, LC y LM^{3,7}. Algunos de los metabolitos son utilizados por bacterias del tracto gastrointestinal.

2.5 FUNCIONES EN EL ORGANISMO DE LA RIBOFLAVINA.

➤ A nivel bioquímico:

Las coenzimas FAD y FMN actúan como portadores de protones en las reacciones redox que intervienen en el metabolismo energético como en la síntesis de ácidos grasos o el metabolismo de los aminoácidos, en la reparación del DNA y en la formación de algunas vitaminas y coenzimas.^{1,5} El FAD también se requiere como

cofactor de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que es una enzima clave en el ciclo del folato y se requiere para la formación de 5-metilentetrahidrofolato que, a su vez, interviene en la metilación de la homocisteína a la metionina.^{3,5} La enzima glutatión reductasa utiliza el FAD como cofactor para catalizar la reducción de la forma oxidada de glutatión (GSSG) a la forma reducida (GSH), un paso crítico para mantener el entorno reductor de la célula.^{1,2,3}

➤ A nivel fisiológico:

- Antioxidante: Es la función más importante, se debe a su papel como precursor de FMN y FAD, coenzimas importantes requeridas por enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo, como la Glutathion Reductasa (GR). El GSH, disminuye la cantidad de radicales de oxígeno en el organismo (ROS), dando lugar a una disminución del estrés oxidativo, habiéndose relacionado dicha acción con la disminución del riesgo de patologías como la Diabetes Mellitus ^{1,2,8}
- Anemia: La riboflavina posee un papel importante en la eritropoyesis; mejora la absorción de hierro y ayuda a la movilización de ferritina de los diferentes tejidos. La concentración de hemoglobina puede aumentar gracias a la suplementación con riboflavina.^{1,2}
- Sistema inmune: La riboflavina activa la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos y estimula la multiplicación de neutrófilos y monocitos.²
- Sistema cardiovascular: La deficiencia en riboflavina ha sido relacionada con niveles altos de homocisteína. Éste hecho está ligado a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Además, como hemos comentado anteriormente, la riboflavina posee un efecto antioxidante, evitando así la generación de radicales ROS y evitando patologías como la angina de pecho.¹
- Antiinflamatorio: La riboflavina reduce la respuesta inflamatoria, debido a su inhibición sobre la migración de neutrófilos y acumulación de granulocitos en los sitios periféricos.²
- Otras funciones: mejora patologías como: cataratas, migraña, síndrome premenstrual e hipertensión.^{1,2}

2.6 INGESTAS RECOMENDADAS DE RIBOFLAVINA

Para la determinación de los valores de referencia de la ingesta de riboflavina, se utilizan como base los estudios que investigan principalmente la actividad de la GR en los eritrocitos y la excreción de riboflavina en la orina.^{9,10}

Tabla 1. Ingestas adecuadas de riboflavina en la población española¹⁰.

Grupo	Edad (años)	B ₂ (mg)*
Niños	<0,5	0,4
	0,5-1	0,6
	1-3	0,8
	4-5	0,9
	6-9	1
Varones	10-13	1,4
	14-19	1,7
	20-39	1,6
	40-49	1,6
	50-59	1,5

	60-69	1,5
	>69	1,3
Mujeres	10-13	1,3
	14-19	1,4
	20-39	1,2
	40-49	1,3
	50-59	1,2
	60-69	1,2
	>70	1,3
Embarazo (2ª mitad)		1,5
Lactantes		1,6

*Por intervenir en el metabolismo energético, las ingestas recomendadas de la vitamina se deben incrementar cuando la ingesta calórica sea elevada y se debe tomar como mínimo 0,6 mg/1000 kcal.¹⁰

2.7 TOXICIDAD DE RIBOFLAVINA

Los niveles de riboflavina consumida oralmente de la dieta o de suplementos multivitamínicos raramente causa efectos tóxicos, ya que al ser una vitamina hidrosoluble no se acumula en el organismo.³

2.8 DÉFICIT DE RIBOFLAVINA

La riboflavina es necesaria en diversas reacciones de oxido-reducción, por lo que un déficit en esta vitamina, afecta a diferentes sistemas. ²

La ariboflavinosis en humanos causa varios síntomas como: dolor de garganta, hiperemia, edema en la mucosa oral, queilitis y glositis, pérdida de pelo, inflamación de la cara, desarrollo de cataratas, disminución de hemoglobina y migraña. Además, posee influencia en la absorción de hierro, en el metabolismo del triptófano, en la función mitocondrial y cerebral y en el metabolismo de otras vitaminas.^{3,4} En la mayoría de los casos, los síntomas son reversible a menos que se trate de cambios anatómicos como las cataratas.¹¹

El déficit de riboflavina raramente ocurre individualizado, normalmente es parte de un déficit generalizado de vitamina B por una dieta pobre o por malabsorción. ^{3,7} Es considerado uno de los déficits más comunes en países donde no se consumen alimentos proteicos (huevos, carne, pescados y lácteos) en abundancia. Así pues, aquellos países con una nutrición basada en la dieta mediterránea, la deficiencia aparece fundamentalmente en personas veganas.^{12,13} Además, la deficiencia de riboflavina es frecuente en alcohólicos, en ancianos y en atletas. En los últimos tres grupos, el aumento del estrés oxidativo y la disminución de la absorción en caso de los ancianos, lleva a una mayor demanda de esta vitamina.^{3,12}

2.9. MÉTODOS PARA DETERMINAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN RIBOFLAVINA:

Para la determinación de los niveles de riboflavina existen dos tipos de parámetros:

- Parámetros funcionales:

Son aquellos que miden una prueba bioquímica cuya actividad depende del nutriente estudiado, en este caso la reducción de la actividad de una enzima que necesita un nutriente como coenzima o grupo prostético.

El estado de riboflavina se evalúa mediante el coeficiente de actividad de la eritrocito glutatión reductasa (EGRAC o α -EGR) ^{3,14,16}

➤ Parámetros estáticos:

Son aquellos que miden la concentración de un nutriente concreto o de sus metabolitos principales en los líquidos o tejidos corporales.

La determinación de la vitamina B₂ en muestras biológicas se puede realizar mediante la medida de los niveles séricos o plasmáticos de B₂, FMN o FAD, en glóbulos rojos de FMN y FAD y en orina de B₂. Para poder determinar los niveles de la vitamina en sus diferentes formas existen diferentes técnicas instrumentales, en cuya revisión se va a centrar este trabajo.

3. OBJETIVO.

Realizar una revisión bibliográfica de técnicas instrumentales más utilizadas para la valoración del estado nutricional en riboflavina.

4. METODOLOGÍA.

Para un correcto desarrollo de este trabajo se ha realizado una búsqueda sobre la riboflavina y los métodos analíticos para su determinación en las diferentes bases de datos de publicaciones científicas: Science Direct, Pubmed Google-académico y Research Gate, así como en diferentes bibliotecas on-line como la de la Universidad Complutense de Madrid.

La búsqueda se limitó a la especie humana y se eligieron aquellos trabajos que se referían a la riboflavina en muestras biológicas y no en muestras alimenticias o de preparados farmacéuticos. Se incluyeron tanto revisiones como estudios observacionales y de intervención.

Se hizo una búsqueda de artículos realizados entre el 2000 y 2020. Se usaron las siguientes palabras claves: “riboflavin/vitamin B₂”, para la cual salieron 3194 resultados abiertos en pubmed, “riboflavin analytic status”, para la cual salieron 26 resultados abiertos en science direct, “determination of riboflavin”, para la cual se obtuvieron 1518 resultados abiertos en pubmed, “measurement methods for riboflavin”, para la cual salieron 281 resultados abiertos en pubmed, y “biochemistry of riboflavin”, para la cual se obtuvieron 526 resultados abiertos en pubmed.

En base a los criterios establecidos, finalmente se usaron 38 artículos para llevar a cabo la realización de este trabajo y su revisión bibliográfica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

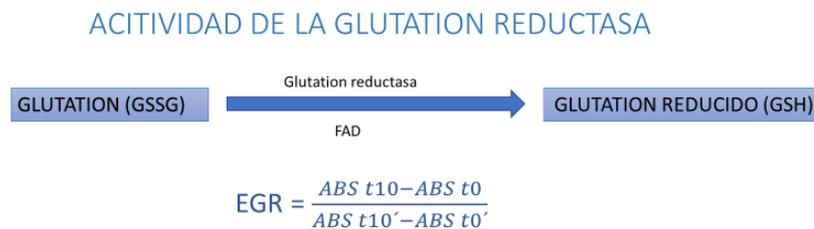
➤ PARÁMETROS FUNCIONALES PARA EVALUAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN RIBOFLAVINA:

- EGRAC

Esta prueba se basa en la medida de la actividad de la enzima EGR y se expresa en términos de coeficiente de activación (AC). Aparentemente, la EGR pierde FAD en una etapa temprana en la deficiencia de vitamina B₂, lo que hace que EGRAC sea un método de detección útil cuando existe deficiencia de esta vitamina.^{3,14,16,17}

Esta enzima cataliza la reducción del GSSG para formar GSH, utilizando FAD como grupo prostético y NADPH para reducir el GSSG. La actividad de esta enzima puede monitorearse por medio del consumo de NADPH, que presenta una valor de máxima absorbancia a 340nm. La actividad del enzima se calcula como la relación entre la actividad de la EGR en glóbulos rojos antes y después de la estimulación in vitro con FAD. La actividad se determina en base a la diferencia de absorbancia de la muestra a t₀ y t₁₀ durante la reacción, con exceso (t) y sin exceso de FAD (t') (Figura 3).¹⁶

Figura 3. Esquema de la prueba EGRAC



Valores de α superiores a 1,40 indican un riesgo alto de déficit de riboflavina. Entre 1,20-1,40 indican riesgo moderado y por debajo de 1,20 indican riesgo bajo. Por lo tanto, el valor de EGRAC proporciona información indirecta sobre el estado de riboflavina, y se considera que indica el grado de saturación de los tejidos con riboflavina.^{4,17}

Los valores de EGRAC y la ingesta dietética de riboflavina están altamente correlacionados, lo que lo convierte en un marcador funcional de riboflavina bien aceptado. Sin embargo, el método requiere eritrocitos frescos y una adecuada estandarización entre laboratorios. El método EGRAC puede ser menos fiable bajo ciertas condiciones, entre ellas la beta talasemia, la conversión lenta de riboflavina en FMN y FAD en los eritrocitos, y el déficit en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.^{3,14,18}

EGRAC es sensible a la ingesta de riboflavina, particularmente por debajo de 1,0 mg/día tanto en los adultos, jóvenes y mayores, pero prácticamente no se ve afectado por las variaciones diarias de la ingesta de riboflavina, ya que existe una saturación de los tejidos por FAD y la EGR deja de utilizarlo.³ Por ello, los valores de la EGR son un biomarcador útil para indicar una deficiencia en riboflavina, pero no para hacer un seguimiento diario del estado nutricional.

➤ 5.2. PARÁMETROS ESTÁTICOS PARA EVALUAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN RIBOFLAVINA:

Debido a las propiedades físicas de la riboflavina, como la absorción de la luz, la emisión de fluorescencia y la electroreducción, se han desarrollado métodos

espectrométricos, fluorimétricos, electroquímicos, cromatográficos y electroforéticos para el ensayo de la riboflavina en las diferentes muestras biológicas: orina y sangre.¹⁹

- 5.2.1. TIPOS DE MUESTRAS
- MUESTRAS DE ORINA

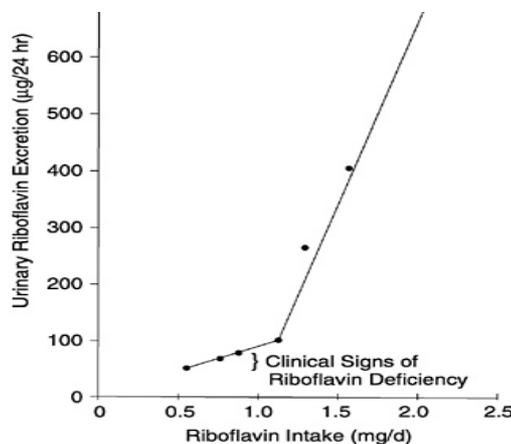
La excreción urinaria de riboflavina refleja la ingesta dietética de riboflavina cuando los tejidos están saturados.³ Como se había descrito anteriormente, la cantidad de exceso de riboflavina se excreta rápidamente a través de la orina porque la vitamina es soluble en agua y no hay capacidad de almacenamiento.^{20,21} La riboflavina libre es la única flavina excretada por el organismo en cantidades significantes y refleja la ingesta a corto plazo.^{21,22}

La riboflavina puede determinarse en orina durante 24 horas o en la orina puntual de primera hora de la mañana y conviene tener en cuenta la creatinina como corrector a la hora de la recolección de la orina para su cálculo.³ Tras recoger las muestras, se centrifugan y se almacenan en frascos de vidrio oscuro a 4°C hasta su determinación.²¹

Los métodos analíticos más utilizados para la cuantificación en muestras de orina humana son la cromatografía líquida (LC) acoplada a fluorescencia, cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la electroforesis capilar (EC)¹⁹.

Para establecer los valores urinarios de B₂ indicativos de deficiencia, se procedió a relacionar, tomando como muestra una población representativa, los valores de excreción urinaria de 24 h con los de ingesta habitual, y determinando el punto intercepción entre las dos líneas de regresión.³ Dicho punto representa el valor en el que los tejidos se saturan de riboflavina y, por lo tanto, la eliminación en orina comienza a aumentar. Este punto corresponde a una ingesta dietética de riboflavina de 1,2-1,3 mg/día, que corresponde a unos valores de riboflavina en orina alrededor de 120µg/24 h³. Tomando como referencia dicho valor y observando los cambios producidos en la gráfica, se estimó que valores de riboflavina en orina inferiores a 40 µg/día indicaban un estado deficiente, valores entre 40 y 120 µg/24 h insuficiencia y valores superiores a 120 µg/24 h suficiencia (Figura 4).^{3,9}

Figura 4. Niveles de ingesta en relación a los niveles urinarios de riboflavina libre



Por tanto, un estudio de la excreción urinaria en orina nos puede dar información sobre el estado de riboflavina en el organismo con respecto a la saturación de tejidos con la vitamina, pero no es un indicador sensible a valores de ingesta inferiores a 1,1 µg/día. Por ello, para poder determinar la existencia de deficiencia es necesario realizar el test EGRAC. Así pues, un coeficiente de activación de la EGR < 1,2 y una excreción urinaria de riboflavina ≥ 120 µg/24 h se consideran indicadores de una ingesta adecuada de riboflavina.^{3,9}

- MUESTRAS DE SANGRE.

La cuantificación de estas tres flavinas en el plasma y en eritrocitos es esencial para el estudio del metabolismo de la riboflavina.⁷

- EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se recogen después de ayuno nocturno, a primera hora de la mañana, mediante venopunción. Se utilizan tubos de EDTA tripotásico para la sangre completa y se centrifugan hasta obtener el plasma. Los eritrocitos se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para recoger el suero, la sangre se recoge en tubos con activador de coagulación y se centrifuga. Los eritrocitos, el plasma y el suero se almacenan a -70 °C hasta su análisis.¹⁸

- SUERO Y PLASMA:

La determinación de riboflavina libre en plasma se considera un marcador más apropiado para el análisis clínico poblacional del estado de la vitamina B₂ que los valores en plasma de FMN o FAD, así como para la supervisión de la administración de suplementos.²³

Se ha observado que, tras ingestas recientes de riboflavina en forma de suplemento, la riboflavina libre y el FMN aumentan en plasma, mientras que el FAD se mantiene. No existe correlación entre los valores de FAD y los valores de sus precursores FMN y riboflavina libre. Además, debido a que la riboflavina, el FMN y el FAD en plasma no muestran correlación con el EGRAC, y que tras administrar suplementos de riboflavina el FAD no varía, éste último no se puede considerar biomarcador sensible de la ingesta de misma^{18,19}.

En varios estudios^{3,18,19} se observó que la riboflavina plasmática era el marcador de mayor respuesta en los individuos que recibieron el suplemento dietético, pero la variabilidad de la respuesta fue alta, lo que probablemente refleja que otros factores distintos del estado de la vitamina B₂ determinan las concentraciones plasmáticas de la riboflavina. El metabolismo de la vitamina B₂ puede verse influido por el hipotiroidismo, infecciones respiratorias, los estados catabólicos y algunas otras condiciones que pueden estar asociadas con una mayor movilización de la vitamina desde el hígado y otros tejidos hacia la sangre.¹⁸ Por consiguiente, este marcador es probablemente útil para los estudios de población, pero puede ser menos adecuado para la evaluación del estado de la vitamina B₂ en los individuos.

- GLÓBULOS ROJOS (ERITROCITOS):

La mayor parte de la riboflavina en los tejidos, incluidos los eritrocitos, existe predominantemente como FAD y como FMN, unido covalentemente a las enzimas.³ Se ha observado que existe una correlación entre el EGRAC y los valores de FMN y FAD determinados en eritrocitos^{14,15,17}.

La concentración de FAD en los eritrocitos aumentan con la ingesta de riboflavina, pero en menor medida que la de FMN. Además, su concentración se correlaciona significativamente con otros índices de vitamina B₂, incluida la riboflavina plasmática, lo que sugiere que la concentración de FAD en los eritrocitos está determinada por el estado de la vitamina B₂¹⁸. Por ello, se utilizará la FMN eritrocitaria, y no la FAD, para valorar el estado nutricional a nivel poblacional.

De esta manera, aunque la concentración de todas las formas de vitamina B₂, excepto la FAD en plasma, son indicadores potenciales del estado de la riboflavina, *la vitamina B₂ plasmática y la FMN eritrocitaria pueden ser útiles para evaluar el estado de la vitamina en estudios poblacionales.*

En la Tabla 2 se muestran los valores considerados como adecuados de todas las formas de la vitamina.

Tabla 2. Valores adecuados de vitamina B₂ según la muestra biológica analizada según el tipo de muestra analizada^{2,3,17}

Muestra biológica	Valores de referencia
Plasma/Suero (mol/L)	B ₂ : 1x10 ⁻⁸ FAD: 6,3x10 ⁻⁸ FMN: 7,5x10 ⁻⁹
Eritrocitos (mol/L)	B ₂ : 1,4x10 ⁻⁸ FAD: 4,3x10 ⁻⁷ FMN: 2,8x10 ⁻⁸
Orina (µg/24 h)	B ₂ : 120

5.2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES EMPLEADAS

- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

La mayoría de los métodos cromatográficos que se han desarrollado para determinar las concentraciones relativamente altas de riboflavina que se encuentran en los preparados farmacéuticos, los alimentos y la orina, corresponden a la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, también existen métodos cromatográficos con los que se pueden medir concentraciones más bajas presentes en sangre completa, en suero o el plasma^{4,27} (Tabla 3).

En los métodos en los que se determina la vitamina en sangre completa y plasma, se requiere la preparación previa de la muestra, con precipitación de proteínas, típicamente con ácido tricloroacético.

La metodología más frecuente para la separación de las formas de la vitamina es la cromatografía de fase inversa, utilizando columnas C18 y acetonitrilo (ACN) o metanol y agua como fase móvil, con un flujo de 1 mL/min^{4,7,17,27}. Entre los métodos más usados actualmente para su detección y cuantificación se encuentran el HPLC con detección fluorescente (lo más habitual), ultravioleta visible (UV-Vis) y por espectrometría de masas (MS) (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los estudios en los que se ha usado la cromatografía de líquidos (HPLC) para determinar riboflavina en muestras biológicas

Muestra	Fase estacionaria (columna)	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Precisión CV (%)	Detector	Tiempo de análisis (min)	Ref
FAD, FMN y B ₂ en plasma	Columna C18 (250mmx4mm, 5 µm)	ACN (15%)	1	3,8 (FAD) 5,8 (FMN) 2,9 (B ₂)	Fluorescencia (445/530)	8	24
FAD, FMN y B ₂ en plasma	Columna C18 (3.0x 50 mm, 1.8 µm)	Metanol	0,5	<10	Fluorescencia (450/520)	7	23
FAD, FMN B ₂ en sangre completa	Zorbax SB-CN (stable bond ciano), (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Metanol/ agua	1		Fluorescencia Primeros 14,5 minutos: (268/525) nm Resto: (260/470) nm	7 min	31
B ₂ en orina	Columna C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Metanol/ agua (50/50) %	0,7	<9	Fluorescencia (450/530)	6	22
FAD en sangre completa	Columna ACE C18-PFP (100 mm x 2,1 mm, 2,0 µm)	ACN (80%)	0,5	<8	Fluorescencia (445/512) nm	8	29
FAD, FMN, B ₂ plasma y sangre completa	Columna C18 (50X 4,6 mm)	ACN	3	<7 (FAD) <10 (FMN)	Fluorescencia (456/512) nm	10	7
B ₂ libre en plasma y orina	Columna C18 (250x4,6 mm)	ACN Sal de sodio del ácido 1-heptanosulfónico como agente IP	1	<8,2	Ultravioleta-Vis (240 nm)	14	32
FAD, FMN y B ₂ en plasma	Columna C8 (150x4,6mm 3,5 µm)	ACN (99,8%)	1	<10 (B ₂) 10-15 (FAD y FMN)	Masas API-triple cuádruplo	8	26

B ₂ en plasma	Columna C18 (150x 4,6 mm)	Metanol-agua	1	<9	Masas MALDI TOF	8	27
B ₂ , FMN y FAD en plasma	Columna Kinetex PFP.	ACN	0,20	8 (B ₂) 6 (FMN)	Masas API- triple cuádruplo	11,2	33
B ₂ en plasma	Columna Poroshell 120 SB-Aq (2.1mmx100mm 2,7µm)	Metanol	0,35	<10	Masas API- triple cuádruplo	2,5	28
B ₂ en sangre completa	Columna C8 (4,6x100mm,5µ)	ACN	0,4	<8,56	Masas API – triple cuádruplo	5	34

PFP: pentafluorofenilo; ACN: acetonitrilo

Detección UV-Vis:

Esta técnica se basa en la capacidad de los fotoproductos de la riboflavina en absorber radiación ultravioleta. Esta vitamina se degrada en LC y LF, que son detectados a 447 nm. Se trata de una técnica poco usada debido a su mayor tiempo de análisis, además de su baja sensibilidad y selectividad.³²

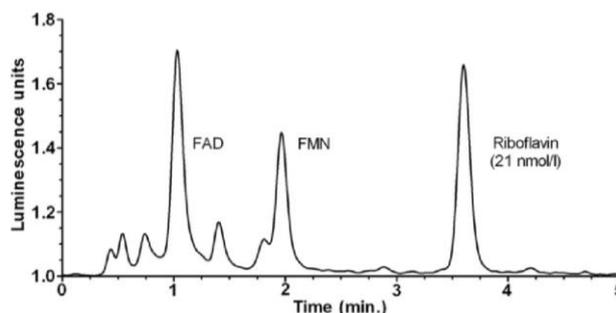
Detección fluorimétrica:

Gran parte de los métodos utilizan la detección fluorimétrica que son aquellos que se basan en la fluorescencia nativa de las flavinas^{7,22,23,24,29,31}. Estos métodos permiten conocer la distribución relativa de las tres formas de la vitamina. Presenta una menor duración y es más selectivo que la detección ultravioleta, pero es más caro.

En el espectrofluorómetro se establecen valores longitud de onda de excitación y emisión.^{4,7} El primer selector aísla la REM adecuada para provocar la excitación y el segundo selector aísla la REM de fluorescencia emitida por la muestra problema.⁷

Como se puede ver en la Figura 5, al realizar una cromatografía en fase inversa, utilizando metanol e hidrogenofosfato de potasio (K₂HPO₄) como eluyentes, se obtuvo el cromatograma de todos los compuestos antes de 5 minutos, siendo el FAD el que eluía en primer lugar y la B₂ en último lugar.²³

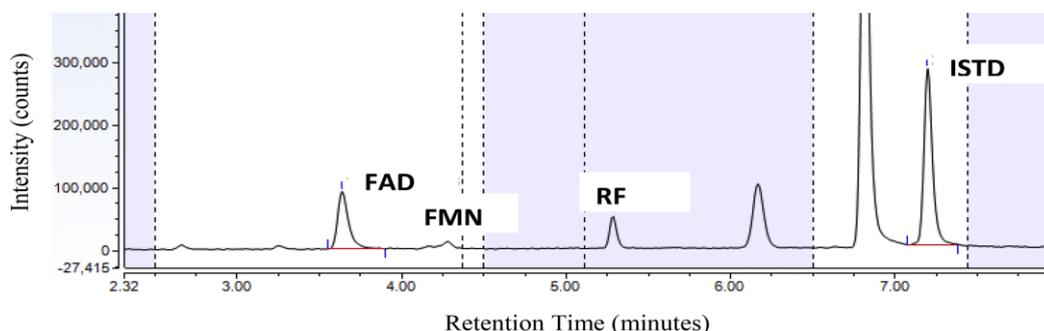
*Figura 5. Ejemplo de cromatograma obtenido mediante cromatografía inversa con detección por fluorescencia a partir de una muestra de plasma.*²³



En la mayoría de los estudios realizados se ha utilizado galactoflavina como estándar interno. Sin embargo, este estándar es muy difícil de obtener y muchas veces los laboratorios trabajaban sin utilizarlo. Además, al obtener el cromatograma, normalmente se obtenían diferentes picos co-eluyendo con el FAD, lo que interfería con el análisis ²³

Para solventar dichas dificultades se desarrolló recientemente un protocolo automatizado para el análisis de FAD en sangre completa, con el uso de 7,8-dietil-10-(1-D-ribitol) isoaloxazina (DE-R-IX), que es un estándar interno fácilmente disponible y una columna ACE C18-PFP (columna C18 con una fase de pentafluorofenilo (PFP)). En la Figura 6 se muestra el cromatograma obtenido al realizar la cromatografía en fase inversa con la columna mencionada y utilizando ACN al 80% como fase móvil, con un flujo de 0,5 mL/min. La identificación se realizó con detección fluorescente (a longitudes de onda de excitación y de emisión de 445 nm y 512nm, respectivamente).²⁹

Figura 6. Cromatograma de fase inversa obtenido en sangre completa²⁹



RF: Riboflavina, FAD: Flavín Adenín Dinucleótido, FMN: Flavin mononucleótido, ISTD: internal standard.

De esta manera, con este método se logró obtener una buena resolución para el FAD, con una separación satisfactoria del FMN, la riboflavina y otros picos desconocidos. Además, este ensayo demostró dar un nivel muy aceptable de rendimiento en linealidad ($R^2 > 0,99$), precisión (CV intra-día e inter-día < 5 y 8% , respectivamente) y recuperación ($> 90\%$).²⁹

Detección por espectrometría de masas (MS/MS)

Es un método bastante utilizado actualmente. La principal ventaja de la técnica de espectrometría de masas es que no sólo proporciona información sobre la masa molecular de un compuesto de interés, sino que también genera información

estructural.^{26,27} Es el método más selectivo, sensible, preciso y con menor tiempo de ejecución y por lo tanto es más fiable para determinar los niveles de riboflavina en suero y sangre completa.^{26,28}

Un espectrómetro de masas incluye un ionizador, un analizador de masas y un detector de aniones que convertirá el haz de iones en una señal eléctrica.

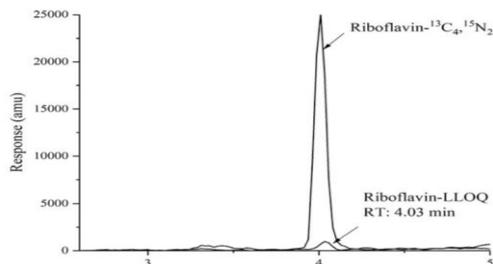
Tras la introducción y separación de la muestra por un método cromatográfico, la muestra sufrirá un proceso de ionización. Se define ionización como el proceso de generación de un ion analito con una carga eléctrica neta igual a uno o más electrones. La técnica más utilizada para la determinación de la riboflavina es la ionización a presión atmosférica (API)^{26,28,33,34}, que es la más sencilla (Tabla 3). Se trata de una técnica capaz de aceptar todo el flujo que procede de la HPLC (de 1 a 4mL/min), mejorando así la sensibilidad del proceso. Además, la muestra se ioniza a presión atmosférica consiguiendo un mayor rendimiento que en aquellas que se ionizan en alto vacío. Las dos ionizaciones API más comúnmente utilizadas son el "Electrospray, (ESI)", y la "Ionización Química a Presión Atmosférica, APci".

Los iones se introducen posteriormente en el analizador de iones que consiste en la separación de iones con diversas relaciones masa/carga, siendo el más utilizado es el triple cuadrupolo en tándem (en el caso de la vitamina B₂, los iones con una relación masa/ carga (m/z) de 377,2+0,5 y 243,2+0,5 son los que llegan al detector). Estos analizadores triples cuádruplo suelen emplear tiempos de barrido menores que los de sector magnético, siendo además económicamente más accesibles, aunque más robustos^{26,28,33}.

En 2009 se describió un método para la detección simultánea de las vitaminas B₂ y B₁₂ mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas con detector MALDI-TOF MS. La ionización por MALDI se refiere a los métodos en los que una muestra se expone a la irradiación láser ioniza los analitos de la muestra. En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF) los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico igual al del impulso de ionización. Esta técnica ofrece la simplicidad y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas para analizar mezclas complejas.²⁷

En 2019 se describió un método preciso para la separación y cuantificación de las vitaminas B₁, B₂ y B₆ por LC acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) utilizando sangre completa³⁴. Se habían desarrollado varios ensayos de HPLC para determinar la vitamina B₂ en la matriz biológica, sin embargo, no se podían utilizar los métodos existentes de LC-MS/MS para cuantificarla, en manchas de sangre seca (DBSs), que a menudo se utilizan en lactantes y niños al ser fáciles de recoger, enviar y almacenar. Se utilizó ACN como eluyente con un flujo de 0,4 mL/min. Como podemos observar en la figura 7, aparece una clara separación de la riboflavina con tiempo de retención de 4 minutos con una precisión aceptable (CV<8,56%) (Figura 7).

Figura 7. Ejemplo de cromatografía acoplada a espectrometría de masas en una muestra de sangre³⁴



- CROMATOGRAFÍA CINÉTICA CAPILAR (MEKC)

Se trata de una modalidad de electroforesis capilar (CE). La CE es una técnica basada en la separación de las especies en base a su velocidad de migración al ser cargadas bajo un campo eléctrico. Esta velocidad varía en función de la relación masa, carga, radio y viscosidad del medio, entre otros parámetros. El capilar se llena de la solución del electrólito y la muestra se inyecta en el ánodo del capilar, los iones migran en función de sus movilidades electroforéticas y llegan al detector, para registrarse.

En comparación a la cromatografía HPLC, esta técnica necesita pequeños volúmenes de muestras, periodos cortos de separación. Además, el consumo de disolventes orgánicos y otros químicos es menor que en HPLC. ²⁵

La técnica MEKC se ha usado para determinar B₂ en muestras de orina y en plasma. Esta técnica combina los principios de la cromatografía y la separación electroforética. Se introduce en la muestra un elemento tensioactivo que normalmente es el dodecil sulfato sódico (SDS), en concentraciones lo suficientemente grandes como para formar micelas. Las micelas son esencialmente esféricas, con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro para evitar la interacción con el buffer hidrofílico, y los extremos cargados hacia el buffer. Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas formando una "fase pseudoestacionaria". El analito, al quedar retenido en las micelas, aumenta su tiempo de migración haciendo que la detección sea más selectiva.

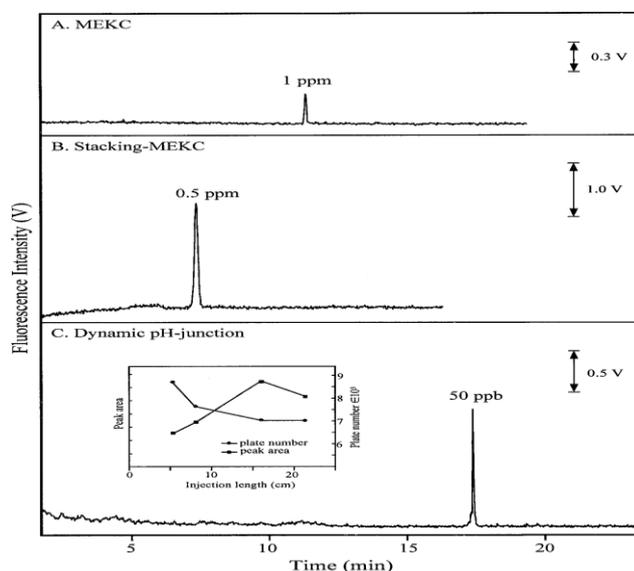
Tabla 4. Características de los estudios en los que se ha usado la electroforesis capilar cinética para determinar riboflavina en muestras biológicas.

Muestra	Capilar electroforético	Fase móvil	Flujo muestra	Detector	T separación (min)	CV (%)	Ref
RF Orina Con y sin método stacking /apilamiento	Fused-silica (71 cm x 75 µm)	ACN/ Agua	2cm/3s	UV-LED (467 nm)	6,5	1,8-6,2	25
B ₂ , FMN y FAD Plasma Cambio de PH buffer	Beckman P/ACE 2000 (57cm x 75 µm)	Agua	0,137 cm/s	LIF (488/520 nm)	15	0,68-3,8	36

B ₂ Orina Cambio de PH buffer	Fused silica (55cm x 100µm)	ACN Agua	20 cm/ 10 s	LIF con fibra óptica (474/515 nm)	5,5	1,76- 4,51	37
B ₂ , FMN, FAD Plasma pCEC mode (cambio de PH buffer y de flujo de inyección)	Columna capilar (60 cmx 100 µm)	ACN Metanol	0,02 mL/min	Laser diode double- pumped solid- state (LD- DPSS) (473/530 nm)	4,5	B ₂ :1,2 FMN:0 ,63 FAD:0, 94	38

En algunos estudios, con el fin de aumentar la sensibilidad y resolución en la detección en muestras biológicas, se han introducido varios métodos de preconcentración de las muestras (Figura 8). Entre ellos destaca *el fenómeno de apilamiento o "stacking"*, que produce que los iones del analito, tras la inyección, pasen de estar ocupando gran parte del capilar a baja concentración, a estar concentrados en una pequeña zona del capilar (stack) para su posterior separación y detección^{25,35}. En ocasiones, se ha combinado con una técnica llamada *inyección a pH dinámico* basada en el cambio del pH del buffer. El cambio de pH juega un papel importante en la forma de existencia de los analitos, afectando así a su movilidad en el capilar. Por tanto, a pH idóneos, mejorará la eficiencia del proceso (se reduce la anchura del pico).³⁵ En la figura 8 se observan las mejoras en sensibilidad y eficiencia obtenidas con las técnicas de preconcentración mencionadas.

Figura 8. Ejemplo Método MECK en muestras de orina²⁵



(a) Sin técnicas de preconcentración (b): Método Meck con stacking (c) método con inyección a pH dinámico

El uso de ACN en muestras de orina impide la superposición de compuestos desconocidos (Tabla 4).

Entre los estudios revisados para la determinación de riboflavina en orina y plasma, encontramos dos formas más comunes de detección fluorimétrica basada en la fluorescencia nativa de las flavinas por diferentes fuentes de luz: detección fluorimétrica inducida por diodos emisores de luz UV (LED)²⁵ y detección fluorimétrica por láser inducido (LIF)^{35,36,37} (Tabla 4). Ambas técnicas han sido mejoradas a lo largo de los años, con la introducción de dispositivos capaces de mejorar la selectividad y la sensibilidad.^{36,38}

Detección con fuente UV-LED:

Se trata de una fuente capaz de emitir luz gracias a un campo eléctrico. Cubre todo el espectro visible y es más utilizado en muestras donde aparece una gran cantidad de analitos. Es una técnica menos costosa, con una buena estabilidad de salida, una vida útil más larga y que requiere poco o ningún mantenimiento.²⁵ Sin embargo, la aplicación quedó limitada a preparados farmacéuticos con alta concentración de vitamina o detecciones simultáneas de varias vitaminas debido a una sensibilidad de detección insatisfactoria además de su pequeño volumen de muestras, especialmente cuando se analizan muestras biológicas. Se podría utilizar en muestras de orina con técnicas de preconcentración.

Detección con fuente LIF:

La sensibilidad aumenta con este tipo de fuente de luz utilizado llamada fluorescencia inducida por láser (LIF), que es unas 1000 veces más sensible que el tradicional LED y por tanto es más útil, pero es de alto coste y de corta vida útil.

La separación de vitamina B₂, FMN y FAD en plasma humano y de B₂ en orina por MECK, se ha realizado de forma satisfactoria con LIF y ha sido mejorada, al igual que al usar LED, con procesos de preconcentración.^{36,37,38}

6. CONCLUSIONES

Existen varias formas para determinar el estado nutricional en riboflavina, bien a través de parámetros funcionales, en cuyo caso se usa el test EGRAC, o mediante parámetros estáticos, en los que se determina directamente riboflavina o alguna de sus formas, en muestras de orina o sangre, utilizando diversas técnicas instrumentales. La técnica más utilizada para determinar la riboflavina y sus coenzimas activas FMN y FAD es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), normalmente con detección fluorométrica, aunque cada vez más se está usando acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), ya que se consigue una mayor sensibilidad, selectividad, precisión y rapidez. Así mismo, también está imponiéndose el uso de la cromatografía cinética capilar (MEKC) con detección LIF debido a que, en comparación con el HPLC, requiere cantidades más pequeñas de muestras, y presenta tiempos de separación más cortos y mayor resolución y sensibilidad, sobretodo cuando se preconcentra la muestra.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Powers H. Riboflavin (vitamin B-2) and health. American Society for Clinical Nutrition. 2003;(77):1352–1355.
- [2] Suwannasom N, Kao I, Pruß A, Georgieva R, Bäuml H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. Int. J. Mol. . 2020;21(950):2–13.
- [3] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Dietary Reference Values for riboflavin. EFSA Journal 2017;15(8):8-34
- [4] Silva E, Edwards AM. Flavins: Photochemistry and Photobiology. 2006.
- [5] A. Sherwood Roy. Laboratory assesment of vitamin status. London: Dominic Harrington; 2019.
- [6] Wolf-Dieter Lienhart, Venugopal Gudipati, Peter Macheroux. The human flavoproteome. W.-D. Lienhart et al./Archives of Biochemistry and Biophysics 535 (2013) 150–162.
- [7] Hautem J-Y, Morel C, Couderc R, Moussa F. Liquid Chromatographic Determination of B2 Vitamers in Human Plasma and Whole Blood. Clinical Chemistry. 2006;5(52):907–908.
- [8] Ashoori M, Saedisomeolia A. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. 2014;(111):1985-1991.
- [9] Strohm D, Bechthold A, Isik N, Leschik-Bonnet E, Hesecker H, German Nutrition Society (DGE). Revised reference values for the intake oh thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2) and niacin. German Nutrition Society (DGE) 2016; 3 (20-24).
- [10] Ortega RM, Navia B, López-Sobaler AM, Aparicio A. Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. Departamento de Nutrición, Universidad Complutense, Madrid, 2014.
- [11] Mahabadi N, Bhusal A, Banks SW. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Julio, 3 2019. Riboflavin Deficiency.
- [12] Szczuko M, Ziętek M, Kulpa D, Seidler T. Riboflavin - properties, occurrence and its use in medicine . DE GRUYTER. 2019;30(1).
- [13] Larson CL, Johansson GK. Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. The American Journal of Clinical Nutrition. 2002;76(1):100–106.
- [14] Ulrich Holler , Stephan J.L. Bakker, Andre Düsterloh, Balz Frei, Josef Ko€hrle, Tobias Konz, Georg Lietz, Adrian McCann, Alexander J. Michels, Anne M. Molloy, Hitoshi Murakami, Dietrich Rein, Wim H.M. Saris, Karlheinz Schmidt, Kazutaka Shimbo, Soeren Schumacher, Cees Vermeer, Jim Kaput, Peter Weber, Manfred Eggersdorfer, Serge Rezzi. Micronutrient status assessment in humans: Current methods of analysis and future trends. Trends in Analytical Chemistry. 2018;102:111.
- [15] Hoey L, McNulty H, Strain J. Studies of biomarker responses to intervention with riboflavin: a systematic review. The American Journal of Clinical Nutrition. 2009;89(6):1960S–1980S.

- [16] Acevedo L. C, López A. F, Sepúlveda B S., Espinosa F. V. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA EN EL EMBARAZO DIABÉTICO. Rev Chil Obstet Ginecol 2007; 72(2):82-88
- [17] Graham JM, Peerson JM, Haskell MJ, Shrestha RK, Brown KH, Allen LH. Erythrocyte Riboflavin for the Detection of Riboflavin Deficiency in Pregnant Nepali Women. Clinical Chemistry. 2005;51(11):2162–2165.
- [18] Hustad S, McKinley MC, McNulty H, Shrestha RK, Schneede. J, Strain J, Scott JM, Ueland PM. Riboflavin, Flavin Mononucleotide, and Flavin Adenine Dinucleotide in Human Plasma and Erythrocytes at Baseline and after Low-Dose Riboflavin Supplementation . Clinical Chemistry. 2002;48(9):1571–1577.
- [19] Gul W, Anwar Z, Qadeer K, Perveen S, Ahmad I. Methods of Analysis of Riboflavin (Vitamin B2): A Review. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences . 2014;2(2):10–21.
- [20] Herron A J, Mariani J J, Pavlicov M, Parrinelloe C M, Boldd K W, Levin F R, Nunes EV, Sullivan M A, Raby W N, Bisaga A. Assessment of riboflavin as a tracer substance: Comparison of a qualitative to a quantitative method of riboflavin measurement. Drug and alcohol dependence. 2013;128:77–82.
- [21] Privitera ML, Lozano VA. Development of a second-order standard addition fluorescence method for the direct determination of riboflavin in human urine samples without previous clean up and separation steps. Microchemical Journal. 2017;133:60–66.
- [22] Chen M, Andrenyak DM, Moody DE, Foltz RL. Determination of riboflavin by high-performance liquid chromatography with riboflavin-depleted urine as calibration and control matrix . Journal of chromatography B. 2005;820:147–150.
- [23] Petteys BJ, Frank EL. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC . Clinica Chimica Acta. 2011;42:38–43.
- [24] Capo-chichi CD, Guéant J-L, Feillet F, Namour F, Vidailhet M. Analysis of riboflavin and riboflavin cofactor levels in plasma by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography B. 2000;739:219–224.
- [25] Su A, Lin C. Determination of riboflavin in urine by capillary electrophoresis– blue light emitting diode-induced fluorescence detection combined with a stacking technique. Journal of Chromatography B. 2003; 785:39–46.
- [26] Midttun O, Hustad S, Solheim E, Schneede J, Ueland PE. Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. Clinical Chemistry 2005;51:1206–1216.
- [27] Mandal SM, Mandal M, Gosh AK, Dey S. Rapid determination of vitamin B2 and B12 in human urine by isocratic liquid chromatography. Analytica Chimica Acta. 2009;640:110–113.
- [28] Diniza M, Diasa N, Andradea F, Paulo B, Ferreira A. Isotope dilution method for determination of vitamin B2 in human plasma using liquid chromatography–tándem mass spectrometry . Journal of chromatography B. 2019;1113:14–19.

- [29] Nguyen VL, Ah-Loo A, Fitzpatrick M. An automated workflow approach for the analysis of flavin adenine dinucleotide by HPLC with internal standard. *Analytical Biochemistry*. 2020;594.
- [30] Su A-K, Lin C-H. D determination of riboflavin in urine by capillary electrophoresis–blue light emitting diode-induced fluorescence detection combined with a stacking technique. *Journal of chromatography B*. 2003; 785 :39–46.
- [31] Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. Separation, Identification and Quantification of Riboflavin and its Photoproducts in Blood Products using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: A Method to Support Pathogen Reduction Technology. *Photochemistry and Photobiology*. 2004;80:609-615.
- [32] Heydari R, Elyasi NS. Ion-pair cloud-point extraction: A new method for the determination of water-soluble vitamins in plasma and urine. *Journal of Separation Science*. 2014;37:2724–2731.
- [33] Asa I, Pei H, Zhou E, Liu S, Chui D, Yoo E. Simultaneous quantitation of folates, flavins and B6 metabolites in human plasma by LC–MS/MS assay: Applications in colorectal cancer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;158:66–73.
- [34] Zhanga M, Liub H, Huang X, Shaob L, Xiea X, Wang F, Yang J, Peic P, Zhang Z, Zhaib Y, Wang Q, Zhanga T, Huange J, Cuic X. A novel LC-MS/MS assay for vitamin B1, B2 and B6 determination in dried blood spots and its application in children. *Journal of Chromatography B*. 2019;1112:33-44.
- [35] CHANG Y, SHIH C, LIN CH. UV Light-Emitting Diode-Induced Fluorescence Detection Combined with Online Sample Concentration Techniques for Capillary Electrophoresis. *Analytical Science*. 2006;22: 235-241.
- [36] Britz-McKibbin P, Markuszewski MJ, Iyanagi T, Matsuda K, Nishioka T, Terabe, S. Picomolar analysis of flavins in biological samples by dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Biochemistry* 2003, 313: 89-96.
- [37] Hu L, Yang X, Wang C, Yuan H, Xiao D. Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2007;856:245–251.
- [38] Wu Y, Lin J, Wu Q, Wu X, Lin X, Xie Z. Rapid analysis of trace levels of flavins by pressurized capillary electrochromatography-laser induced fluorescence detection with sulfonated N-octadecyl methacrylate monolith. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* . 2010;53:1324–1331.