

Desarrollo de un método por HPLC en fase reversa para la determinación de ácidos grasos de cadena corta. Development of a reverse-phase HPLC method for the determination of short-chain fatty acids

M. Hurtado-Y de la Peña , O.D. Sarabia-Torres , G. Alarcón-Ángeles , A. Azaola-Espinosa R. 

^a Departamento de Sistemas biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, 04960, CDMX, México.

Resumen

Se desarrolló un método analítico para cuantificar cuatro ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en muestras de heces fecales y se probó en 24 voluntarios. Se utilizó un sistema cromatográfico de fase reversa (C8) aplicando la técnica de par iónico con cloruro de tetraetilamonio como supresor iónico. Se utilizó un detector UV a 210 nm, el intervalo de concentraciones de las curvas de calibración fue de 0.5 a 5 mg/ml con coeficientes de variación menores al 2% y linealidades con coeficientes de determinación superiores a 0.98. No obstante el intervalo de trabajo es relativamente alto, fue posible la detección de este grupo de compuestos entre los voluntarios participantes.

Palabras Clave: Ácidos grasos de cadena corta, Par iónico, Carbohidratos no digeribles (NDC)

Abstract

A high-performance liquid chromatography method was developed to quantify four short chain fatty acid (SCFAs) in fecal samples, and it was tested in 24 volunteers. It was used a reversed-phase system, applying the ion-pair technique using tetraethylammonium as the counterion. The UV detector was at 210 nm. The range of calibration curves was of 0.5 to 5 mg/ml with variation coefficients lower than 2% and coefficients of determination higher than 0.98. However, even if the concentrations ranges are high, the quantification of these compounds was possible among the volunteers.

Keywords: Short chain fatty acids, pair ionic, Non-digestibles carbohydrates (NDC).

1. Introducción

La FDA reconoce la importancia y beneficios a la salud de los carbohidratos no digeribles (NDC) en la dieta, se ha descrito que controlan la glucosa e insulina en la sangre, disminuyen los niveles de colesterol, laxantes, participan en la absorción gastrointestinal de minerales y en la sensación de saciedad. (Alexander C. et.al 2019, Johnstone A., et al 2020)

Los NDC son resistentes a la digestión por parte de las enzimas de los mamíferos, pero son sustrato para la fermentación por parte de enzimas bacterianas que habitan el tracto gastrointestinal (microbiota) y dan lugar a los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) los cuales tienen una serie de efectos fisiológicos de gran significado metabólico en la salud. (Alexander C. et.al 2019)

Entre los principales SCFAs producidos están el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico. en una proporción de 60:20:20 respectivamente. El ácido acético es el más abundante, el ácido butírico está más asociado con el consumo de fibra dietética y la jhmicrobiota intestinal. (Alexander C. et.al 2019)

El impacto más significativo de los NCD sobre la salud, está relacionado a las enfermedades metabólicas, llamando especialmente la atención la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, por los efectos que los NCD guardan con la obesidad y el sobrepeso.

Entre los mecanismos que se han identificado como parte de los efectos benéficos de algunos tipos de NCD (solubles), es la alta viscosidad, esta situación genera además de una sensación de saciedad, interfiere con la absorción del

*Autor para la correspondencia: mhurtado@correo.xoc.uam.mx

Correo electrónico: mhurtado@correo.xoc.uam.mx (Marcela Hurtado de la Peña), odstqfb94@gmail.com (Oscar Sarabia-Torres), galarcon@correo.xoc.uam.mx (Georgina Alarcón-Angeles), azaola@correo.xoc.uam.mx (Alejandro Azaola Espinosa)

colesterol y los lípidos, además de mejorar la función intestinal.

Los SCFA han sido asociado con funciones como reducir el riesgo de enfermedad coronaria, diabetes, algunos tipos de cáncer así como mejorar el sistema inmune. (Chanmuang S. et. al 2022)

Los efectos que los SCFAs han sido objeto de una gran cantidad de reportes que buscan explicar y relacionar sus efectos sin lugar a duda con diferentes procesos. Se ha determinado que después de absorberse a la circulación los SCFAs, participan en un gran número de funciones fisiológicas importantes del huésped, ayudando a mantener la homeostasis. (Ikeda T. et.al 2022; Ashique S et.at 2022; Rasouli A. et.al 2023, Sankarganesh P. et al 2025)

El seguimiento de la presencia intestinal de los SCFAs no resulta sencilla, dadas las características de estas moléculas. Por un lado, su estadía en heces fecales puede ser incierta por la alta proporción de absorción que se espera de ellas, es común que en heces fecales sólo se localice del 5 al 10%, (Ashique S. et al 2022) por otro lado, lo complejo de la matriz analítica, el pequeño tamaño molecular de los SCFAs, su polaridad y la falta de estructuras cromóforas significativas representan limitantes para su detección. Aún en sistemas de detección con carácter relativamente universal como espectrometría de masas reporta tratamientos mediante una derivatización para mejorar sensibilidad y comportamiento cromatográfico. (Zhang S et al 2019).

En esta propuesta se ha realizado una alternativa a fin de utilizar elementos analíticos relativamente comunes para tratar en la medida de lo posible de resolver el problema analítico. Se utilizó un detector de UV de longitud de onda variable a una longitud de onda de detección de 210 nm. Por otro lado, tratándose de compuestos muy polares, su retención en un sistema de fase reversa es inviable, los analitos no tienen interacciones significativas con la superficie no polar de la fase estacionaria y por lo tanto se eluyen inmediatamente y con nula resolución, dado lo anterior, se propone el uso de un sistema de par iónico. El incremento del carácter hidrófobo del par-iónico resulta en una mayor afinidad por la fase reversa estacionaria no polar y permite incrementar la resolución de los SCFAs así se logra la retención y separación de cuatro SCFAs.

2. Procedimiento

2.1. Equipo

Se utilizó un sistema cromatográfico (Pro Star Varian) equipado con una bomba ternaria MOD 240, automuestreador MOD 410, detector UV de longitud de onda variable MOD 330.a una longitud de 210 nm.

2.2. Reactivos

Se utilizó metanol grado HPLC marca J.T.Baker, ácido fosfórico J.T.Baker que se ajustó al pH con hidróxido de sodio 1 N, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, y ácido butírico, Sigma Aldrich, México, cloruro de tetraetilamonio, Merck, México, agua grado HPLC obtenida mediante el sistema Symplicity (Millipore Corporation, USA)

2.3. Condiciones cromatográficas

Columna Zorbax C8 SB, 250 × 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies. Fase móvil: mezcla de buffer de fosfatos pH 2.8 0.001 M añadida con cloruro de trietaihlmonio a una concentración de 0.0025M: metanol 90:10. Volumen de inyección: 40 microlitros.

Intervalo de concentraciones de las curvas de calibración de 0.5 a 5 mg/ml para los cuatro SCFAc en fase móvil.

2.4. Preparación de muestras.

El método se probó en muestras fecales de 24 voluntarios sanos, las cuales fueron tratadas de la siguiente forma: se tomó una muestra de materia fecal de 0.5 g se disolvió en 1.5 ml de agua destilada se centrifugó a 5000 rpm, el sobrenadante se filtró por membranas de 0.45 micrómetros y las muestras fueron inyectadas en las condiciones indicadas analizando contra curvas de calibración de cada uno de los SFCAs señalados en el método. Los SCFAc son libremente solubles en agua, por lo que se espera una alta recuperación de éstos en la fase soluble de la muestra después del tratamiento.

3. Resultados y discusión

En la figura 1 y 2 se muestran cromatogramas típicos obtenidos, la figura 1 corresponde a un cromatograma blanco, mientras que la figura 2 a la mezcla de los SFCAs. La resolución cromatográfica entre los SFCAs es adecuada y se logró la retención de los SFCAs en un sistema no polar utilizando la alternativa de par iónico. El incremento del carácter hidrófobo del par-iónico resulta en una mayor afinidad por la fase estacionaria no polar y permite incrementar la resolución de los SCFAs así se logra la separación de cuatro SCFAs utilizando una cromatografía isocrática.

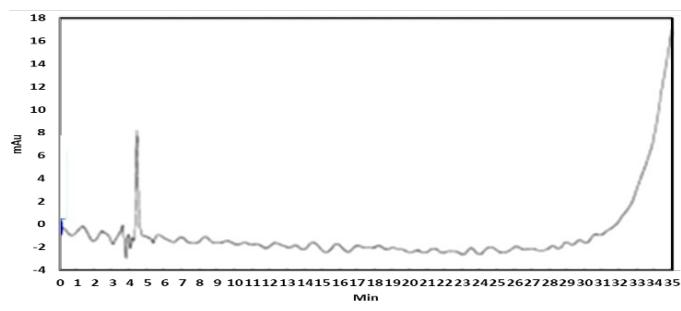


Figura 1: Cromatograma blanco.

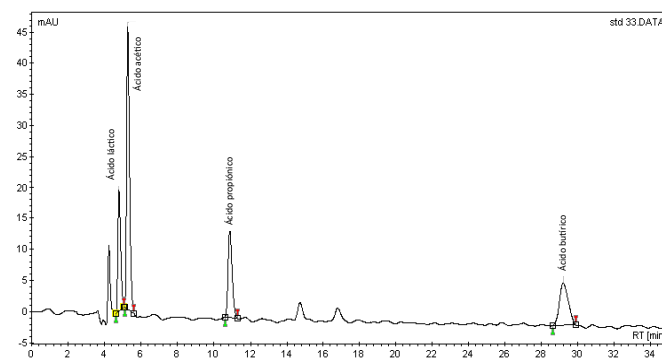


Figura 2. Mezcla de los cuatro ácidos grasos de cadena corta. Tiempos de retención: Ac láctico: 4.93 min Ac. Acético: 5.30minAc. Propiónico: 10.83minAc. Butírico: 29.79 min.

3.1. Validación de las condiciones cromatográficas

Tabla 1. Resultados para precisión de ácido láctico. (r² = 9996)

Concentración [µg/mL]	n	mUA*seg	Media	Desviación estándar	CV %
445.09	1	719.3	710.9	8.35	1.17
	2	702.6			
	3	710.8			
1365.27	1	2092.4	2094.9	4.86	0.23
	2	2100.5			
	3	2091.8			
2275.45	1	3449.2	3449.27	0.61	0.02
	2	3448.7			
	3	3449.9			
3185.63	1	4865.7	4877	21.51	0.44
	2	4901.8			
	3	4863.5			
4450.9	1	6734.7	6791.4	98.55	1.45
	2	6905.2			
	3	6734.3			

En las tablas de 1 a la 4 se muestran los resultados en la evaluación de la precisión de las condiciones cromatográficas para cada uno de los SCFAs, con valores de coeficientes de variación aceptables (< 2%) para sistemas cromatográficos (Agut C et al., 2011)

Tabla 3. Resultados para precisión de Ac. Propiónico.(r²= 0.9998)

Concentración [µg/mL]	n	mUA*seg	Media	Desviación estándar	CV %
499.8	1	806.4	814.7	10.79	1.32
	2	826.9			
	3	810.8			
1499.4	1	2456.4	2417.8	43.22	1.79
	2	2371.1			
	3	2425.9			
2499	1	4003.7	4006.4	3.53	0.08
	2	4010.4			
	3	4005.1			
3498.6	1	5505.2	5552.9 3	48.52	0.87
	2	5602.2			
	3	5551.4			
4998	1	7891.9	7963.3 7	63.78	0.81
	2	8014.5			
	3	7983.7			

Tabla 2. Resultados para precisión de ácido acético (r² = 0.9992)

Concentración [µg/mL]	n	mUA*seg	Media	Desviación estándar	CV %
512.8	1	749.6	745.77	8.25	1.11
	2	736.3			
	3	751.4			
1538.4	1	2398.8	2366.4	28.72	1.21
	2	2344.1			
	3	2356.3			
2564	1	3983.7	3964.63	32.76	0.83
	2	3926.8			
	3	3983.4			
3589.6	1	5535	5518.73	22.86	0.41
	2	5492.6			
	3	5528.6			
5128	1	7902.5	7747.3	134.53	1.74
	2	7664			
	3	7675.4			

Tabla 4. Resultados para precisión de ácido butírico (r²= 0.998)

Concentración [µg/mL]	Inyección	mUA*seg	Media	Desviación estándar	CV %
512.8	1	872.8	867.07	11.07	1.28
	2	854.3			
	3	874.1			
1538.4	1	2430.9	2453.1 3	42.19	1.72
	2	2501.8			
	3	2426.7			
2564	1	4186.4	4193	7.46	0.18
	2	4201.1			
	3	4191.5			
3589.6	1	6162.2	6175.0 3	15.32	0.24
	2	6192			
	3	6170.9			
5128	1	8425.6	8427.0 7	10.97	0.13
	2	8416.9			
	3	8438.7			

Tabla 5. Resultados para SCFAs en heces fecales en mg/g de muestra datos de 24 voluntarios

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido propiónico	Ácido butírico
0.81	17.4	6.57	ND
ND	40.8	39.6	ND
ND	4.05	1.95	ND
ND	8.61	1.866	ND
ND	24.36	1.38	ND
ND	14.79	5.19	ND
ND	ND	ND	ND
0.3	0.075	0.72	0.192
ND	0.84	0.6	ND
ND	2.19	10.95	ND
ND	9.66	1.56	ND
ND	10.5	6.69	1.47
ND	2.73	2.85	
ND	5.19	0.63	ND
ND	11.58	2.61	1.11
ND	0.81	4.98	1.53
ND	9.6	2.76	ND
ND	0.24	1.92	ND
ND	ND	19.542	ND
ND	70.23	49.05	ND
ND	6.72	29.85	ND
ND	54.96	36.51	ND
6.18	41.76	46.02	ND
ND	101.19	36.54	ND

3.2

Análisis de muestras

Dada la poca absorción de los SCFAs, el intervalo de concentraciones que se reportan para la cuantificación es relativamente alto de 0.5 a 5 mg/ml. Sin embargo, se presenta una muestra biológica, prácticamente sin tratamiento, lo que se propone para mejorar los niveles de detección del método, es un proceso de concentración de la muestra mediante una extracción en fase sólida posterior a la filtración que permitiera enriquecer la concentración de los analitos y mejorar los límites de cuantificación del método, procedimiento que ha resultado exitoso en otros tratamientos (Hurtado et al. 2009). En este método exploratorio de las condiciones cromatográficas y tratamiento fue posible la detección de los SCFAs y se ha observado comportamientos esperados en cuanto a las relaciones entre los SCFAs (Zhang S. et al. 2019), como se puede ver en la tabla 5, los ácidos acético y propiónico son más frecuentes y abundantes resultando menos detectable el ácido láctico y el ácido butírico; este último por la importancia biológica que representa, se recomendaría el proceso de concentración de muestra mencionado para cuantificar los niveles inferiores del

ácido graso que podrían esperarse de acuerdo con la relación relativa al ácido acético y propiónico.

4. Conclusiones

Dadas las dificultades que estos compuestos representan para su análisis en un sistema cromatográfico estándar de fase reversa y con detección ultravioleta. El método propuesto es una aportación particularmente útil a la aplicación, la cual fue demostrada en 24 muestras de voluntarios sanos. Los resultados obtenidos, coinciden con lo reportado en cuanto a la relación ácido acético, propiónico, ácido butírico al igual que en la variabilidad interindividual.

El método cromatográfico desarrollado ofrece una alternativa viable para la determinación de los compuestos de interés, con elementos y equipamiento usual de laboratorio, y presenta parámetros de validación confiables.

Para alcanzar niveles de cuantificación inferiores a los alcanzados en este trabajo, se propone utilizar un pretratamiento de concentración de muestra mediante extracción en fase sólida, técnica que suele ofrecer excelentes resultados para este fin.

5. Referencias

- Agut C., Caron A., Giordano C., Hoffmann D., Ségolini A., (2011) Transfer of analytical procedures: A panel of strategies selected for risk management, with emphasis on an integrated equivalence-based comparative testing approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56, 293–303. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.05.034.
- Alexander C., Swanson K.S., Fahey G.C.Jr., Garleb K.A (2019). Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation. *Advances in nutrition*,10(4),576-589. DOI: 10.1093/advances/nmz004
- Ashique S., De Rubis G., Sirohi E., Mishra N., Rihan M., Garg A., Reyes R. J., Manandhar B., Bhatt S., Kumar Jha N., Singh T.G., Gupta, G., Singh S.K., Chellappan D.K., Paudel K.R., Hansbro P.M., Oliver B.G., Dua K. (2022). Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. *Biological Interactions*, 368,110231 DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110231
- Chanmuang S., Nguyen Q.A., Kim H.J., (2025) Current research on effects of non-digestible carbohydrates on metabolic disease. *Applied Sciences*, 12,3768. DOI: 10.3390/app12083768
- Hurtado y de la P., M.; Correa L., T., Soria A., O., Lozada G., C., Medina L., J.R., Domínguez R., A.M. (2010). Desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de sulfóxido de albandazol en orina. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*,41(1),30-36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912960004>
- Ikeda T., Nishida A., Yamano M., Kimura I. (2022). Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 239,108273
- Johnstone A.M., Kelly J., Ryan S., Romero-Gonzalez R., McKinnon H., Fyfe C., Naslund E., Lopez-Nicolas R., Bosscher D., Bonnema A., Frontela-Saseta C., Ros-Berruazo G., Horgan G., Ze X., Harrold J., Halford J., Gratz S.W., Duncan S.H., Shirazi-Beechey S., Flint H.J. (2020) Nondigestible carbohydrates affect metabolic health and gut microbiota in overweight adults after weight loss. *The Journal of Nutrition*, 150,1859–1870. DOI:10.1093/jn/nxaa124.
- Rasouli-Saravani A., Jahankhani K., Moradi S., Gorgani M., Shafagh Z., Mirsanei Z., Mehmandar A., Mirzaei R., (2023). Role of microbiota short-chain fatty acids in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,162,114620. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114620
- Sankarganesh P., Bhunia A., Kumar A.G., Babu A.S., S.T. Gopukumar S.T., Lokesh E., (2025) Short-chain fatty acids (SCFAs) in gut health: Implications for drug metabolism and therapeutics. *Medicine in Microecology*, 25, 100139. DOI: 10.1016/j.medmic.2025.100139
- Zhang S., Wang H., Zhu M.J. (2019) A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. *Talanta*, 196,249–254. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.049

ACEPTADO--ACCEPTED