



# DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES EN SUERO MEDIANTE HPLC

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Ignacio Iniesta López-Casero

## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides de 40 átomos de carbono con múltiples beneficios para la salud: son precursores de la vitamina A, previenen el envejecimiento celular y disminuyen el riesgo de padecer distintos tipos de cáncer (1).

Su característica estructural más importante es el cromóforo de dobles enlaces conjugados, que le permite absorber luz UV-Vis. La mayoría se obtienen de frutas y verduras aunque los carotenoides mayoritarios en suero son 6:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (2) (Gráfico 1).

Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pueden separarse, identificarse y cuantificarse, de manera eficaz y fiable los carotenoides en suero anteriormente citados (2).



Los 11 dobles enlaces del  $\beta$ -caroteno forman el grupo cromóforo

## OBJETIVO

Analizar la técnica de HPLC como método de determinación de carotenoides en suero para facilitar el conocimiento sobre el estado nutricional de la población

## METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica sobre carotenoides y HPLC como método analítico para su determinación, así como los detectores asociados a ella en Science Direct, PubMed, Cyted y Research Gate.

Prioridad a artículos científicos, revisiones y extracción en suero. Palabras clave: *carotenoids determination, HPLC, serum, extraction.*

Selección final: **19 ARTÍCULOS Y 1 WEB**

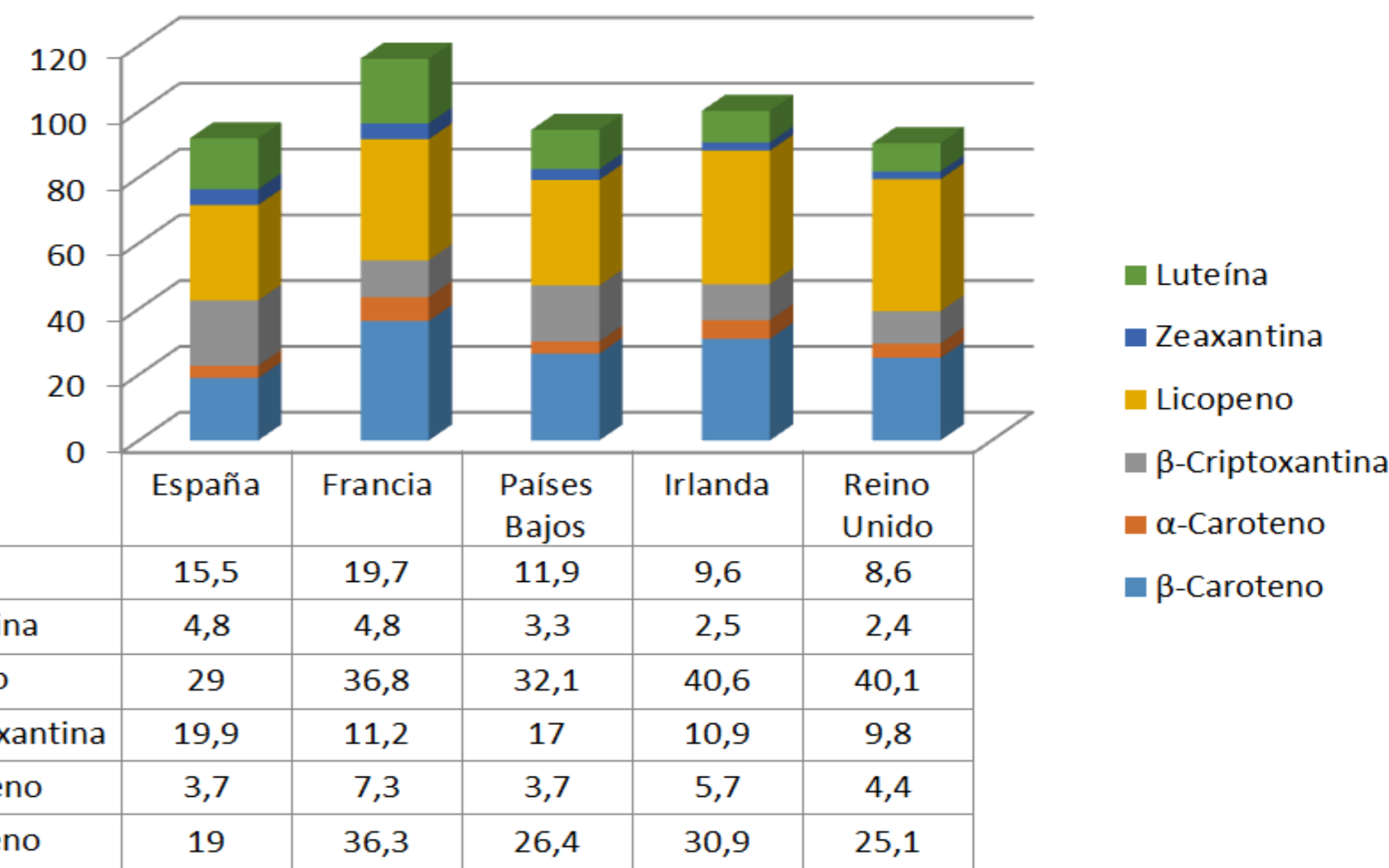


Gráfico 1: Concentraciones de carotenoides séricos ( $\mu\text{g/dL}$ ) en sujetos sanos de 5 países de la Unión Europea (2)

	España	Francia	Países Bajos	Irlanda	Reino Unido
Luteína	15,5	19,7	11,9	9,6	8,6
Zeaxantina	4,8	4,8	3,3	2,5	2,4
Licopeno	29	36,8	32,1	40,6	40,1
$\beta$ -Criptoxantina	19,9	11,2	17	10,9	9,8
$\alpha$ -Caroteno	3,7	7,3	3,7	5,7	4,4
$\beta$ -Caroteno	19	36,3	26,4	30,9	25,1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC DE CAROTENOIDES EN SUERO

#### PROCESO DE EXTRACCIÓN

1. Toma de muestra de sangre en ayunas y recogida en tubos con anticoagulante (EDTA)
2. Se guarda a  $-80^\circ\text{C}$  (ultracongelación)
3. Se añade etanol para precipitación de proteínas
4. Se centrifuga y se transfiere capa orgánica a otro tubo
5. Se repite proceso de extracción
6. Se resuspende el residuo en disolvente orgánico y se procede a su determinación (3).

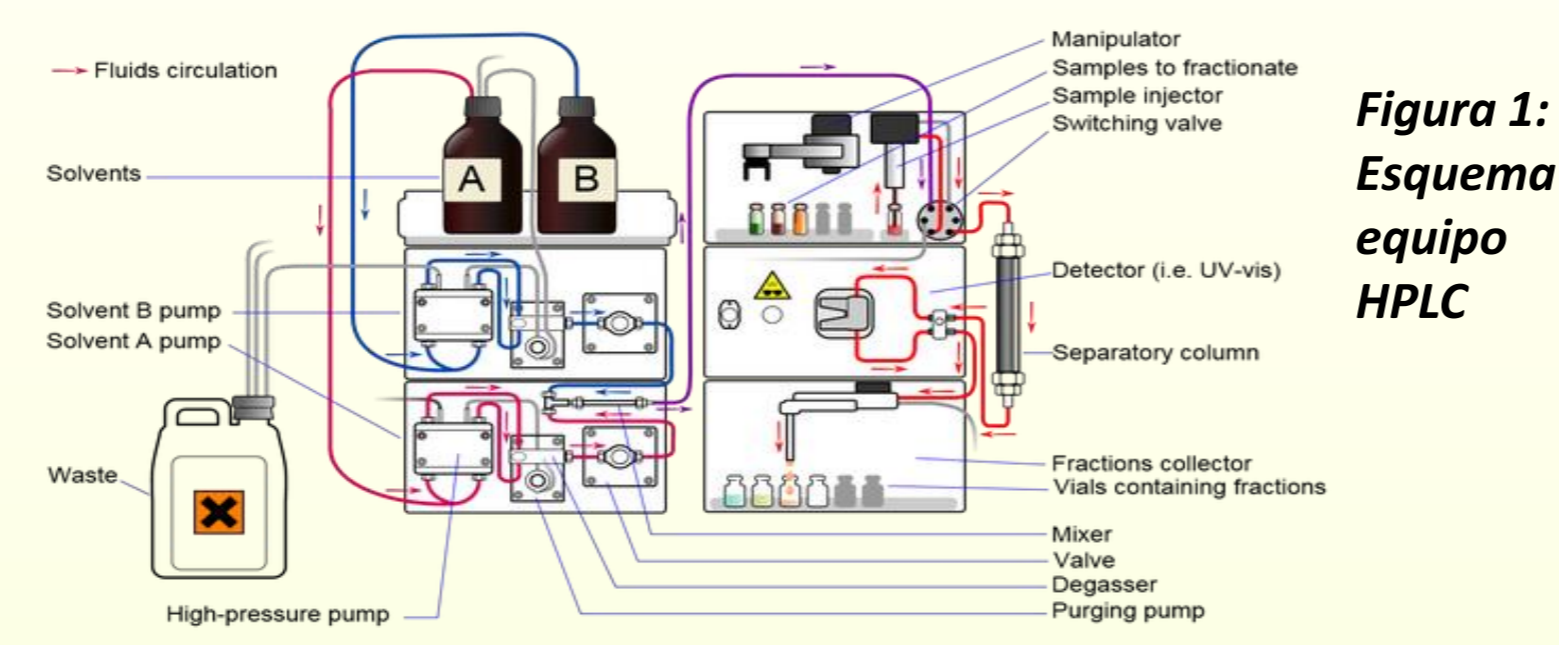


Figura 1: Esquema equipo HPLC

- Alta resolución
- Tiempo de espera y cantidad de muestra adecuados
- Buena separación

Estas características hacen ser a la técnica de HPLC la más adecuada para la separación, análisis y cuantificación de carotenoides, reduciendo los problemas generados por la alta variabilidad en su estructura química y su mala estabilidad (4).

La cromatografía puede realizarse en:

#### FASE NORMAL:

- Fase móvil no polar (hexano el más usado)
- Fase estacionaria polar, los materiales de relleno de la columna son sílice y nitrilo (5)

#### FASE REVERSA:

- Fase móvil polar, mezcla de agua y eluyentes como metanol y acetonitrilo
- Fase estacionaria no polar (hidrocarburos en soporte de sílice) (6)

### CROMATOGRAFÍA EN FASE INVERSA: COLUMNAS $C_{18}$ Y $C_{30}$

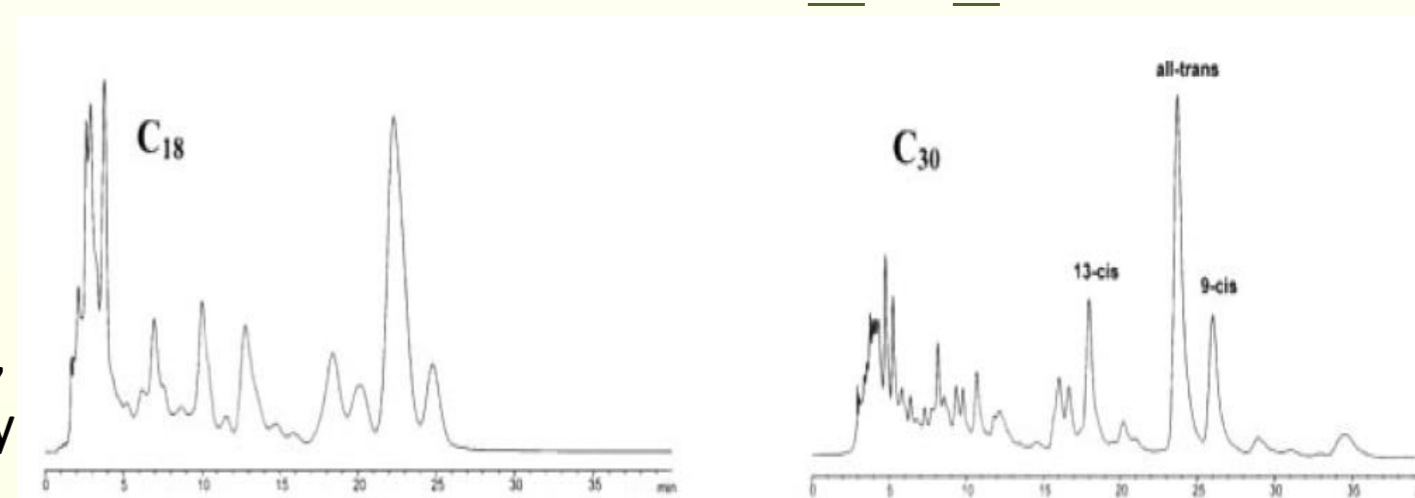


Figura 2: Ejemplos de cromatogramas obtenidos con columnas  $C_{18}$  y  $C_{30}$

#### $C_{18}$

Grupos silanol unidos a cadenas de alquilo, carácter hidrófobo. Separa luteína y zeaxantina

#### $C_{30}$

Muy selectiva para separación de carotenoides y sus ISÓMEROS (6)

En esta FASE REVERSA, para el análisis de carotenoides se utilizan columnas:

### DETECTOR DE FOTODIODOS EN LÍNEA (DAD) DE UV-VIS

El cromóforo permite a los carotenoides absorber luz en la región visible, basándose en ello, los detectores UV-Vis son los más usados en este análisis, al tener (7):

- ✓ Alta sensibilidad
- ✓ Estabilidad frente a cambios de T
- ✓ Admiten eluciones de diferentes compuestos

#### DETECTOR DE DIODOS EN LÍNEA O DIODO ARRAY (DAD)

En estos detectores, el más usado es:

El espectro UV-visible de un carotenoide ofrece información útil sobre el cromóforo, grupos funcionales y anillos presentes. En esta absorción suelen aparecer tres máximos de absorción (8)

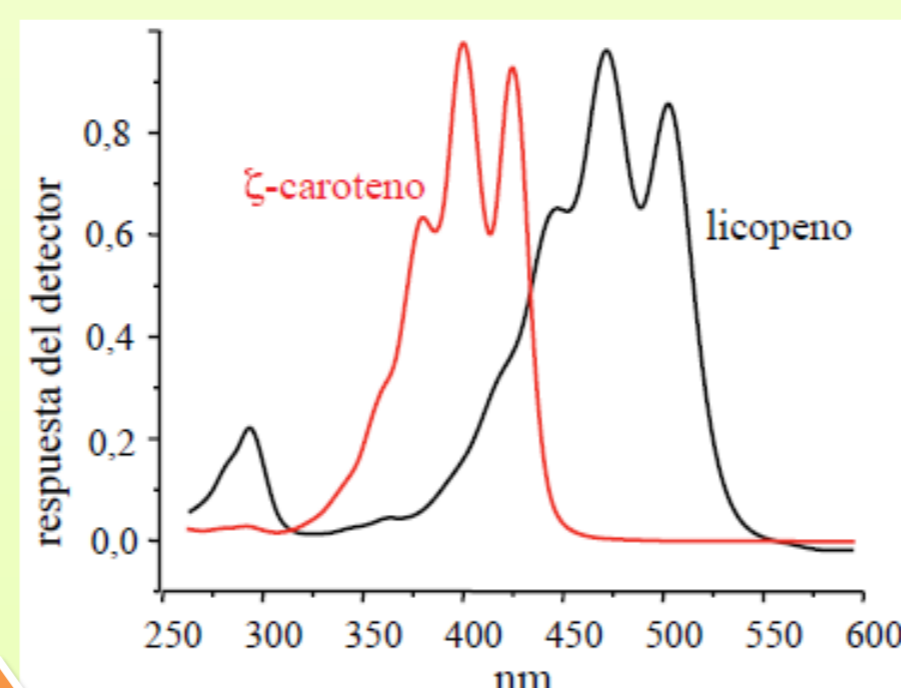


Figura 4: Espectros de absorción UV-Vis de  $\zeta$ -caroteno y licopeno obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE donde se aprecian los tres picos de cada carotenoide (10)



Otros detectores usados en HPLC (9)

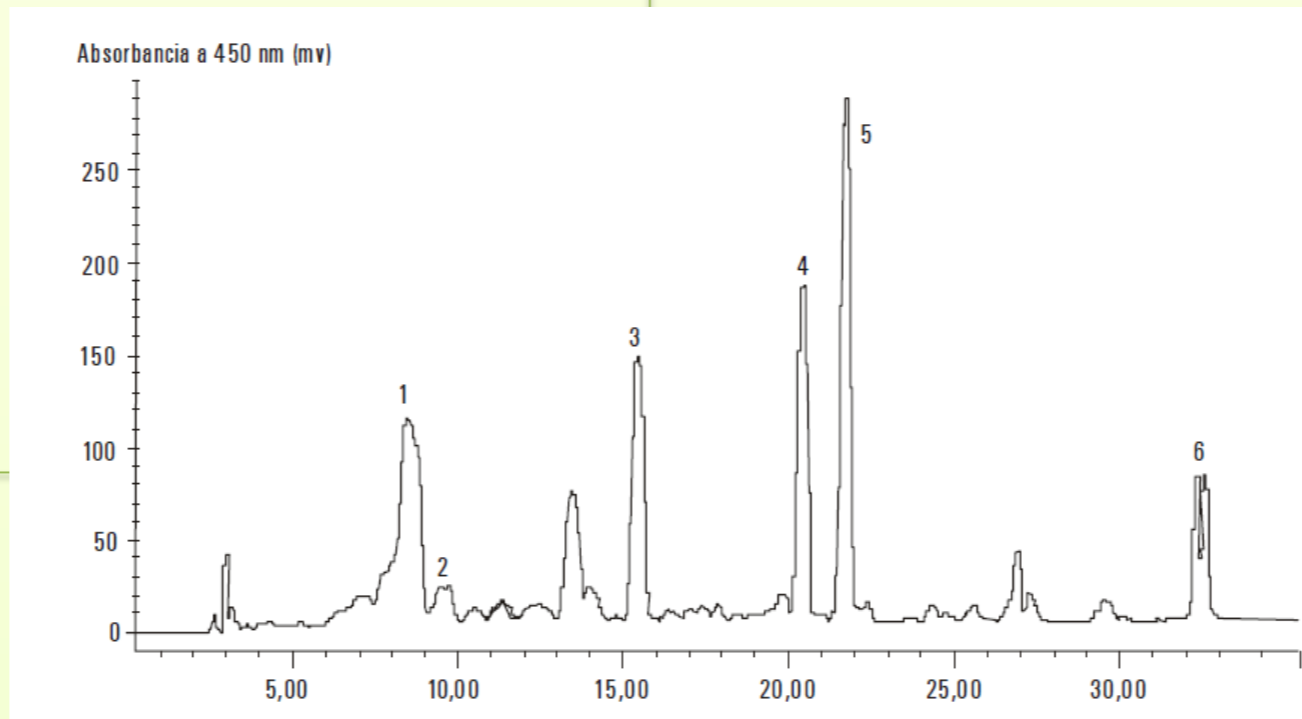


Figura 3: Ejemplo de cromatograma obtenido al analizar los carotenoides séricos determinados por HPLC en fase reversa con columna  $C_{30}$  en un grupo de adultos sanos (10)

### PROBLEMA HPLC: dificultad para obtener y preservar patrones puros de carotenoides (12).

Para la cuantificación de los carotenoides en estos detectores, es necesario usar estándares de referencia

La exactitud de los resultados depende de la pureza de los patrones y la exactitud de sus concentraciones

### ESPECTROMETRÍA DE MASAS ACOPLADA A HPLC

Para aumentar la eficacia se utilizan espectrómetros de masas acoplados (MS) a HPLC.

Estos nos confirman la masa, composición y características estructurales de los carotenoides.

Esta detección requiere ionización de los analitos y la modalidad más usada es la de **ionización química a presión atmosférica o APCI (11).**

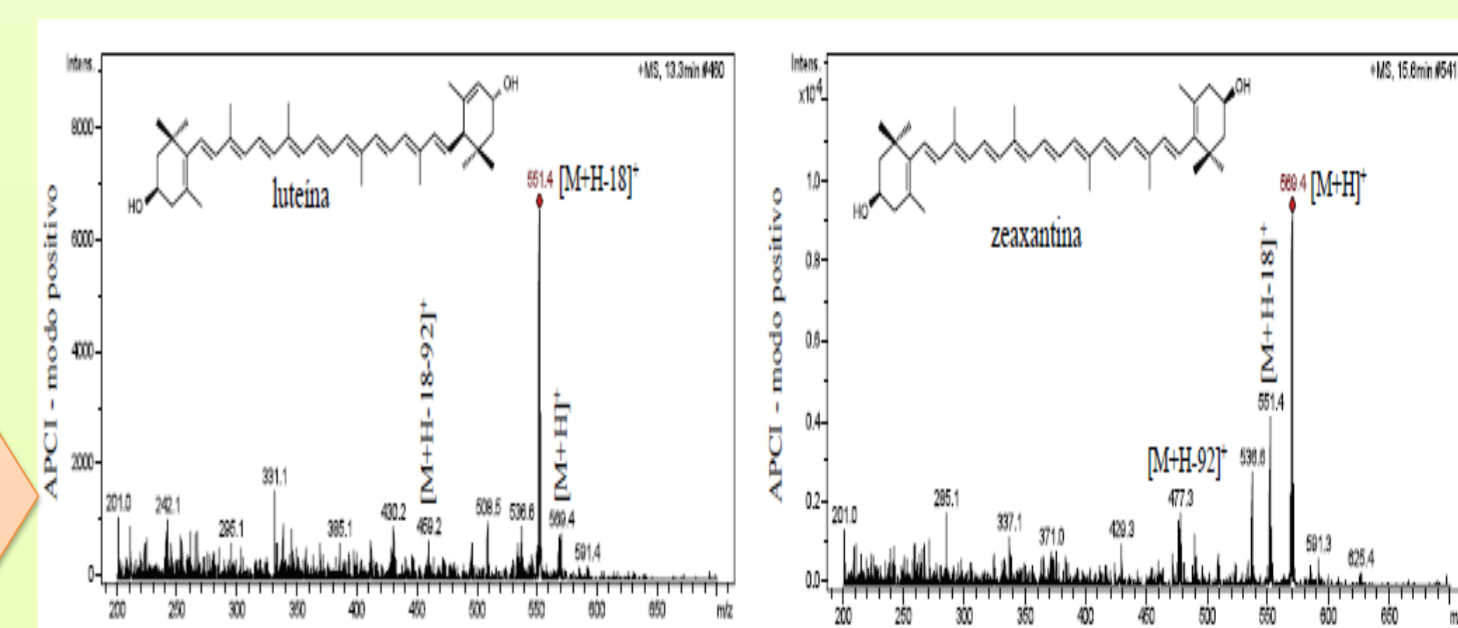


Figura 5: Estructuras químicas y espectros de masas de luteína y zeaxantina en APCI (17)

Luteína y zeaxantina tienen el mismo PM pero mediante la MS-APCI puede detectarse una intensidad de pico en la zeaxantina que no se aprecia en la luteína (13).

## CONCLUSIONES

- ❖ La técnica de HPLC es eficaz para el análisis de carotenoides por su sensibilidad, resolución, separación, tiempo de análisis, cantidad requerida muestra y reproducibilidad.
- ❖ Las mejores condiciones cromatográficas se obtienen con la fase reversa
- ❖ La mayoría de los métodos utiliza HPLC de fase reversa con  $C_{30}$ , por ser más fácil de usar, por tener una fase hidrofóbica aplicable a un amplio rango de moléculas y por separar isómeros.
- ❖ Las fase móviles más comunes son combinaciones de disolventes polares (acetonitrilo, metanol, diclorometano)
- ❖ El detector UV-Vis acoplado a HPLC, y en concreto el de fotodiodos en línea o diodo array (DAD) es el más eficaz y sensible en esta determinación.
- ❖ El mayor problema del HPLC es la dificultad para preservar y obtener los patrones puros de carotenoides
- ❖ La espectrometría de masas acoplada a HPLC se emplea para completar información estructural.

## BIBLIOGRAFÍA



Ver PDF