

DETECCION DE B-CAROTENO MEDIANTE HPLC

J.C. García, R. Mayarí,* M.C. Espinosa,* E. Ríos** y R.O. Cañizares**

Centro Iberoamericano de Trasplante y Regeneración del Sistema Nervioso, Ave. 25 No. 15805, e/ 158 y 160, *Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. **Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ave. del IPN No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F.

Recibido: 20 de noviembre de 1993.

RESUMEN. De los compuestos carotenoides uno de los más importantes es el β -caroteno, ya que es el precursor de la vitamina A, la cual es imprescindible en la dieta del hombre. Para la detección de β -caroteno se utilizó un sistema de HPLC isocrático, de fase reversa, con detección a 436 nm. Se empleó como fase móvil metanol-acetonitrilo (9:1), inyectándose entre 5 y 20 μ L de muestra o patrón, a través de un inyector manual Rheodyne. Como patrón externo se utilizó β -caroteno, en un rango entre 0,14 - 1,12 μ g/20 μ L de n-hexano. El método desarrollado alcanzó una sensibilidad (2DS) de 35,45 μ mol/L; coeficiente de variación de 2,2 %; recobrado de 93 %; tiempo de retención promedio (β -caroteno) 21,8 min; factor de capacidad de 9,07 y 8,37, para el α y β -caroteno, respectivamente, y una selectividad de 1,09. Los resultados demostraron que la técnica desarrollada puede aplicarse a muestras biológicas para la detección de β -caroteno en suspensiones de este compuesto en aceite vegetal, obtenidas a partir de microalgas.

ABSTRACT. B-carotene is one of the most important carotenoid compounds, because it is vitamin A precursor, which is indispensable in the man diet. It was used an isocratic reversed-phase HPLC system, with methanol-acetonitrile (9:1, v/v) as the mobile phase to determine β -carotene. This compound was quantified using an UV-VIS detector at 436 nm, applying the method of external standard with β -carotene. The concentrations of working standard solutions were between 0,14 - 1,12 μ g/20 μ L in n-hexane. With this technique it was obtained a sensitivity of 35,45 μ mol/L; analytical recovery, 93 %; precision, 2,2 %; average retention time, 21,7 min; capacity factor, 9,07 and 8,37, of α and β -carotene respectively, and a selectivity of 1,09. Method applicability for oily suspensions of microalgae rich in β -carotene was demonstrated.

INTRODUCCION

La mayoría de los estudios sobre carotenoides han estado relacionados con el aislamiento e identificación de estos pigmentos en plantas¹ y en fluidos o tejidos de animales inferiores,² aunque evidencias recientes sugieren que algunos de estos compuestos, además de su capacidad para actuar como precursores de la vitamina A (provitamina A), pueden estar involucrados en otros procesos bioquímicos en animales superiores y humanos.

Se ha postulado un efecto protector del β -caroteno contra el cáncer.³⁻⁵ El hecho de que esta hipótesis sea aún algo especulativa, no ha impedido el surgimiento de un nuevo interés acerca del papel de los carotenoides en los organismos vivos.

Diferentes factores han revitalizado el interés en la determinación del β -caroteno (provitamina A). Entre ellos, se tiene: el déficit persistente de vitamina A en países en desarrollo, investigaciones recientes que le atribuyen una gran importancia y una activa participación contra el estrés oxidativo, y la posibilidad de detectar estos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).⁶

Se ha recomendado el uso de las columnas de fase reversa (RP) para la detección de carotenos por HPLC, ya que existen evidencias que la gel de sílice utilizada en las columnas de fase normal, cataliza la degradación de esos compuestos.⁷

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología sensible, precisa y exacta para la determinación del β -caroteno por HPLC, con detección visible, utilizando columnas RP en suspensiones de este compuesto en aceite vegetal, obtenidas a partir de microalgas.

MATERIALES Y METODOS

Para la detección y determinación del β -caroteno se utilizó un sistema HPLC Unicam isocrático de fase reversa, compuesto por una bomba PU 4100 y un detector UV-VIS PU 4021, a una sensibilidad de 0,08 abs., y a una longitud de onda de 436 nm. Como fase móvil (FM) se utilizó la mezcla de metanol-acetonitrilo (9:1), con velocidad de flujo de 2 mL/min.

Para la aplicación de la muestra y los patrones (5-20 μ L), se utilizó un inyector manual Rheodyne.

La separación de la muestra y los patrones se realizó en una columna Supelcosil LC-18 (250 x 4,6) mm, rellena con partículas esféricas de 5 μ m, monomérica, con un diámetro de poro de 10⁵ nm, con precolumna Pelliguard de (50 X 4,6) mm, empacada con material pelicular, de 40 μ m de diámetro.

Como patrón externo se empleó β -caroteno (Sigma, USA) (que contenía entre 10 y 20 % de α -caroteno).

El patrón externo se disolvió en n-hexano, preparándose una solución patrón de concentración 56 mg/L, de la cual se tomaron diferentes alícuotas para la preparación de la curva de calibración (rango: 0,14 - 1,12 μ g/20 μ L).

El cálculo de las alturas de los picos cromatográficos se realizó mediante el paquete de programas CHROMPC.

Los solventes utilizados fueron calidad HPLC. Las muestras y los patrones fueron conservados a -20 °C hasta el momento del análisis. Las determinaciones se realizaron, como mínimo, por duplicado.

La validación del método desarrollado se realizó mediante los ensayos de: **sensibilidad** (según el criterio del doble de la desviación estándar, 2S); **repetibilidad** (calculando el coeficiente de variación, CV(%), en la determinación de una

muestra); **exactitud** (calculando el porcentaje de recobrado, por el método de adición de concentraciones conocidas del patrón externo a una muestra de concentración ya determinada). Los resultados se procesaron mediante el paquete de programas estadísticos MICROSTAT.⁸ Además, se calcularon los **factores de capacidad** (k') y la **selectividad** (α)^{9,10} para el α y β -caroteno.

El método propuesto se ensayó en suspensiones de β -caroteno en aceite vegetal, obtenidas a partir de cultivos de *Dunaliella bardawil*.

RESULTADOS Y DISCUSION

La curva de calibración del patrón externo presentó un comportamiento lineal ($r = 0,9886$), indicando que existe una buena respuesta de las alturas de los picos a las distintas concentraciones de aquel, en un rango de 0,14 a 1,12 μg , para un volumen de inyección de 20 μL .

La tabla I muestra la repetibilidad para la determinación de β -caroteno por HPLC, en un extracto de microalgas unicelulares, encontrándose un coeficiente de variación del 2,2 % ($n = 3$), el cual resulta similar a los reportados,^{11,12} para este

tipo de análisis. Además, el tiempo de retención del β -caroteno varió solamente en 1,2 %

TABLA I
Repetibilidad en una muestra

Inyección	t_r (min)	Altura del pico	β -caroteno (mg/L)
I	21,6	2 065	413
II	21,5	2 147	429
III	22,0	2 150	430

Es necesario señalar que en este tipo de técnica, resulta un criterio generalizado, que el tiempo de la corrida cromatográfica para una muestra no exceda los 30 min. Para lograr este requerimiento, fue necesario utilizar velocidades de flujo relativamente altas (2 mL/min)

Los picos correspondientes a los isómeros α y β -caroteno se muestran en un cromatograma del patrón externo (Fig. 1).

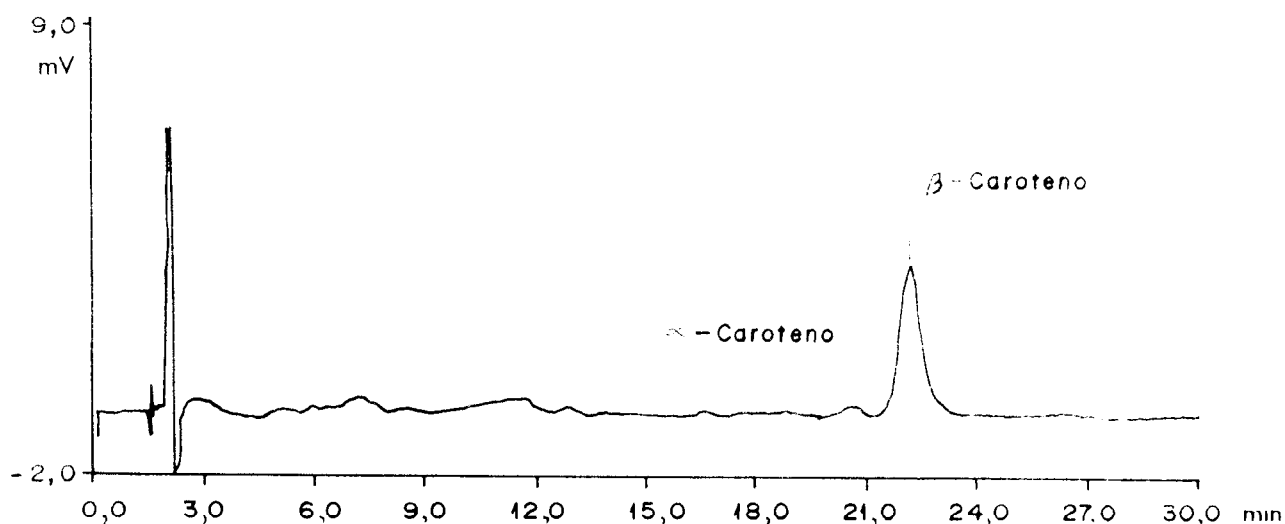


Fig. 1. Cromatograma del patrón externo (β -caroteno) a 436 nm. Condiciones cromatográficas: columna Supelcosil LC-18. Fase móvil: metanol-acetonitrilo (9:1). Velocidad de flujo: 2 mL/min. Concentración de β -caroteno: 1,12 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$.

La prueba de exactitud (Tabla II) alcanzó, como media general un 93 % de recobrado. La ecuación de regresión que relaciona las concentraciones de patrón externo adicionado (CPEA) y las concentraciones totales de β -caroteno halladas (CTH) en la muestra (concentración original de muestra + CPEA) resultó:

$$\text{CTH} = 0,518 + 1,14 (\text{CPEA}) \quad r = 0,9743$$

TABLA II
Determinación del recobrado por adición de β -caroteno a una muestra

β -caroteno añadido	Muestra + β -caroteno		Recobrado (%)
	Teórico	Real	
0,18	0,63	0,64	103
0,28	0,73	0,66	91
0,37	0,82	0,70	85
0,56	1,01	0,95	94
Promedio			93

Los valores de recobrado obtenidos se correspondieron con lo esperado, al utilizar una fase estacionaria monomérica y como FM metanol.¹³

Los parámetros fundamentales del método cromatográfico desarrollado se presentan en la tabla III.

TABLA III
Características generales del método cromatográfico desarrollado

Parámetros	Valores
Sensibilidad (2DE)	35,45 $\mu\text{mol/L}$
CV (%)	2,2
Recobrado (%)	93
Selectividad (β/α)	1,09
Tiempos de retención (min)	
β -caroteno	21,8
α -caroteno	20,6
Factor de capacidad (k')	
β -caroteno	9,08
α -caroteno	8,37

Se obtuvo una sensibilidad de 35,45 $\mu\text{mol/L}$ (380 ng en un volumen de inyección de 20 μL), lo cual permitió realizar el análisis cuantitativo de las muestras analizadas.

Los valores de k' obtenidos para el α y β -caroteno (presentes en el patrón externo) fueron de 8,37 y 9,08, respectivamente, indicativos de una adecuada separación (Fig. 1), la que se ve expresada mediante un valor de selectividad de 1,09.

Tanto las k' como la selectividad calculada, satisfacen los requerimientos establecidos para estos importantes parámetros cromatográficos, ya que teóricamente, se consideran como valores óptimos para la k' y la selectividad, aquellos

que se encuentran entre 1 y 10 para la primera y los que son superiores a 1, para la segunda.¹⁴

Las figuras 1 y 2 muestran cromatogramas típicos del patrón externo y de la muestra, respectivamente, donde se ilustra la separación cromatográfica alcanzada. En la figura 1, se observa la separación entre los isómeros α y β presentes en el patrón de β -caroteno utilizado, mientras que en la figura 2 (muestra) sólo es detectado el isómero β , lo cual puede interpretarse como que el isómero α estaba en concentraciones por debajo de la sensibilidad del método (que no está determinada para este compuesto), o no se encontraba presente en esta muestra.

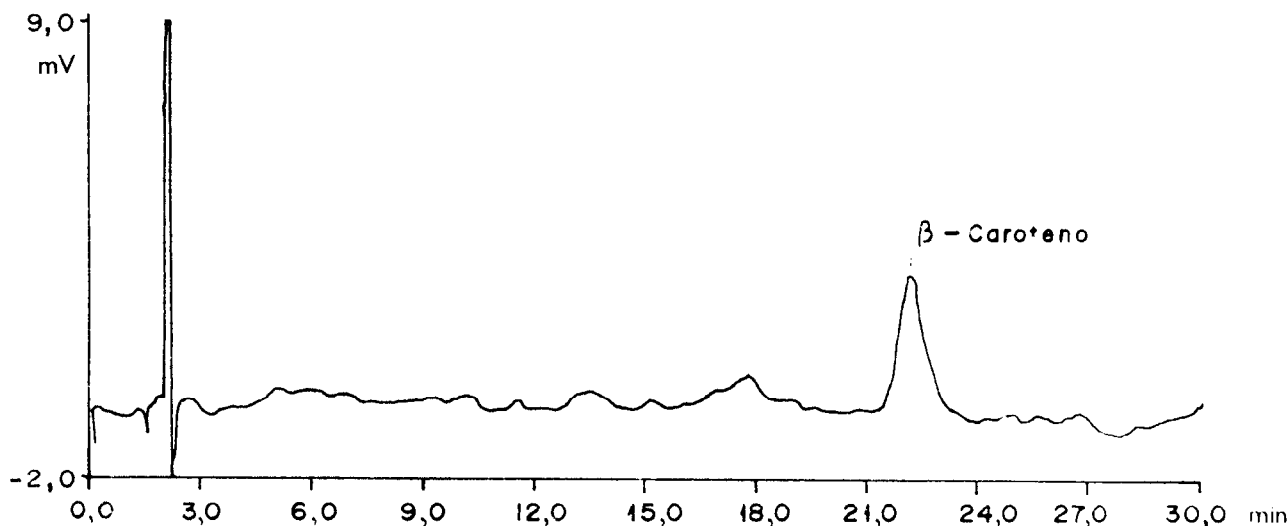


Fig. 2. Cromatograma del extracto de microalgas unicelulares a 436 nm .
Condiciones cromatográficas: columna Supelcosil LC-18. Fase móvil: metanol-acetonitrilo (9:1).
Velocidad de flujo: 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Volumen de inyección: 20 μL .

Estos resultados demuestran que la técnica desarrollada podría ser usada para la detección de β -caroteno en suspensiones en aceite vegetal obtenidas a partir de microalgas, en niveles de concentración tan bajos como 35,45 $\mu\text{mol/L}$.

CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado para la determinación de β -caroteno en suspensiones en aceite vegetal obtenidas a partir de microalgas, empleando HPLC en fase reversa, es sensible, preciso y exacto, lográndose altos valores de recobrado en la columna monomérica C_{18} utilizada.

BIBLIOGRAFIA

1. Goodwin T.W. *The Biochemistry of the Carotenoids*, Vol. I, Plants Chapman and Hall, London, 1980.
2. Simpson K.L., Katayama T. and Chicester C.O. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, Bauerfeind E. Ed., Academic Press, New York, 463-538, 1981.
3. Peto R.I., Doll R., Buckley J. and Sporn M. *Nature (London)*, **290**, 201, 1978.
4. Ziegler R., Subar A., Craft N., Ursin G., Patterson B. and Graubard B. *Cancer Research (Suppl.)*, **52**, 2060s, 1992.
5. Krinsky N.I. *J. Nutr.*, **119**, 123, 1989.
6. Carvalho P.R.N., Collins C., and Rodriguez-Amaya D. *Chromatographia*, **33**, 133, 1992.
7. Braumann T. and Grimme L.H. *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 8, 1981.
8. Microsoft Inc. MICROSTAT, USA, 1985.
9. Snyder L.R. and Kirkland J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1978.
10. Johnson E. and Stevenson R. *Basic Liquid Chromatography*. Varian Aerograph, USA, 1978.
11. Craft N. and Wise A.S. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 208, 1993.
12. Craft N. *Methods in Enzymology*, Vol. 213, 185. Academic Press Inc., 1992.
13. Epler K.S., Sander L., Ziegler R., Wise S. and Craft N. *J. Chromatogr.*, **595**, 89, 1992.
14. Schoemakers P. *Journal of Chromatography Library*, **35**, 62, Elsevier, Amsterdam, 1986.