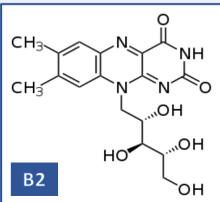




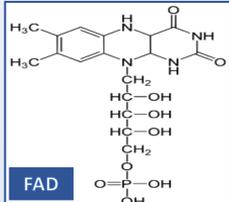
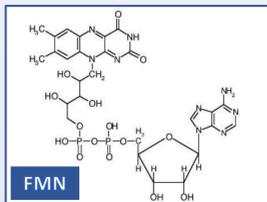
# MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN RIBOFLAVINA

Marta Ceniceros López. TFG JULIO 2020 Grado de Farmacia

## INTRODUCCIÓN



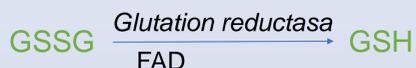
## FAMILIA VITAMINAS B HIDROSOLUBLES



- Fuentes: alimentos de origen animal (lácteos y derivados).
- Propiedades físico-químicas: Fluorescente bajo luz ultravioleta.
- Deficiencia: arriboflavinosis (alcohólicos, personas edad avanzada y veganos).

## RESULTADOS

### PARÁMETROS FUNCIONALES: COEFICIENTE DE ACTIVACIÓN DE LA ERITROCITO GLUTATION REDUCTASA (EGRAC)



- Muestras de eritrocitos frescos
- Valores EGRAC:
  - >1,40 Riesgo alto de déficit
  - 1,20-1,40 Riesgo moderado de déficit
  - <1,20 Riesgo leve de déficit
- Inadecuado en caso de seguimiento nutricional y condiciones específicas

$$EGR = \frac{A_{t10} - A_{t0}}{A_{t10'} - A_{t0'}}$$

### 1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

#### PARÁMETROS ESTÁTICOS

- Mide concentraciones altas en preparados farmacéuticos, alimentos u orina
- Mide concentraciones bajas de plasma o sangre completa o GR
- Preparación previa en muestras de sangre con ácido tricloroacético (TCA)

Muestra	Fase estacionaria (columna)	Fase móvil	Flujo (mL/min)	CV (%)	Detector	T (min)	Ref
FAD, FMN y B <sub>2</sub> en plasma	Columna C18 (250mmx4mm, 5 μm)	ACN (15%)	1	3,8: FAD 5,8:FMN 2,9:B <sub>2</sub>	Fluorescencia (445/530)	8	24
FAD, FMN y B <sub>2</sub> en plasma	Columna C18 (3.0x 50 mm, 1,8 μm)	Metanol	0,5	<10	Fluorescencia (450/520)	7	23
FAD, FMN B <sub>2</sub> en sangre completa	Zorbax SB-CN (stable bond ciano), (4,6 X 250 mm, 5 μm)	Metanol / agua	1	-	Fluorescencia (268/525)	7	31
B <sub>2</sub> en orina	Columna C18 (150x4,6 mm, 5 μm)	Metanol / agua	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	0,5	<8	Fluorescencia (445/512) nm	8	29
FAD, FMN, B <sub>2</sub> plasma y sangre completa	Columna C18 (50X 4,6 mm)	ACN	3	<7 (FAD) <10 (FMN)	Fluorescencia (456/512) nm	10	7
B <sub>2</sub> libre en plasma y orina	Columna C18 (250x4,6 mm)	ACN	1	<8,2	Ultravioleta-Vis (240 nm)	14	32
FAD, FMN y B <sub>2</sub> en plasma	Columna C8 (150x4,6mm 3,5 μm)	ACN (99,8%)	1	<10 (B <sub>2</sub> ) 10-15 (FAD y FMN)	Masas API-triple cuádruplo	8	26
B <sub>2</sub> en plasma	Columna C18 (150x 4,6 mm)	Metanol-agua	1	<9	Masas MALDI TOF	8	27
B <sub>2</sub> , FMN y FAD en plasma	Columna Kinetex PFP.	ACN	0,20	8 (B <sub>2</sub> ) 6 (FMN)	Masas API-triple cuádruplo	11,2	33
B <sub>2</sub> en plasma	Columna Poroshell 120 (2.1mmx100mm 2,7μm)	Metanol	0,35	<10	Masas API-triple cuádruplo	2,5	28
B <sub>2</sub> en sangre completa	Columna C8 (4,6x100mm,5μ)	ACN	0,4	<8,56	Masas API-triple cuádruplo	5	34

## OBJETIVO

Métodos de detección de la riboflavina en diferentes muestras biológicas

¿Cuáles son los más usados?

## MATERIAL Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica de los métodos usados para la detección de la riboflavina desde hace 20 años en diferentes plataformas científicas: Pubmed, Sciedirect y Google Scholar.

Riboflavin/B <sub>2</sub> status	Determination of riboflavin
Biochemistry riboflavin	Measurement methods for riboflavin

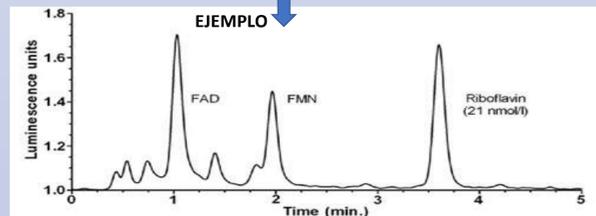
PALABRAS CLAVE DE BÚSQUEDA

## PARÁMETROS ESTÁTICOS: MUESTRAS BIOLÓGICAS:

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

## DETECTORES HPLC:

Detección Ultravioleta	Detección fluorimétrica	Detección acoplada a MS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja selectividad</li> <li>• Baja sensibilidad</li> <li>• Alto tiempo de análisis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectivo</li> <li>• Sensible</li> <li>• Bajo tiempo de análisis</li> <li>• Coste elevado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta selectividad</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Bajo tiempo de análisis</li> <li>• Coste muy elevado</li> </ul>



## 2. CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

- Modalidad de electroforesis capilar
- Muestras de orina y plasma
- > selectividad con tensioactivos

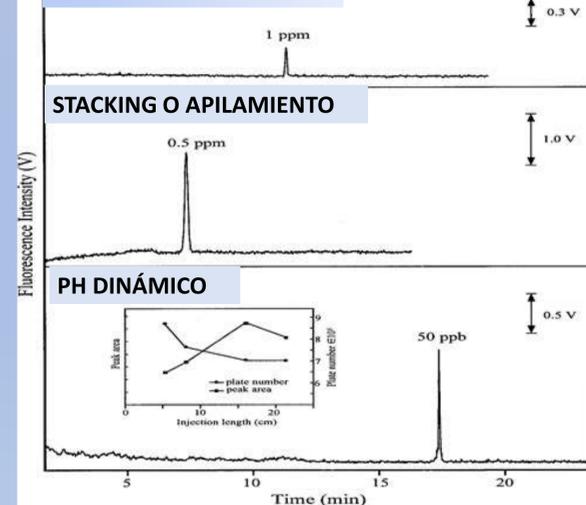
Muestra	Capilar electroforético	Fase móvil	Flujo muestra	Detector	T (min)	CV (%)	Ref
RF Orina	Fused-silica (71 cm x 75 μm)	ACN/ Agua	2cm/3s	UV-LED (467 nm)	6,5	1,8-6,2	25
B <sub>2</sub> , FMN y FAD Plasma	Beckman P/ACE 2000 (57cm x 75 μm)	Agua	0,137 cm/s	LIF (488/520 nm)	15	0,68-3,8	36
B <sub>2</sub> Orina	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 <sub>2</sub> ,FMN, FAD Plasma	Columna capilar (60 cmx 100 μm)	ACN Metanol	0,02 mL/min	LD-DPSS (473/530 nm)	4,5	B <sub>2</sub> :1,2 FMN:0,63 FAD:0,94	38

ACN: Acetonitrilo

## DETECTORES MEKC

LED	LIF
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere ↑ [B<sub>2</sub>]</li> <li>• Detección insatisfactoria</li> <li>• Muestras de orina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto coste</li> <li>• ↓ volumen muestras</li> <li>• ↑ sensibilidad</li> <li>• Muestras orina y plasma</li> </ul>

## MEJORAS EN LA TÉCNICA



## CONCLUSIONES/DISCUSSION



- HPLC (FLUORESCENCIA) → MÁS USADA HASTA AHORA
- HPLC /MS
- MEKC CON LIF → EN AUMENTO POR SU MAYOR RESOLUCION, SENSIBILIDAD Y RAPIDEZ

## BIBLIOGRAFÍA

CONSULTA TODA LA BIBLIGRAFÍA ESCANEANDO ESTE QR



VER AHORA