

**Bibliografía**

1. H.C. Holly. 1988. Especialidades de libre dispensación para el anciano, Pharmaklinik. Vol. II, (1), 27-33.
2. OPS/OMS 1988 Estudio de utilización de medicamentos en personas de edad avanzada, afiliadas al Instituto Nacional De Servicios Sociales para Jubilados y Pensionados de La República Argentina.
3. Domec C; M. Vargas Critani y J. Opazo 1992 medicamentostos más Prescritos en un Centro Geriátrico de Santiago. Asignatura de Farmacia Clínica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de Chile. Centro Geriátrico. Servicio de Salud Metropolitano Oriente Chile. Revista de la O.F.I.L. Volumen II No. 4.
4. M. H. Beers and J. G. Ouslander. Risk factors in geriatric drugs prescribing a practical guide to avoiding problems. UCLA Multicampus Division of Geriatric Medicine, Los Angeles, California, USA.

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE  
CAROTENOIDES EN FRUTAS Y VEGETALES POR CRAMOTOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCIÓN(HPLC)

E. Ramos y O. Dary<sup>1</sup>

1. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)  
Escuela de Química

**Introducción**

Los carotenoides son compuestos liposolubles, altamente insaturados que se encuentran en vegetales amarillos y anaranjados, y en hojas verdes. Sus funciones más conocidas de importancia humana son la actividad como provitamina A de algunos de ellos, y sus propiedades antioxidantes. Esta última propiedad los ha asociado con la prevención de algunos tipos de cáncer.

Debido a las características especiales de los carotenoides, los métodos que se han planteado para su análisis son largos y costosos. Además, con frecuencia tienen errores que llevan a resultados falsos, tanto cuali- como cuantitativamente. Otro problema que se presenta al trabajar con carotenoides es el de los patrones que comercialmente son poco accesibles y que después de preparados se degradan rápidamente.

En los últimos años, el estudio de los carotenoides ha cobrado importancia por las diferentes funciones que tienen en el organismo, y en algunos casos, por su aplicación industrial. Por ello se hace necesario el planteamiento de un método que pueda cuantificar los principales carotenoides encontrados en vegetales y frutas de una forma rápida y un costo relativamente bajo.

En este trabajo se pretende aislar patrones de carotenoides y montar un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permita la cuantificación rápida de dichos componentes. Dicho método se validará según los parámetros establecidos para el caso: porcentaje de recuperación, linealidad, límite de detección y cuantificación y reproducibilidad.

**Antecedentes**

En las tablas de composición de alimentos realizadas en los años sesenta se listan los contenidos de carotenos; la mayoría de esta información fue obtenida con el método general de carotenoides totales de la Asociación de Químicos Analíticos (Association of Analytical Chemists, AOAC, 1984).

El método de la AOAC para determinar el contenido de provitamina A, introducido en 1995, comprende la extracción de los carotenoides con una mezcla de acetona/hexano. El extracto se lava con agua para eliminar la acetona y luego se pasa por una columna de MgO: Hyflosuper cel (1:1). Los carotenoides se eluyen con una mezcla acetona/hexano y se mide su absorbancia a 436 nm, expresando el resultado como  $\beta$ -caroteno (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

A pesar de que el método es bastante sencillo, no es apropiado para la determinación de carotenoides en alimentos, ya que se asume que la fracción obtenida en la columna es  $\beta$ -caroteno, y en realidad puede haber carotenoides menos activos e incluso inactivos. Además, la absorción se lee a 436 nm, que no es el máximo de absorción del  $\beta$ -caroteno (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

Debido a estas consideraciones, se han planteado varios métodos para la determinación de carotenoides en alimentos que buscan mejorar las deficiencias del método oficial.

En general, los pasos a seguir en el análisis de carotenoides en alimentos son:

- A. Extracción: La cantidad de muestras a utilizar varía dependiendo del contenido de los carotenoides. Para vegetales de hojas verdes se utiliza de 2 a 5 g y para raíces y frutas de 10 a 40 g (Adewusi & Bradbury, 1993).
- B. Saponificación: La saponificación es necesaria para eliminar material graso que pueda interferir en la cromatografía de adsorción e hidrolizar los ésteres de carotenoides (Davis, 1976). En el caso de las frutas, la saponificación es absolutamente necesaria, puesto que las xantofilas frecuentemente se encuentran esterificadas (Rodríguez-Amaya et al., 1988).
- C. Separación: La cromatografía preparativa de adsorción es la técnica más importante en el aislamiento de los carotenoides, las técnicas más importantes son cromatografías en columna y líquida de alta resolución (HPLC).
  - Cromatografía en columna: se ha utilizado una mezcla de MgO:Hyflosuper cel activado en proporciones 1:1 ó 1:2; como fases móviles se utilizan mezclas de acetona y éter de petróleo en diferentes proporciones.
  - Cromatografía líquida de alta resolución: Las ventajas que presentan los métodos HPLC son: rapidez, simplicidad, reproducibilidad, exactitud, separación existente, sensibilidad y menor exposición al oxígeno, luz, absorbente y solvente. (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Sin embargo, su principal limitante es el alto costo del equipo y los solventes utilizados.

La mayor parte de los métodos utilizan fases estacionarias poliméricas con enlaces de cadenas hidrocarbonadas de octil y octadecil (Craft, 1992).

Las fases móviles más comunes son combinaciones de acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, metanol y hexano (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Las separaciones se llevan a cabo en las columnas de 25 centímetros de largo y con partículas de 5  $\mu$ m. La precisión reportada es de un 5%, y la exactitud es mayor al 98% (Rodríguez-Amaya, 1989).

- D. Identificación: Para establecer la identidad de los carotenoides, unas de las características más importantes son sus espectros de absorción, que se encuentran en función del cromóforo (la absorción inicial de la cadena poliénica es influenciada por la presencia de otros grupos funcionales) (Davies, 1976). El orden de elución de los carotenoides en una columna cromatográfica también da una idea de que carotenoide puede ser, o por lo menos si se trata de un caroteno o una xantofila. También pueden utilizarse reacciones químicas para grupos funcionales específicos.
- E. Cuantificación: Para cuantificar los carotenoides espectrofotométricamente, se requiere que el carotenoide sea puro y que el coeficiente de absorción molar sea conocido. Los coeficientes de absorción molar ( $E^{1\% 1\text{ cm}}$ ) de los carotenoides están dados en soluciones al 1% (1g en 100ml de solución), en celdas de 1 cm de paso de luz.

$$X = \frac{Y}{\frac{E}{1\%} \times 100 \times 1\text{ cm}}$$

La cantidad de carotenoide se calcula utilizando la fórmula donde x son los gramos de carotenoide, y son los ml de solución (Davies, 1976).

Entre las precauciones que se deben tomar en cuenta al trabajar con carotenoides para evitar degradaciones e insomerizaciones, están:

- Trabajar bajo lámparas de luz amarilla, o filtros de luz difusa que bajen la intensidad de la luz natural.

- Evitar exposiciones prolongadas al calor.
- Utilizar atmósferas inertes o en su defecto, antioxidantes.
- Solamente utilizar solventes redestilados, para evitar el contacto con los carotenoides con trazas de ácidos.
- Almacenar los patrones de carotenoides en forma cristalina, en la oscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno y a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Davies, 1976).

### Procedimiento

- A. Purificación de patrones: El método de columna abierta se eligió para el aislamiento de patrones, debido a que permite trabajar con cantidades más grandes de muestra.

La pureza de los patrones aislados, se confirmó con HPLC. Cuando fue necesario se efectuó otra cromatografía para purificarlos. Esta cromatografía consistió en hacer una columna empacada con MgO:Hyflosuper cel (1:1), para que las bandas eluyeran utilizando solventes de mayor polaridad.

- B. Determinación de las condiciones para la cromatografía: para determinarlas, se inyectaron patrones Individuales y mezclas de ellos.
- C. Optimación del método: para el tratamiento de la muestra previo al análisis por HPLC, se tomaron como base los métodos de Rodríguez-Amaya et al. (1989) y de Hart y Scott (1995). Se evaluaron 5 pasos del procedimiento:

- Solvente de extracción.
- Cambio de solvente polar a éter de petróleo.
- Solvente de saponificación.
- Solvente de inyección.

Las comparaciones se llevaron a cabo por carotenoides, en base a las concentraciones obtenidas en  $\mu\text{g/ml}$ .

- D. Validación: incluyó los siguientes parámetros:

1. Exactitud: es la comparación de los resultados obtenidos, con los datos reales. Se expresa como el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Cant. Experimental}}{\text{Cant. Teórica}} \times 100$$

En el caso de los carotenoides en alimentos,

se analizaron por triplicado, dos muestras: a una de ellas se le adicionó una solución de aproximadamente 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada carotenoide.

El porcentaje de recuperación se determinó en triplicado para vegetales y para frutas.

2. Precisión: Es el grado de reproducibilidad y repetibilidad de un método, expresado por la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación porcentual (CV%) se calcula por:

$$\text{CV} = \frac{\text{DS}}{\text{Promedio}} \times 100$$

Se realizaron tres experimentos para vegetales y tres para frutas. Para vegetales se preparó una papilla de espinaca, zanahoria y tomate, luego de filtrar se repartió en doce fracciones de 5 g de cada una. Todas se guardaron cerradas, en atmósferas de nitrógeno, a menos  $20^{\circ}\text{C}$  y protegidas de la luz. Se analizaron en tres días diferentes: en réplicas de 6, 3, 3 cada una. Con los datos obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual. Para las frutas, se preparó otra papilla con papaya y se siguió el mismo procedimiento que se realizó para los vegetales.

3. Linealidad y rango: La linealidad es la capacidad de un método para obtener, de forma directa o después de una transformación matemática, resultados proporcionales a las concentraciones de analito dentro de un rango determinado.

El rango de un método analítico es el intervalo cuyos límites inferior y superior determinan al analito con precisión, exactitud y linealidad.

La linealidad se calcula por un tratamiento de regresión lineal entre los resultados obtenidos y la concentración de analito, generalmente se utiliza el método de mínimos cuadrados. La pendiente y el coeficiente de correlación de la regresión indican la linealidad (Parker, 1991).

En el método, se inyectaron soluciones de cada carotenoide de concentraciones entre 0.0 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , para obtener las curvas respectivas.

4. Límite de detección: En la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse.

Para encontrar el límite de detección de un método, se corre una muestra en blanco que no contiene analito, y se corren muestras que contengan diferentes concentraciones. Se busca que el límite de detección sea el doble o el triple de la medición que da el blanco, es decir una relación señal:ruido de 2:1 ó 3:1, donde la señal es la altura del pico del analito dividido por el valor absoluto de la fluctuación del ruido de la línea base (Parker, 1991).

5. Límite de cuantificación: Es el nivel más bajo de concentración de analito que se puede determinar con precisión y exactitud en las condiciones normales de análisis. En HPLC se calcula como el valor que tenga una relación señal:ruido de 10:1 (Parker, 1991)

CUADRO 1.  
ORDEN DE ELUCION DE LOS CAROTENOIDES

Carotenoide	Porcentaje de acetona en éter de petróleo
$\alpha$ -carotenoide	3
$\beta$ -carotenoide	5 - 8
$\beta$ -criptoxantina	15 - 20
Neoxantina	20
Violaxantina	35
Luteína	40
Zeaxantina	40
Licopeno	70 - 100

2. Espectros de absorción: Según los datos de máximos de absorción recopilados por Davies, se identificaron cada una de las bandas obtenidas en cromatografía en columna. Los máximos de absorción de las bandas obtenidas de mezclas de vegetales y de papaya fueron: según se indica en el cuadro 2.

### Resultados

- A. Purificación de patrones: Los carotenoides se identificaron en base a cuatro parámetros:

1. Orden de elución en la columna: con base a la experiencia obtenida después de realizar repeticiones de diferentes muestras, y- con ayuda de los espectros de absorción, se logró identificar el orden de elución de los carotenoides en cromatografía en columna abierta, usando MgO:Hyflo-super cel (1:2) como fase estacionaria:

CUADRO 2.  
MAXIMOS DE ABSORCIÓN OBTENIDOS EN LA  
PURIFICACIÓN DE PATRONES

Carotenoide	Solvente	Longitud de onda (nm)								
		Referencia (Davies, 1976)			Patrones comerciales			Patrones aislados de vegetales		
Luteína	Etanol	422	445	474	(418)	445	473	(421)	447	472
Zeaxantina	Etanol	(428)	451	478		453	478		449	475
Licopeno	Cloroformo	458	484	518	456	483	516	456	483	475
$\beta$ -criptoxantina	Cloroformo	(435)	459	485	(438)	462	489		462	490
$\alpha$ -caroteno	Eter de petróleo	422	444	473	421	444	473	420	443	471
$\beta$ -caroteno	Eter de petróleo	(425)	448	475	(423)	449	476	(422)	448	475
Neoxantina	Etanol	415	438	467				415	437	465

Los datos que se encuentran entre paréntesis corresponden a hombros, y no a picos definidos.

3. Reacciones químicas específicas: se realizaron tres pruebas espectrofotométricas básicas:
  - Prueba de la configuración electrónica: Al reaccionar con yodo, los enlaces que se encuentran en posición trans cambian a su isómero cis, que es más estable; se evidencia por la disminución de 4 nm en el máximo de absorción, sin que la forma del espectro cambie.
  - Prueba para grupos epóxidos: En presencia de ácido, los grupos epóxido tienden a romperse o formar un enlace más estable. Así, los epóxidos 5,6- se transforman en 5,8- al reaccionar con HCl. Se evidencia en el espectro de absorción por un desplazamiento hipsocrómico de 17 a 22 nm.
  - Prueba para grupos HO- alílicos secundarios: Los grupos HO- adyacentes a grupos alílicos reaccionan con metanol en presencia de ácido para formar grupos metóxido (MeO-).
4. Cromatografía en capa fina: solo se utilizó para diferenciar entre carotenos y xantofilas, ya que con las pruebas realizadas, usando metanol-éter de petróleo ó acetona-éter de petróleo como fase móvil, solo se logra que los carotenos eluyan con el frente del solvente, y las xantofilas pueden casi en el origen de la aplicación a la placa.

- B. Fuentes de carotenoides: se realizaron pruebas para aislar estándares a partir de los siguientes vegetales: espinaca, chaya, zanahoria y tomate para obtener luteína y  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos. Para licopeno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina fueron a partir de papaya. Se logró establecer los alimentos que son la mejor fuente para aislar patrones:

CUADRO 3.  
FUENTES DE CAROTENOIDES PARA AISLAMIENTO  
DE PATRONES

Carotenoide	Vegetal o fruta	Concentración aproximada ( $\mu\text{g/ml}$ )
Luteína	Espinaca	150
Zeaxantina	Papaya	80
$\beta$ -criptoxantina	Papaya	80
Licopeno	Papaya	200
$\alpha$ -caroteno	Zanahoria	400
$\beta$ -caroteno	Espinaca o zanahoria	500

## C. Determinación de las condiciones para la cromatografía

1. Columna: en el laboratorio se contaba con la columna Supercosil LC-18-5 de 5  $\mu\text{m}$ ; que, según los reportes del artículo de Epler et al., (1992), esta columna tiene fase estacionaria intermedia y en ella se pueden separar  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. No obstante, difícilmente se logra separar luteína y zeaxantina.
2. Composición de la fase móvil: se ensayaron varias proposiciones y combinaciones de solventes, y los mejores resultados se obtuvieron con una fase de metanol:tetrahidrofurano, con proporciones desde 87:13; ésta última proporciona la mejor separación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos con una resolución de 0.7205.
3. Longitud de onda: se trabajó el análisis a una longitud de onda fija de 450 nm. Se eligió este valor debido a que en este punto se encuentra el pico máximo de absorción, en la mayoría de los carotenoides de interés.
4. Velocidad del flujo: el flujo de 1.5 ml/min se utilizó debido a que proporciona una buena separación entre picos, sin hacer el tiempo final de cada análisis excesivamente largo: 25 minutos.

Con estas condiciones se obtuvo la separación de carotenoides, en el tiempo 3.941 minutos se encuentra Luteína + Zeaxantina, en el tiempo 9.820 minutos se encuentra la  $\beta$ -criptoxantina, en el 21.654 el Licopeno, y en 24.364 y 25.829 se encuentran  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos respectivamente.

- D. Método: el método implementado para la determinación del perfil de carotenoides en vegetales y frutas se detalla en la tesis de la autora.

### Discusión

Los resultados que se obtuvieron al aislar patrones, fueron satisfactorios; ya que se logró aislarlos con un alto grado de pureza. Sin embargo, la cantidad que se obtiene de cada carotenoide, depende de la matriz utilizada y la concentración no es reproducible debido a la variabilidad entre alimentos.

Para aislar los carotenoides no se tomó en cuenta la especie, debido a que lo que se buscaba era que el método pudiera aplicarse a cualquier tipo de alimento. Los únicos parámetros que se tomaron en cuenta para elegir el alimento, fueron que estuviera fresco y que su color fuera intenso.

Al final se determinó que los alimentos más adecuados para obtener estándares eran espinaca, zanahoria y papaya, tal como se indica en el CUADRO 3 de los Resultados. Esto se determinó con base en:

- a. La facilidad adquisitiva del alimento
- b. La mayor facilidad de extracción
- c. La concentración más alta

Para almacenar los carotenoides aislados, se tomaron las siguientes precauciones: mantenerlos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , adicionales BHT (1%) como antioxidante y guardarlos bajo atmósfera de nitrógeno. Bajo estas condiciones los patrones permanecían razonablemente estables utilizándolos tres veces por semana, durante aproximadamente dos meses. La degradación se verificaba por la aparición de picos correspondientes a impurezas, en los cromatogramas respectivos. Debido a esta degradación, con la extracción de 40 gramos de espinaca y 80 gramos de papaya, se obtenía la cantidad suficiente de patrones para dos meses de trabajo.

Con la columna que se tenía para montar y validar el método, no es posible lograr una separación para luteína y zeaxantina: solo se pueden separar cinco carotenoides de los seis propuestos, además, la separación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos, no fue óptima: la resolución, obtenida con la fórmula:

$$R = \frac{2 (tr^2 - tr^1)}{Wb_2 - Wb_1}$$

fue de 0.7205 entre los carotenos. Este resultado se esperaba que fuese lo más cercano a 1, para una separación total entre dos compuestos.

La luteína y la zeaxantina será siempre reportada siempre como luteína, y se cuantifica con base en ésta solamente. Para determinar los porcentajes de recuperación, lo ideal es contar con muestras que no contengan el analito que se desea encontrar, es difícil encontrar un vegetal o fruta que no contenga carotenoides, por lo que se optó por utilizar alguno que tuviera muy poco, se eligió camote para los vegetales, y papaya para las frutas, procurando en este caso, que su coloración fuera la más pálida posible.

La exactitud en las frutas no se determinó para al  $\alpha$ -caroteno, debido a que, según las tablas de composición de alimentos, no se encuentran en cantidades cuantificables.

Se puede observar una variabilidad entre los resultados obtenidos: la recuperación de frutas, es menor que para vegetales, y su desviación estándar mayor. Esto se debe a que las frutas llevan el proceso de saponificación con KOH, el que puede producir algún tipo de degradación en los carotenoides.

En general, se puede observar que la variación intraensayo es mayor que la variación interensayo, lo que se debe a que, en esta última, los promedios de cada día permiten cierta compensación entre los datos, lo cual no se da en la variación intraensayo. Esto se debe a que la homogenización de la muestra utilizando la Bati-Max no es efectiva. Sin embargo, éste equipo fue el que mejor se adaptó a las necesidades del método: por el hecho de que la extracción se lleva a cabo utilizando solventes, no se puede utilizar una licuadora o cualquier equipo que tenga partes plásticas. En el caso de la linealidad, el número de puntos utilizados estaba limitado para que el tamaño del pico no fuera mayor que los márgenes utilizados en la hoja de impresión del cromatograma. Se utilizó la atenuación más baja, 1, que permite detectar cantidades más pequeñas.

### Conclusiones

1. El método que se montó fue suficiente para la separación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, y licopeno. Sin embargo, con la columna utilizada, no es posible lograr la separación entre luteína y zeaxantina. Con estos resultados, se debe rechazar la hipótesis planteada para la investigación.
2. Los alimentos que se consideran más apropiados para aislar carotenoides, son espinaca, zanahoria y papaya.
3. Si los patrones de carotenoides se almacenan en recipientes protegidos a la luz, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y bajo atmósfera de nitrógeno, se mantienen en condiciones razonablemente estables, por dos meses.
4. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los carotenoides en alimentos son:

Carotenoide	Porcentajes de recuperación (%)	
	Vegetales	Frutas
Luteína	106 $\pm$ 4	71 $\pm$ 10
$\beta$ -Criptoxantina	87 $\pm$ 6	76 $\pm$ 13
Licopeno	85 $\pm$ 1	83 $\pm$ 16
$\alpha$ -Caroteno	98 $\pm$ 4	72 $\pm$ 9
$\beta$ -Caroteno	94 $\pm$ 2	87 $\pm$ 1

### Recomendaciones

1. En la medida de las posibilidades del laboratorio que vaya a utilizar éste método, experimentar el análisis con una columna polimérica para lograr separación entre luteína y zeaxantina. En el artículo publicado por Epler et al. (1992), hay un listado de las que ellos evaluaron y cumplen con ésta característica.
2. Validación con participación en estudios colaborativos interlaboratorios.

### Referencias

1. Adewusi, S. R. A. y Howar Bradbury. 1993. Carotenoids in Cassava: Comparison of Open-Column and HPLC Methods of Analysis. *J. Sci. Food Agric.* 62: 375-383.
2. Craft, N. E. 1992. Carotenoid Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Methods: Reference Compendium. En *Methods in Enzymology*. Vol. 213. Pp 185-205.
3. Davies, B. H. 1976. Carotenoids. En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2 ed. London, Academic Press. Vol. 2. Pp 38-165.
4. Epler, K. L. C. Sander, R. G. Ziegler, S. A. Wise y N. E. Craft. 1992. Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *J. Chromatogr.* 595: 89-101.

5. Hart, D. y K. J. Scott. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruit commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54: 101-111.
6. Latinfoods. 1986. Memorias de la primera reunión sobre tablas de composición de alimentos. *Latinfoods*, 11-14 Nov. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 37 (4): 609-810.
7. Mangles, A. R., et al. 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.* 93: 284-296.
8. Official Methods of Analysis of the AOAC. 1984. 14 ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists, Pp 834-835.
9. Parker, G. A. 1991. Validation in the Florida Department of Agriculture and Consumer Services' Chemical Residue Laboratory. *J. Assoc. Of. Anal. Chem.* 74(5): 868-872.
10. Rodriguez-Amaya, D. B. 1989. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* 5: 191-225.
11. Rodriguez-Amaya, D. B. y Amaya-Farfán, J. 1992. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 42(2):180-191.
12. Rodriguez-Amaya, D., M. Kimura, H.T. Godoy y H. K. Arima. 1988. Assesment of Provitamin A Determination by Open Column Cromatography/ Visible Absorption Spectrophotometry. *J. Chromatogr. Sci.* 26(12): 624-629.
13. Scott, K. J. 1992. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food chem.* 45: 357-364.
14. Scott, K. J. y D. J. Hart. 1993. Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC – 2: Column temperature. *Food Chem.* 47: 403-405.