



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA DE ASCORBIL-2-MONOFOSFATO  
EN ALIMENTOS EXTRUIDOS PARA SALMONIDEOS POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON  
OPTIMIZACIÓN CROMATOGRÁFICA VÍA DISEÑO EXPERIMENTAL**



**Daniela Olivia Carrillo Rojas**  
**Químico Farmacéutico**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**Prof. Dr. Mario Aranda B.**  
Departamento de Bromatología,  
Nutrición y Dietética  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Concepción (CHILE) 2009

## RESUMEN

A pesar de la crisis actual, la industria acuicultora Chilena se ha convertido en una de las más importantes del mundo con US\$ 2475 millones de exportaciones durante el 2008, lo cual representa más del 50% de las exportaciones pesqueras Chilenas. Para lograr aumentar o mantener la producción se deben controlar cada uno de los aspectos relevantes, entre ellos, una dieta adecuada es uno de los factores más críticos para lograr un crecimiento saludable del salmón. La vitamina C es un nutriente indispensable para mantener los procesos fisiológicos de los distintos animales incluyendo los peces. La mayoría de los animales acuáticos incluyendo los crustáceos son sumamente sensibles a la deficiencia de vitamina C, lo cual genera escoliosis, lordosis, hemorragia interna y despigmentación. El ácido L-ascórbico ha sido la fuente tradicional de vitamina C utilizada en alimentos para peces, pero debido a su inestabilidad, la mayoría se pierde durante el procesamiento y el almacenaje. Se han utilizado derivados más estables como el ascorbil-2-monofosfato. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad química de ascorbil-2-monofosfato en alimento extruído para peces bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Para ello fue desarrollado, optimizado y validado, un método para la determinación de ascorbil-2-monofosfato en alimento extruído para peces. El analito fue extraído por agitación con 100 mL de ácido orto-fosfórico al 5% v/v, la mezcla fue centrifugada para luego ser inyectada directamente en el sistema cromatográfico. El análisis se realizó en fase reversa con una fase móvil compuesta por una solución acuosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajustado a pH 2.6, octilamina (0.045% v/v): acetonitrilo (94:6 v/v), a un flujo de  $0.7 \text{ mL min}^{-1}$ . La detección se realizó en el rango ultravioleta a 254 nm. El proceso de optimización se llevó a cabo mediante el uso de un diseño experimental central compuesto evaluando tres factores: flujo, pH y porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil. Mediante 16 experimentos se lograron obtener los valores óptimos para cada una de estas variables, los cuales fueron: flujo de  $0.7 \text{ mL/min}$ , 6% v/v de acetonitrilo y pH 2.6, de ellos el flujo fue el único factor que presentó una influencia estadísticamente significativa ( $p=0.01$ ). La metodología analítica para la determinación y cuantificación de ascorbil-2-

monofosfato se validó según lo dispuesto por la ICH. Linealidad en el rango de 0.5 a 8.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostró un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.998. Tanto repetibilidad ( $n=6$ ) como precisión intermedia ( $n=3$ ) en matriz mostraron una RSD de 0.9%. La exactitud fue evaluada mediante un estudio de recuperación a tres niveles de sobrecarga de 300, 600 y 900  $\text{mg kg}^{-1}$  obteniendo recuperaciones en el rango de 85% a 91% con una RSD promedio de 2.1%. Considerando un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , los límites de detección y cuantificación calculados a través de la relación señal/ruido (S/N) fueron 0.08 y 0.25  $\text{mg kg}^{-1}$  respectivamente. Este método optimizado y validado demostró ser selectivo, exacto, preciso y con límites de detección y cuantificación adecuados para este estudio. Del estudio de estabilidad química de ascorbil-2-monofosfato en alimento extruído para salmonídeos es posible observar que este derivado de vitamina C sufre una pérdida o degradación superior al 20% p/p al cabo de 2 meses de almacenamiento independiente de las condiciones de temperatura y tipo de envase. No existió una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras sometidas a condiciones aceleradas de degradación y a condiciones ambientales, tampoco en las muestras almacenadas en envase ámbar y transparente. Sin embargo existe una tendencia clara en la cual los porcentajes de degradación del analito son mayores cuando es expuesto a temperatura alta ( $60^\circ\text{C}$ ) y almacenado en envase transparente.