



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**¿ES POSIBLE DETECTAR Y CUANTIFICAR LAS
VITAMINAS HIDROSOLUBLES (B1, B6, B9, B12,
VITAMINA C) EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POR
MÉTODOS CROMATROGRÁFICOS?**

Autor: Carmen Díaz Enríquez
Tutor: Ana Isabel Olives Barba
Convocatoria: Febrero 2020

Índice

Resumen	3
Abreviaturas	3
1. Introducción.....	4
2. Objetivos	8
3. Material y métodos.....	8
4. Resultados y discusión	8
4.1 Pretratamiento de la muestra	9
4.2 Métodos cromatográficos.....	10
4.4 Ejemplos de determinación de vitaminas hidrosoluble.....	11
4.5 Estudio en el Hospital del Uniklinikum de Freiburg (Alemania).....	15
5. Conclusiones.....	18
Bibliografía.....	18

Resumen

La memoria del presente TFG refleja la importancia que tienen las vitaminas hidrosolubles, en concreto tiamina, piridoxal, ácido fólico, cianocobalamina y ácido ascórbico, para el buen funcionamiento del cerebro, a la vez que recoge un resumen de las metodologías analíticas que se emplean para su detección en muestras de plasma utilizando técnicas cromatográficas. Dichas muestras reciben un pretratamiento para aislar los analitos y posteriormente pueden ser analizadas por HPLC acoplado a espectrometría de masas o detección absorciométrica UV-Vis. En este trabajo se muestran algunos estudios que analizan muestras biológicas para la detección de tiamina, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico y ácido ascórbico, así como presentar unos ensayos preliminares para el análisis cualitativo de estas vitaminas desarrollados durante mi estancia Erasmus en el Hospital de Freiburg con la finalidad de obtener varios métodos para la determinación analítica de estas vitaminas de manera rápida, sencilla y robusta.

Palabras clave: vitaminas del grupo B, vitamina C, HPLC, espectrometría de masas, espectrometría de absorción UV-Vis.

Abstract

This report highlights the importance of water-soluble vitamins for a good functioning brain. Specifically: thiamine, pyridoxal, folic acid, cyanocobalamin and ascorbic acid. Doing so, I collected a summary of analytical methodologies used in its detection in plasma samples using chromatographic techniques. Said samples are pretreated to isolate the analytes and can subsequently be analyzed by HPLC coupled to mass spectrometry or UV-Vis absorptometric detection. This paper shows some studies that analyze biological samples for the detection of thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin, folic acid and ascorbic acid, as well as presenting preliminary tests for the qualitative analysis of these vitamins developed during my Erasmus stay at Freiburg Hospital in order to obtain several methods for the analytical determination of these vitamins quickly, easily and robustly.

Key words: complex B vitamins, vitamin C, HPLC, mass spectrometry, UV-Vis absorption spectrometry.

Abreviaturas

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficacia
t _R	Tiempo de retención
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
MS	Espectrometría de masas
IS	Patrón interno
LLE	Extracción líquido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
GABA	Ácido γ -aminobutírico
PLP	Piridoxal fosfato
TFA	Ácido trifluoroacético

1. Introducción

Las vitaminas son sustancias orgánicas complejas, biológicamente activas y de estructura diferente. Las vitaminas forman parte de los micronutrientes junto con los minerales, y son fundamentales para el buen funcionamiento del cuerpo humano.

La mayoría de las vitaminas no son sintetizadas por el organismo, y si lo hacen, las cantidades son insuficientes; por tanto, debemos ingerirlas de manera consciente. Algunas de ellas pueden formarse en cantidades variables en el organismo, la vitamina D y niacina se sintetizan endógenamente (la primera se forma en la piel por exposición al sol y la niacina puede obtenerse a partir del triptófano) y las vitaminas B1, B2 y biotina son sintetizadas por bacterias intestinales). Sin embargo, generalmente esta síntesis no es suficiente para cubrir las necesidades, por lo que tienen que ser aportadas por la dieta.

Según la FAO, se agrupan en forma conjunta debido, como lo implica su nombre, a que son factores vitales en la dieta y porque todas se descubrieron en relación con las enfermedades que causan su carencia.

“Vita” significa vida de ahí su gran importancia en el mantenimiento de la salud que queda demostrada por la aparición de las enfermedades deficitarias que provoca su falta en la dieta.

Las vitaminas, aportadas por los alimentos en diferentes formas, son absorbidas principalmente en el intestino delgado mediante mecanismos de difusión pasiva, difusión facilitada o transporte activo.

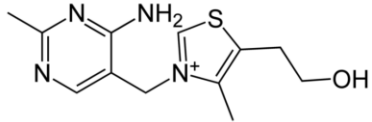
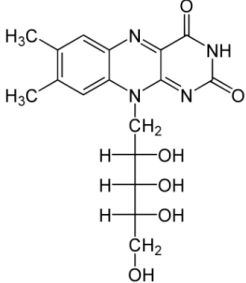
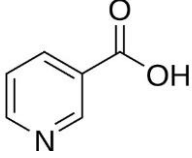
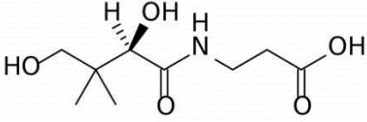
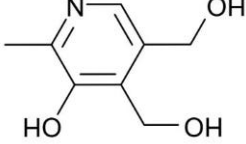
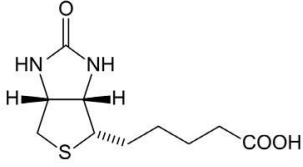
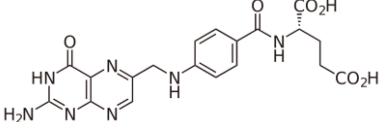
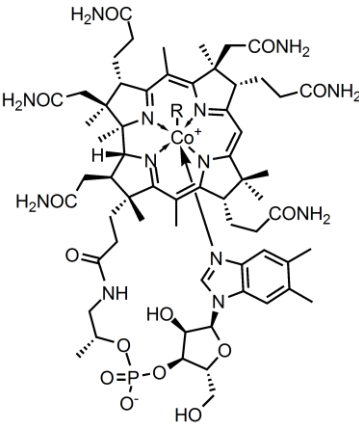
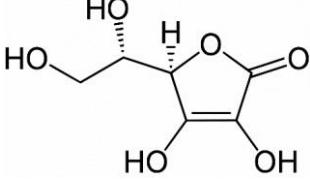
Vitaminas hidrosolubles (tabla 1) son la vitamina B1 (Tiamina), vitamina B2 (Riboflavina), vitamina B3 (Niacina), vitamina B5 (Ácido pantoténico), vitamina B6 (Piridoxal), vitamina B7 (Biotina), vitamina B9 (Ácido fólico), vitamina B12 (Cianocobalamina) y vitamina C (Ácido ascórbico). Este grupo de vitaminas son solubles en agua como indica su nombre, y por tanto tienen la característica de perder pronto su valor nutritivo, ya que se degradan en los procesos de cocción o por acción de la luz solar, y como consecuencia el organismo necesita estas vitaminas hidrosolubles en dosis pequeñas y frecuentes. Sin embargo, la niacina, el piridoxal, el folato, y el ácido ascórbico tienen límites máximos de consumo. Una alimentación equilibrada nos proporciona una cantidad suficiente de dichas vitaminas.

La **vitamina B1 (tiamina)** cumple una importante labor en la conducción de los impulsos nerviosos y en el metabolismo del oxígeno, tiene efectos contra el deterioro de la memoria, previene el envejecimiento del cerebro y resulta efectiva para elevar el ánimo de las personas que sufren depresión, pues está presente en grandes cantidades en el cerebro y todos los tejidos nerviosos. Además, actúa como coenzima para escisión de enlace carbono-carbono, así como en el metabolismo de aminoácidos e hidratos de carbono. Participa en el proceso de absorción de glucosa y por eso mismo resulta ideal para mantener la energía en el cuerpo. En los países desarrollados, existen trastornos debido a su deficiencia como son el alcoholismo crónico, ya que en este caso está aumentada la excreción urinaria de esta vitamina, y el tabaquismo, ya que se produce una reducción en la capacidad de asimilación de esta vitamina. Esta vitamina se puede encontrar en carne de cerdo, cereales, legumbres y frutos secos.

La **vitamina B2 (riboflavina)** es clave en la transformación de los alimentos en energía, ya que favorece la absorción de las proteínas, las grasas y los carbohidratos. Participa como cofactor de reacciones de oxidación y reducción y unido en forma covalente a grupos prostéticos. Las enzimas que contienen dinucleótido de flavina y adenina (FAD, flavin adenine dinucleotide) o mononucleótido de flavina (FMN, flavin mononucleotide) como grupos prostéticos se conocen como flavoenzimas (p. ej., ácido succínico deshidrogenasa, monoaminoxidasa, glutatión reductasa). FAD es un cofactor para la metiltetrahidrofolato reductasa y, por tanto, modula el metabolismo de la homocisteína. La deficiencia de riboflavina

se manifiesta por lesiones en las superficies mucocutáneas de la boca y la piel. Además de dichas manifestaciones, se han descrito vascularización corneal, anemia y cambios de la personalidad en los casos de carencia de riboflavina. Se encuentra en mayor proporción en verduras de hoja verde, lácteos y cereales integrales.

Tabla 1: Estructura química de las vitaminas hidrosolubles

B1	B2	B3
		
B5	B6	B7
		
B9	B12	C
		

La **vitamina B3 (niacina)** tiene un papel esencial en el metabolismo energético de la célula y de la reparación de ADN. Se refiere al ácido nicotínico y a la nicotinamida y sus derivados biológicamente activos. El ácido nicotínico y la nicotinamida sirven como precursores de dos coenzimas, el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD, nicotinamide adenine dinucleotide) y fosfato de NAD (NADP, nicotinamide adenine dinucleotide), los cuales son importantes en numerosas reacciones de oxidación y reducción en el organismo. Además, NAD y NADP son activos en las reacciones de transferencia de difosfato de adenina-ribosa involucradas en la reparación del DNA y movilización de calcio. Participa como coenzima en

reacciones de oxidación y reducción. La deficiencia de niacina produce pelagra, que se observa sobre todo en personas que consumen una alimentación a base de maíz en zonas de China, la India y África en general. Pelagra se da frecuentemente en personas alcohólicas crónicas; en sujetos con defectos congénitos de la absorción intestinal y renal de triptófano y en pacientes con síndrome carcinoide, en el cual hay un aumento de la conversión de triptófano en serotonina. Se encuentra en leche, huevos, carne, pescado, pollo, cereales, frutos secos y legumbres.

La **vitamina B5 (ácido pantoténico)** ayuda a metabolizar los carbohidratos, las proteínas y las grasas, además es necesario para formar la coenzima A (CoA). Se encuentra en vísceras, aguacate, setas, brécol y cereales integrales.

La **vitamina B6 (piridoxal)** favorece la formación de neurotransmisores como la dopamina, epinefrina, norepinefrina, GABA y acetilcolina. La dopamina se asocia con los circuitos de recompensa. Tiene grandes efectos sobre el estado de ánimo. La adrenalina y noradrenalina están relacionadas con los sistemas de alerta e interviene en los estados de ansiedad. El GABA regula los estados de inquietud y permite reducir la angustia y el estrés. La acetilcolina interviene en los procesos de memoria. Además, la vitamina B6 ayuda en la absorción de la B12, que es una de las vitaminas decisivas para el desarrollo cognitivo. Además, participa como cofactor para enzimas del metabolismo de aminoácidos. La deficiencia de vitamina B6 facilita la aparición de problemas como obsesiones o depresión. También incide en el desequilibrio emocional en general y en las dificultades para dormir. La deficiencia grave de esta vitamina provoca neuropatía periférica, resultados anormales en el electroencefalograma y cambios de personalidad que inducen depresión y confusión. En los lactantes es posible observar diarrea, convulsiones y anemia. La anemia microcítica hipocrómica es provocada por la disminución de la síntesis de hemoglobina dado que la primera enzima involucrada en la biosíntesis de hemo (la aminolevulinato sintasa) necesita PLP como cofactor. Se encuentra en carne, pescado, pollo, legumbres, frutas, cereales integrales y en vegetales de hoja verde.

La **vitamina B7 (biotina)** ayuda a descomponer las proteínas, los carbohidratos y ácidos grasos, por ello juega un papel importante en el crecimiento celular. De hecho, durante el embarazo es fundamental aportar la cantidad adecuada de esta vitamina para asegurar el crecimiento y desarrollo correcto del embrión. Por otro lado, también destaca por ser necesaria para mantener la salud del cabello, las uñas y la piel. Al igual que el ácido pantoténico se encuentra en vísceras, yema de huevo, soja, pescado y cereales integrales.

La **vitamina B9 (ácido fólico)** junto con la B6 y la B12, favorecen la formación de glóbulos rojos. Esto contribuye a que el transporte del oxígeno sea más rápido y facilita, por tanto, en el buen funcionamiento del cerebro. Cumple un importante papel en la agudeza mental y en la preservación de las funciones cerebrales. Como la vitamina B6, interviene en la formación de varios neurotransmisores. Además, actúa como coenzima en la transferencia de un carbono en el ácido nucleico y metabolismo de aminoácidos. La deficiencia de vitamina B9 aumenta la posibilidad de padecer accidentes cerebrovasculares. Se puede encontrar en verduras de hoja verde, legumbres y en hígado.

La **vitamina B12 (cianocobalamina)** contribuye en la formación de las células y de los ácidos grasos. Actúa como coenzima para la metionina sintasa y L-Metilmalonil CoA mutasa. Su acción está muy relacionada con la memoria a corto plazo y con la velocidad del pensamiento. Por ello, la deficiencia de la vitamina B12 lleva a pérdidas de memoria, lentitud mental y cambios de humor en sentido negativo. Muchos investigadores asocian la carencia de vitamina B12 con enfermedades como el Alzheimer. Se encuentra en alimentos de origen animal, como huevos, carne, pescado, pollo o lácteos.

La **vitamina C** es un poderoso antioxidante. Participa en muchas reacciones biológicas de oxidación y transferencia de oxígeno. Su acción protege al cerebro del estrés oxidativo y de

los procesos degenerativos que tienen lugar con la edad. Su papel es decisivo para evitar la aparición de enfermedades tipo Parkinson, Alzheimer y otras formas de demencia. Así mismo, contribuye en el proceso de absorción del hierro, este es decisivo en funciones como la memoria y la atención. La vitamina C también es considerada un antidepresivo natural. Tiene la capacidad para incrementar los niveles de serotonina, un neurotransmisor mayoritario en el buen estado de ánimo. Por tanto, actúa en la promoción de absorción de hierro no hemo, biosíntesis de carnitina, conversión de dopamina en noradrenalina y síntesis de muchas hormonas peptídicas en el metabolismo y entrecruzamiento del tejido conjuntivo (hidroxilación de la prolina). La deficiencia también puede provocar la enfermedad del escorbuto. Se encuentra esencialmente en los cítricos, en kiwi, pimientos, legumbres, tomates.^{1 2 3 4 5}

Existen técnicas generales de pretratamiento como extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), etc., mientras que los métodos de determinación incluyen métodos de cromatografía, métodos electroforéticos y otros. En este trabajo se presenta una revisión de las más utilizadas en apartados posteriores.

El método más utilizado para el análisis de vitaminas hidrosolubles y sobre el que me centraré es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Por ello quiero explicar brevemente en qué consiste esta técnica, es una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad, gracias a su gran selectividad, resolución y eficacia, a su capacidad de determinaciones cuantitativas exactas y de separación de especies termolábiles o no volátiles. Esta es una técnica separativa basada en la afinidad que los compuestos a separar tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, líquida, que fluye sobre otra estacionaria, empaquetada en una columna. La separación es una consecuencia de la diferencia de coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, que produce sucesivas etapas de retención y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria.

La clasificación de las diferentes modalidades de cromatografía de líquidos (LC) se centra en la composición química de la fase estacionaria. Según la química de la fase estacionaria se producen diferentes mecanismos de separación. Existe la cromatografía en fase normal en la que la FM es apolar y la FE es polar, siendo la sílice modificada químicamente con grupos funcionales que le confieren la polaridad a la misma, pero la más empleada en fase inversa, en la que la FM es polar y la FE es apolar, siendo la sílice modificada químicamente con grupos funcionales que le confieren la apolaridad. El desarrollo en fase inversa se ajusta adecuadamente al análisis de analitos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos. Como fase móvil se utilizan disolventes con cierta polaridad, generalmente mezclas de agua con disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. En la se indican la naturaleza de distintas fases estacionarias usadas en HPLC función del desarrollo elegido.

Tabla 2: Naturaleza química de posibles fases estacionarias usadas en HPLC

MECANISMO	-R	NOMBRE COMERCIAL
Fase normal	Sílice	Nucleosil, Kromasil
Fase inversa	-ciano	Nucleosil-ciano, Micropak-ciano
Fase inversa	-amino	Nucleosil-amino, Lichrosorb-ciano
Fase inversa	-C18	Nucleosil-C18, Lichrosorb RP18
Fase inversa	-C8	Nucleosil-C8, Lichrosorb RP8
Fase inversa	-fenilo	microBondpak-fenil

Para conseguir optimizar la separación de una mezcla se puede emplear: una separación isocrática (composición de la fase móvil constante a lo largo de la separación), y en gradiente (la composición de la fase móvil varía a lo largo de la separación).

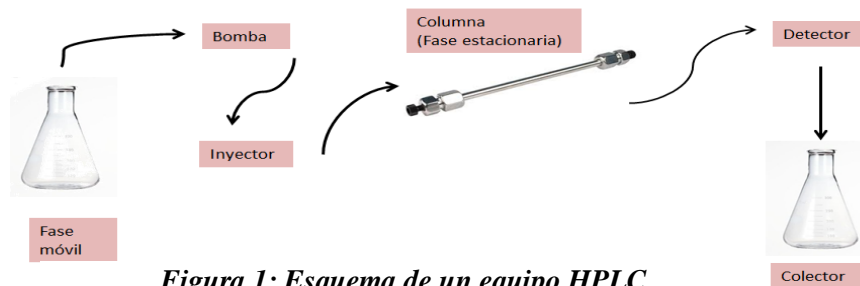


Figura 1: Esquema de un equipo HPLC

En este trabajo se describen las vitaminas B1, B6, B9, B12 y vitamina C, ¿por qué? Pues como se describe anteriormente, estas vitaminas están estrechamente relacionadas con la funcionalidad del cerebro, lo que supone que su déficit se relaciona con enfermedades degenerativas, así como neurológicas.

Durante los últimos años, ha habido un interés creciente por la determinación simultánea de vitaminas. Por lo tanto, se han desarrollado nuevos métodos analíticos. Sin embargo, varios estudios recientes se han centrado en la validación de metodologías analíticas para el análisis de multivitaminas, pero la gran mayoría de ellos aplicaron sus métodos al análisis en matrices de alimentos, bebidas y suplementos vitamínicos. Pero solo un número relativamente pequeño de estudios experimentales se centró en la validación de metodologías analíticas para el análisis de multivitaminas en muestras biológicas (sangre y orina) y con resultados limitados en términos de pretratamiento largo y tedioso de las muestras y robustez y reproducibilidad del método.

Por todo ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de varios estudios sobre distintos grupos de población, y se intenta demostrar que esos métodos son válidos para el diagnóstico de enfermedades causadas por el déficit de dichas vitaminas y que afectan mayoritariamente a la funcionalidad del cerebro.

2. Objetivos

1. Revisión bibliográfica de estudios realizados sobre muestras biológicas para la determinación de vitaminas hidrosolubles.
2. Análisis cromatográfico de vitaminas hidrosolubles en plasma.

3. Material y métodos

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los métodos analíticos utilizados para la determinación de vitaminas hidrosolubles existiendo diversas modificaciones para cada uno.

Se han consultado artículos recogidos en bases de datos como PubMed, Google Scholar, ScienceDirect, SciELO, Google Patents, Tesis Doctorales en Red y en distintas páginas webs como FAO.

Palabras clave utilizadas en la búsqueda: vitaminas del grupo B, vitamina C, HPLC, espectrometría de masas, espectrometría de absorción UV-Vis.

4. Resultados y discusión

A continuación, se explica de manera más detallada el procedimiento general que se emplea para tratar las muestras de plasma. Iniciamos el pretratamiento con tres posibles procesos como son precipitación, centrifugación y filtración, o bien empleando la extracción en fase sólida. Así se prepara la muestra problema para inyectarla en el HPLC en el cual hay

distintas posibles variantes con sus fases móvil y estacionaria, y posterior detección mediante espectrometría de masa, absorción UV-Vis o fluorescencia, esta última menos usada.

4.1 Pretratamiento de la muestra

La extracción y purificación de muestras es de vital importancia. En los procesos de pretratamiento de vitaminas, se pueden separar y preconcentrar diferentes sustancias que pueden mejorar significativamente el rendimiento analítico (por ejemplo, selectividad, sensibilidad, precisión). En el pasado, la extracción y el calentamiento a reflujo han sido los métodos más utilizados; ambos métodos tienen limitaciones debido a los altos tiempos y disolventes orgánicos que se necesitan. Con el desarrollo de las técnicas de análisis, han surgido muchas tecnologías ecológicas y efectivas de preparación de muestras que se han vuelto más y más populares.

Primero, los métodos de pretratamiento aplicados dependen del tipo de matriz en el que se encuentra el analito. El tipo de muestra puede ser sólida o líquida, por ejemplo, para la mayoría de las muestras sólidas, se adoptó la homogeneización, el secado y el cribado a través de un tamiz, mientras que, para el suero, las muestras se pueden procesar solo con desproteínización. Aquí una explicación de las técnicas más utilizadas: ⁶

Precipitación de proteínas, centrifugación y filtración

Las herramientas de detección modernas son relativamente simples y solo necesitan unos pocos pasos para purificarse. La metodología que utiliza una técnica de "diluir y disparar" está ganando popularidad y ahora se usa con frecuencia.

Se utilizaron diferentes diluyentes con diferentes objetivos, el tampón fosfato es el más utilizado. El tampón puede reducir la fluctuación del pH de manera efectiva y reducir el efecto del pH en el tiempo de retención. También tenemos ejemplos como:

- Gershkovich y colaboradores describió un método de precipitación de proteínas para plasma-plasma centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5 ° C seguido de la adición de acetonitrilo helado. Después de filtrar usando filtros PVDF de 0,22 mm, el sobrenadante se transfirió a viales para el inyector automático y se midió directamente por HPLC. ⁷
- Brian, Petterys, y Frank describieron un método de precipitación de proteínas para plasma que se había centrifugado después de la adición de TCA usando un sistema de filtración acoplado a placas de 96 pocillos. ⁸

Teniendo en cuenta que los reactivos de precipitación no son directamente compatibles con el equipo cromatográfico, se realizan estudios con distintos reactivos de precipitación de proteínas. Aún así, los reactivos más utilizados incluyen metanol, acetonitrilo y una mezcla de agua desionizada con diferentes concentraciones de ácidos.

Extracción en fase sólida (SPE)

Se propuso un método de cromatografía líquida para medir el complejo de vitaminas y C usando los métodos de pretratamiento SPE (Sep-Pak C18) de Rudenko y Kartsova. El cartucho se acondicionó previamente con metanol (5 mL) y agua destilada (5mL). Luego, se pasaron 3 mL de la disolución extraída a través de la columna. Y después, el adsorbente se lavó con 1 mL de agua destilada. Las vitaminas se eluyeron con 3 mL de metanol. El eluato obtenido se analizó después de varios tratamientos. Las recuperaciones y los límites de detección fueron satisfactorios. ⁹

La extracción en fase sólida puede preparar múltiples muestras simultáneamente; por lo tanto, el tiempo total requerido no es tan largo, al realizar varias muestras a la vez. Además, se puede conectar on-line con LC.¹⁰



Figura 2: Etapas de extracción en fase sólida

Otra modalidad de SPE emplea cartuchos LiChrospher-RP-18-ADS, que combina fase inversa y exclusión por tamaño, que conectado on-line al HPLC permite el análisis de muestras de sangre, directamente en el HPLC. Esta consiste en pasar la muestra desde el vial por una columna previa que separa las proteínas del resto de sustancia que existen en la muestra de sangre. Pero no siempre dicha separación es correcta, a veces se pierden sustancia deseadas.

4.2 Métodos cromatográficos

El HPLC se ha convertido en el método más común para la determinación de vitaminas, en concreto el RP-HPLC debido a su alta selectividad. Considerando el rápido desarrollo de los detectores HPLC y MS, esta técnica *tándem* jugará un papel aún mayor.

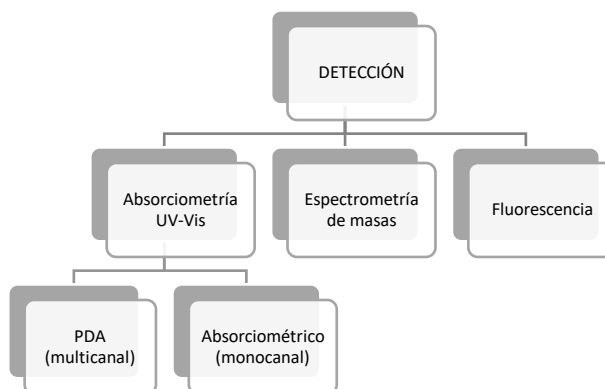


Figura 3: Detectores para HPLC

El detector de absorción UV-Vis, es decir, HPLC-UV-Vis, se utiliza también para la determinación de estas vitaminas, pero no da resultados tan satisfactorios, pues algunas de las vitaminas a las que nos referimos en este trabajo aparecen a un tiempo de retención muy parecido o incluso idéntico, como pasa con la riboflavina y la cianocobalamina, por lo que su detección a 290 nm sería errónea. Los espectros UV de las vitaminas varían significativamente debido a sus múltiples estructuras y por lo tanto se requiere detección de longitud de onda múltiple para lograr la mejor sensibilidad. Por lo general, el máximo la absorbancia es la mejor opción, pero la longitud de onda seleccionado puede ser diferente porque a ciertas longitudes de onda las impurezas pueden interferir con la detección de analitos. Por ejemplo, las impurezas pueden interferir con la detección de vitamina B6 a 210 nm y aunque tiene más absorción a 210 nm, vitamina B6 se detecta mejor a 280 nm donde las interferencias son eliminadas. Por lo tanto, detección en otras longitudes de onda puede colocar su concentración en un rango de calibración lineal.¹¹

La utilización de detectores de fluorescencia en la mayoría de los casos no es posible tampoco, ya que no todas las vitaminas presentan fluorescencia intrínseca. Para poder medir la fluorescencia de las vitaminas no fluorescentes se requieren procesos de derivatización, ya

seanpre- o post-columna, como por ejemplo para la determinación de tiamina, que ha de oxidarse a tiocromo, para obtener un compuesto fluorescente.

Por estos motivos se utiliza como técnica de detección la espectrometría de masas. Entre estos métodos, HPLC-MS / MS, que puede considerarse como un método confirmatorio, se ha convertido en la principal técnica analítica utilizada para la identificación de vitaminas debido a su mayor selectividad y sensibilidad que otros métodos instrumentales. Al ser un método confirmatorio, la detección por MS se usa para identificar y cuantificar una sustancia y puede usarse para confirmar la estructura molecular de un compuesto. El principio básico de esta técnica es la medición de las relaciones de masa a carga (m/z) de las moléculas ionizadas. HPLC-MS / MS a menudo se aplica usando un analizador de triple cuádrupolo y un modo de monitoreo de reacción seleccionado. Este modo permite la confirmación de la composición de los compuestos y proporciona información estructural. En cuanto al solapamiento no presenta ningún tipo de problema, porque en espectrometría de masas, cada pico corresponde a una relación m/z determinada, y aislando dicha masa del resto del cromatograma observamos que el solapamiento no interfiere ni modifica las áreas de unos con otros.¹²

4.4 Ejemplos de determinación de vitaminas hidrosoluble

- ESTUDIO I

Este estudio tiene como objetivo determinar el contenido de vitaminas hidrosolubles en veinte deportistas aficionados varones adultos de entre 20 y 43 años. Se analizaron las siguientes vitaminas: B1, B2, B3, PP, B5, B6, B7, B9, B12 y vitamina C.

Para aislar las vitaminas, se utilizaron tubos Eppendorf. El espacio para el aislamiento de vitaminas se oscureció para evitar la fotooxidación de vitaminas. Para los análisis, se recogieron 400 μ L de plasma y luego se añadió la misma cantidad de acetonitrilo, así como 100 μ L de patrón interno (teobromina a una concentración de 100 ng/-mL). Todos estos reactivos se mezclaron completamente durante 2 minutos y luego se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se recogió en tubos nuevos para evaporar el acetonitrilo. Y posteriormente se transportó a columnas de extracción en fase sólida (SPE) que contenían cartucho de sílice C-18, activado previamente con 1 mL de metanol y 1 mL de agua ultrapura. Los compuestos en las columnas se eluyeron usando metanol al 85% con 1,5 mL de agua. La disolución obtenida se secó al vacío y se disolvió en 100 μ L de tampón fosfato para proceder a su análisis por HPLC-UV-vis con elución en gradiente (Tabla 3).^{13 14}

Tabla 3: Gradiente de concentración de la fase móvil (A disolución tampón fosfato; B metanol)

TIEMPO (min)	BUFFER A (%)	BUFFER B (%)
0,0	97	3
2,5	97	3
7,2	70	30
14,0	70	30
16,0	97	3

La separación de vitaminas se realizó en una columna Hypersil C –18, a 35°C, un caudal de 0,9 mL / min y el volumen de inyección fue de 10 μ L¹⁵. Se identificó cada vitamina en las muestras analizadas comparando con los t_R de las vitaminas patrón a 266 nm.¹⁶

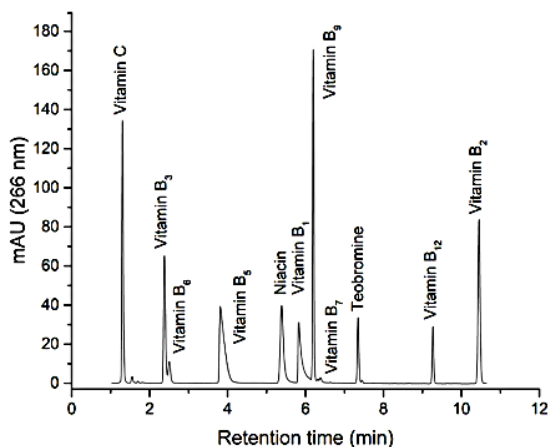


Figura 4: Cromatograma de la separación de vitaminas hidrosolubles en plasma humano. FE Reprisil- C18, FM HK_2PO_4 ; metanol 97:3, caudal 0,9 mL/min, $T = 35^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$, detección a $\lambda = 266\text{ nm}$.

• ESTUDIO II

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar una nueva metodología de HPLC para detección y cuantificación rápida de siete vitaminas hidrosolubles (B1, B2, B5, B6, B9, B12, C) en fluidos biológicos (plasma y orina). El método validado se aplicó para cuantificar las vitaminas hidrosolubles en muestras de plasma y orina obtenidas de 24 varones alcohólicos en periodo de abstinencia.

Las vitaminas hidrosolubles utilizadas en este estudio (B1, B2, B3, B5, B6 como fosfato de piridoxal [5'-PLP], B9, B12 y C) y el patrón interno (teobromina). Se emplearon metanol, así como ácido trifluoroacético (TFA) y agua ultra pura de grado HPLC en todo el protocolo. Además de emplear disoluciones estándares de cada vitamina.

Se utiliza para el análisis y cuantificación de vitaminas en muestras biológicas un cromatógrafo Agilent 1100 controlado por el ChemStation. Las vitaminas se separaron en una columna de fase inversa C18-A, junto con una precolumna usando como fase móvil 0,01% de TFA en agua ($\text{pH} 2,9$, Disolvente A) y 100% de metanol (Disolvente B), en elución isocrática y gradiente lineal combinada. El perfil de gradiente lineal (A: B) comenzó a 95: 5 y permaneció constante durante los primeros 4 min, luego linealmente hasta 2: 98 durante los siguientes 6 min, luego fue constante en los siguientes 20 min y finalmente aumentó linealmente a 95: 5 en los últimos 5 min de separación. El tiempo total de análisis fue de 35 min. El caudal se ajustó a 0,2 mL/ min. El volumen de inyección fue de 3 μ L. La separación se llevó a cabo a 30 ° C. Se empleó un detector de fotodiodos en serie que controlaba la absorbancia de la fase móvil a 280 nm; mientras que la cuantificación de cada vitamina se realizó a 230 nm para ácido ascórbico, 270 nm para tiamina, 257 nm para piridoxina, 280 nm para ácido fólico y 230 nm para cianocobalamina. La identificación de los picos resueltos en muestras reales se realizó comparando sus espectros y t_R con los derivados de disoluciones acuosas estándar.

Las disoluciones acuosas de referencia de vitaminas hidrosolubles se prepararon semanalmente pesando 100 mg de cada vitamina con agua ultrapura que contiene 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA). La concentración final de cada vitamina fue de 100 ng/ μ L (excepto la vitamina B2 que fue de 50 ng/ μ L). La disolución de vitamina B9 preparada pesando 5 mg de vitamina B9 en polvo y disuelta en 100 mL de NaHCO_3 1 M. Todas las disoluciones

se almacenaron en nevera en frascos topacio para evitar la fotodegradación de las vitaminas. La concentración final de los estándares de las vitaminas varió de 0,25 a 25 ng/μL (seis niveles de concentración). La teobromina (patrón interno) se usó a una concentración de 2 ng/μL.

Se realizó el pretratamiento mediante tres procedimientos diferentes para comprobar cuál era más ventajoso: 1º) desproteínización con 200 μL de acetonitrilo seguido de; 2º) extracción líquido-líquido (600 μL n-hexano + 150 μL etanol: metanol, 95: 5, v/v) y 3º) desproteínización con 600 μL de etanol: metanol, 95: 5, seguido de PSE. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 1: Resultados del método de preparación de muestras optimizado para vitaminas enriquecidas en muestras de plasma sintético procesadas utilizando cada uno de los tres métodos de pretratamiento mencionados.

VITAMINAS (nm)	AREA DE PICO	% DESVIACION TÍPICA RELATIVA
200μL acetonitrilo + extracción en fase solida		
C (230)	150,92	2,6
B1 (270)	62,60	1,7
B2 (265)	366,16	10,3
B5 (266)	27,14	0,4
B6 (257)	110,28	2,4
B9 (280)	69,13	2,0
B12 (230)	179,13	5,2
L/L extracción fase acuosa		
C (230)	197,91	4,7
B1 (270)	64,10	2,9
B2 (265)	216,31	6,0
B5 (266)	14,83	0,2
B6 (257)	145,07	9,4
B9 (280)	112,93	0,9
B12 (230)	132,36	2,6
600μL etanol: metanol (95:5) + extracción en fase sólida		
C (230)	169,14	2,8
B1 (270)	87,75	2,3
B2 (265)	302,29	1,9
B5 (266)	45,52	0,7
B6 (257)	60,97	1,0
B9 (280)	285,33	5,4
B12 (230)	111,74	1,0

Los resultados indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tres métodos de pretratamiento. La LLE obtuvo mejores resultados en el caso de 5'-PLP. En la Figura 3 se observa, que los picos están bien resueltos y son simétricos. Al comparar el cromatograma estándar con los cromatogramas obtenidos a partir de plasma, no hay interferencia importante en cuanto a los espectros UV. Se observaron dos picos no identificados en un cromatograma de muestra enriquecida; sin embargo, no interfirieron con las vitaminas¹⁷.

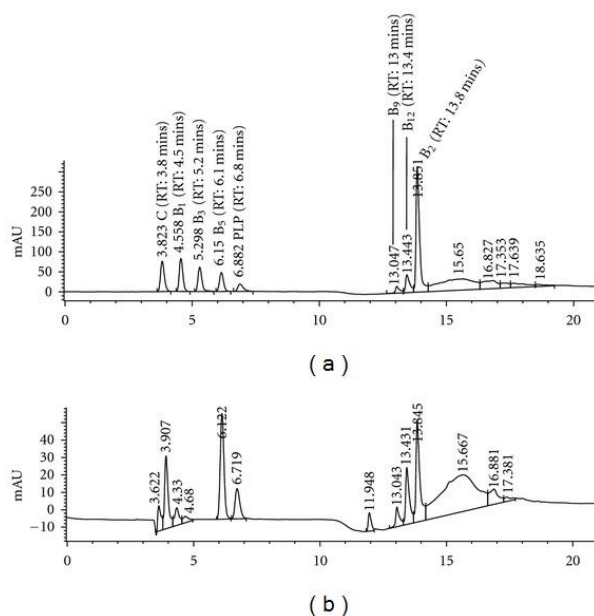


Figura 5: Cromatogramas representativos de disolución estándar (a) y muestras de plasma (b). FE Reprisil- C18, FM TFA 0,01%: metanol 100% (isocrático) 95:5, 2:98, 95:5, caudal 0,2 mL/min, $T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2,3$, detección a $\lambda = 280 \text{ nm}$.

• ESTUDIO III

Este estudio desarrolla un método para caracterizar compuestos que se encuentran en bajas concentraciones en plasma, especialmente para vitaminas B6 y B12, lo que hace que los métodos con buena sensibilidad sean un requisito previo muy importante.

Este estudio se centra en el análisis simultáneo de vitaminas B6, B9, B12 y homocisteína, en concreto debido a la coexistencia inherente de deficiencias de vitaminas en muchas condiciones patológicas.

Todos los disolventes se filtraron al vacío antes de su uso con un filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) (0,22 μm) y se prepararon diariamente.

Se realizó UHPLC, con una FM MeOH: sal de sodio heptanesulfónico (0,05 mM) con 0,05% de TEA(trietilamina) añadido como modificador orgánico, 33:67, pH 2,3. El caudal fue de 0,5 mL/min. Se midió la absorbancia usando un detector de fotodiodos en serie entre 190 y 400 nm, obteniendo una buena resolución para la detección simultánea de dichas vitaminas utilizando ácido clorogénico como el patrón interno detectado a 210 nm.

Comparando los tiempos de retención, las alturas máximas y las áreas producidas por diferentes pH, se seleccionó el pH 2,8 como el pH más adecuado para la determinación simultánea de las tres vitaminas. Sin embargo, cuando se inyectó homocisteína a este pH, se eluyó conjuntamente con vitamina B6. Por lo tanto, el pH se redujo a 2,3, lo que resultó en la separación de los cuatro compuestos con buenas resoluciones, formas de pico y áreas.

Como se observa en la Figura 4 aparece primero la vitamina B6, luego B12 y luego la B9 debido a su polaridad e interacción con la columna.¹⁸

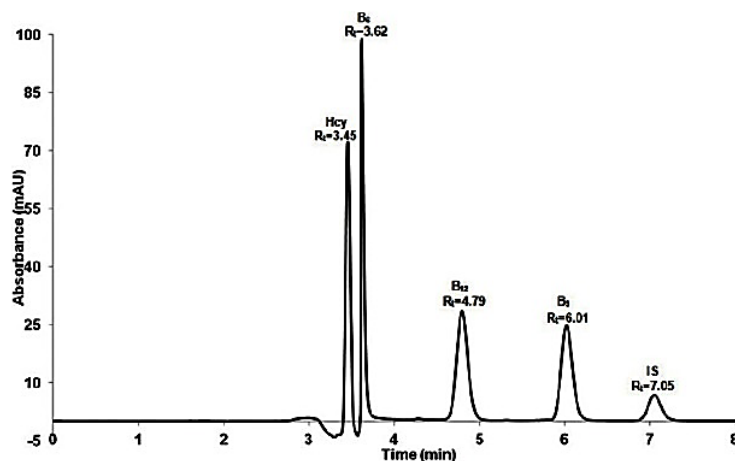


Figura 6: Cromatograma obtenido en las condiciones experimentales: FE Reprisil- C18, FM metanol: ac.1-heptanosulfónico (33:67) con trietilamina 0,05%, caudal 0,5 mL/min, T = 28 °C, pH=2,3, detección a $\lambda= 280 \text{ nm}$.

4.5 Estudio en el Hospital del Uniklinikum de Freiburg (Alemania)

Durante la realización de mis prácticas tuteladas de hospital en el Uniklinikum de Freiburg, Alemania, me dieron la posibilidad de poder realizar un “pequeño” ensayo para el TFG en el que estoy trabajando.

Para llevar a cabo este ensayo he utilizado muestras de sangre de dos pacientes que padecen la enfermedad de fibrosis quística y otros dos pacientes que son tratados con morfina debido a los dolores que tienen, de ahí que algunos resultados obtenidos no sean los deseados, además algunas de las vitaminas con las que he trabajado son bastante inestables y es difícil detectarlas por sus bajos niveles séricos.

El ensayo es de carácter cualitativo, en el que se comparó las muestras de con una disolución de referencia para ver si en el suero de los pacientes se detectan las vitaminas que buscamos. En los pacientes tratados con morfina, se buscó la presencia de las vitaminas B1, B6, B12, y, en los pacientes de fibrosis quística, las B9 y C.

Las muestras de plasma se diluyen con metanol en proporción 1:6, posteriormente depositadas en un tubo Eppendorf, se centrifugaron durante 15 min, el sobrenadante se depositó en viales para HPLC. Los materiales de referencia puros de cada vitamina, los he obtenido del propio hospital. Cada material se presenta en distinto estado: líquido mediante ampollas, sólido en comprimido, en cápsula o en polvo, incluso algunas requerían posterior filtración para llevar finalmente a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, concentración adecuada para obtener un pico detectable en el espectrómetro de masas.

Tras la preparación de la muestra por el procedimiento correspondiente, los viales fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia/espectrometría de masas (HPLC-MS). La ionización de los analitos se realizó en modo de ion positivo (PI). La identificación y confirmación de los compuestos de interés se basó en las medidas de masa/carga (m/z) de los iones seleccionados para cada compuesto, generalmente la molécula protonada y un fragmento de gran intensidad. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 en fase inversa. Respecto a la fase móvil, se trabajó en modo de gradiente de elución, empleando metanol y tampón de formiato de amonio (pH 5) durante 30 min.

Para este experimento se utilizó un cromatógrafo UHPLC-MS Thermosight, controlado por los softwares IsotopePattern, que nos ayuda a saber la masa molecular de cada sustancia, y DataAnalysis para ver los picos correspondientes a cada vitamina, así como poder realizar la

integración de cada pico y saber a. Los resultados se muestran en la Figura 7. El método empleado es válido para la detección de tiamina en plasma.

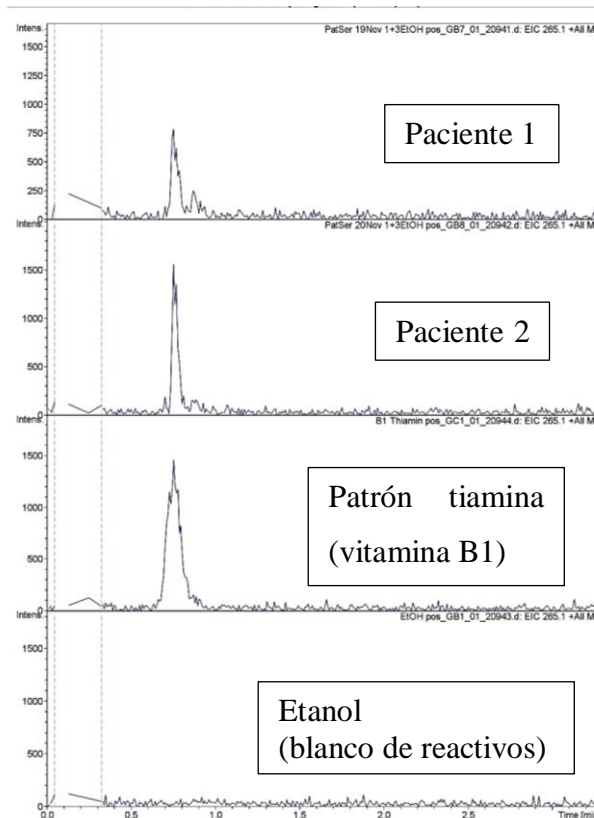


Figura 7: Separación de la tiamina (B1) por UHPLC-MS. Condiciones de separación: FE Reprisil-C18, FM metanol: tampón formiato (isocrático), caudal 0,5 mL/min, T = 40°C, pH =5, detección a $\lambda = 254$ nm.

En el caso del ácido fólico (Figura 8) no se detectó esta vitamina en los pacientes. Se podría asegurar que se trata de la inexistencia de esta vitamina en los pacientes con fibrosis quística.

La vitamina B12 no se llegó a detectar, en el caso de la cianocobalamina (vitamina B12) tuvo un error en el programa, pues estaba predeterminado para obtener sustancias de masa molar inferior a 1000 g/mol, y esta vitamina tiene una masa molar de 1355,38 g/mol, por tanto, en el diagrama tan solo se veía una línea recta, sin pico de dicha vitamina. Además, cabe que destacar la baja sensibilidad que presenta esta vitamina, por lo que quizás, pudiera no ser detectada a bajas concentraciones.

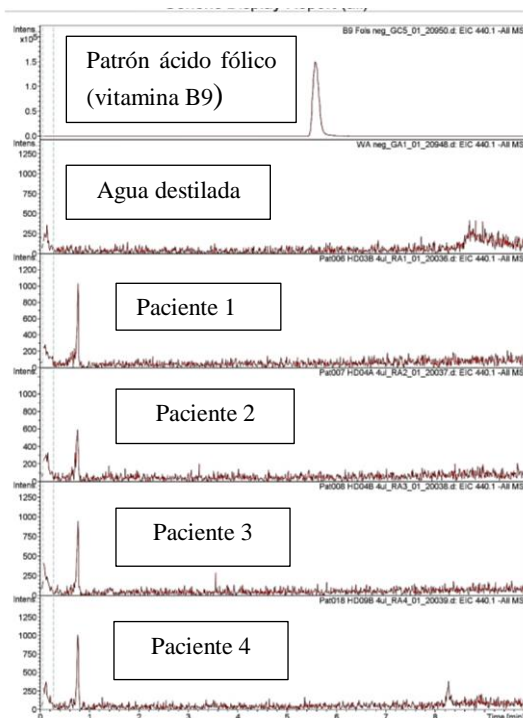


Figura 8: Separación de ácido fólico (B9) por UHPLC- MS. Condiciones de separación: FE Reprisil- C18, FM metanol: tampón formiato (isocrático), caudal 0,5 mL/min, T = 40°C, pH =5, detección a $\lambda= 254$ nm

En la Figura 8 se ven los cromatogramas obtenidos por UHPLC-UV realizando la detección a 254 nm para las disoluciones de referencia, con la concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. En orden de arriba hacia abajo tenemos los cromatogramas del agua destilada que nos sirve como blanco, y a continuación las vitaminas B1, B6, B9, B12, Vitamina C y, por último, un preparado que contenía entre otras, todas estas vitaminas. De estas disoluciones patrón de cada vitamina se tomaron dos alícuotas, una para analizar por el UHPLC- UV y otra para el UHPLC-MS. La sensibilidad obtenida por MS es mucho mayor, por ello se utilizan concentraciones menores que para la detección de estas vitaminas por UV. Como consecuencia de esto, algunas de las vitaminas hidrosolubles analizadas no fueron detectadas por el UHPLC- UV, como se puede observar en la Figura 9.

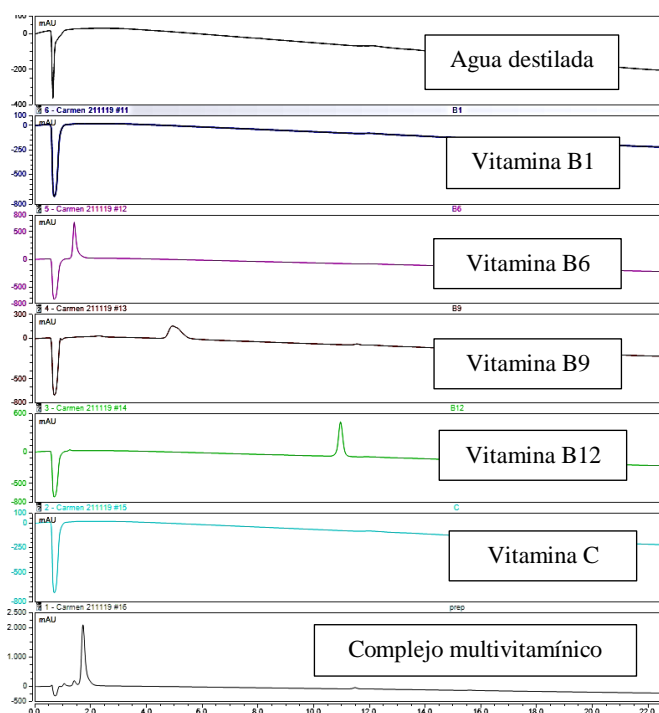


Figura 9: Detección de tiamina, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina y ácido ascórbico por UHPLC- UV.

5. Conclusiones

Tras la lectura de distintas publicaciones y la realización del pequeño experimento, puedo concluir que es viable el análisis de vitaminas en plasma de forma rápida y fiable mediante alguno de los métodos explicados anteriormente, pero siempre con un pretratamiento previo. El uso del HPLC acoplado a MS o UV supone un método selectivo, robusto y eficiente en el tiempo de análisis para la detección y cuantificación simultánea de vitaminas hidrosolubles en matrices biológicas complejas como el plasma y la orina. Estos métodos se pueden utilizar en ensayos clínicos de rutina donde se requiere un análisis multivitamínico.

Bibliografía

1 Elsevier online Vol. 23. Núm. 8, páginas 96-106 (septiembre 2004). Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-vitaminas-salud-13065403>

2 C. Latham, Michael, profesor de nutrición internacional, Universidad de Cornell Ithaca, Nueva York, Estados Unidos. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. 2002. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0f.htm#bm15x>

3 Patrick Oschmann, Hansotto Reiber, Brigitte Wildemann. Neurologische Labordiagnostik. 2006. Pag 86-87. Disponible en: <https://books.google.de/books?id=ZqDRSKwQyWQC&pg=PA86&lpg=PA86&dq=hplc+blut>

+vitamin&source=bl&ots=o-8hELiDAv&sig=ACfU3U1Y0UJnP3F3MPLsdZPZiJmST6SO8g&hl=es&sa=X&ved=2ahUK EwjBsdLZ85PIAhVCMewKHcGqBoc4ChDoATABegQIBhAB#v=onepage&q=hplc%20blut%20vitamin&f=false

4 Ángeles Carbajal Azcona, Departamento de Nutrición Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid. Manual de nutrición y dietética. Capítulo 11. 2013.

5 Dennis Kasper, Anthony Fauci, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo. Harrison principios de medicina interna. Capítulo 96e: Deficiencia y exceso de vitaminas y oligoelementos. 2016

6 Zhang Y, Zhou WE, Yan JQ, et al. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. Molecules. 2018;23(6):1484. Published 2018.

7 Gershkovich P., Ibrahim F., Sivak O., Darlington J.W., Wasan K.M. A simple and sensitive method for determination of vitamins D3 and K1 in rat plasma: Application for an in vivo pharmacokinetic study. Drug Dev. Ind. Pharm. 2014;40: 338–344.

8 Petteys B.J., Frank E.L. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC. Clin. Chim. Acta. 2011;421: 38–43.

9 Rudenko A.O., Kartsova L.A. Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed-phase HPLC. J. Anal. Chem. 2010;65: 71–76.

10 Zhang Y, Zhou WE, Yan JQ, et al. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. Molecules. 2018;23(6):1484. Published 2018 Jun 19.

11 Determination of water- and fat-soluble vitamins by HPLC. Technical note 72488. Thermo Fisher Scientific. 2017. TN72488-EN 1017M. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-72488-hplc-water-fat-soluble-vitamins-tn72488-en.pdf>

12 Alcántara Durán, Jaime. Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC. Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales. 2015.

13 Giorgi MG, Howland K, Martin C, Bonner AB. A Novel HPLC Method for the concurrent analysis and quantitation of seven water – soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): A validation study and application, Sc World J.2012;2012:359721.

14 Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Verpoorte R, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *J Sep Sci.* 2004;27(14):1181-8.

15 Siji J. Analysis of water - soluble vitamins from multivitamin tablets for nutrition labeling, Agilent Application Note, Agilent Technologies, Inc.2011; Publication Number 5990-7950EN.

16 Małgorza Szczuko, Rafał Migrała, Arleta Drozd, Marcin Banaszczak, Dominika Maciejewska, Dariusz Chlubek, Ewa Stachowska. Role of water soluble vitamins in the reduction diet of an amateur sportsman. *Central European Journal of Biology.* 2018.

17 Giorgi MG, Howland K, Martin C, Bonner AB. A Novel HPLC Method for the concurrent analysis and quantitation of seven water – soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): A validation study and application, *Sc World J.*2012;2012:35972.

18 Shaik MM, Gan SH. Rapid resolution liquid chromatography method development and validation for simultaneous determination of homocysteine, vitamins B(6), B(9), and B(12) in human serum. *Indian J Pharmacol.* 2013;45(2):159–167.