



Determinación por CLAR de las Vitaminas A y D en Aceite de Hígado de Tiburón

Caridad M. GARCÍA PEÑA*, Mirta CASTIÑEIRA DÍAZ, Mirna FERNÁNDEZ CERVERA,
Jacqueline A. ROMERO DÍAZ, Susana M. COLLAZO QUINTANA,
Betty MANCEBO DORVIGNY & Leonid TORRES AMARO

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM),
Ave. 26 N° 1605 el Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

RESUMEN. En este trabajo se desarrollan y validan las vitaminas A y D mediante dos métodos analíticos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), aplicables al control de la calidad del Aceite de Hígado de Tiburón. Ambos métodos se basan en la separación de las vitaminas a través una columna cromatográfica Lichrosorb RP - 18 (5 μ m, 25 cm x 4 mm), empleando una fase móvil compuesta por metanol-agua (98:2) y la cuantificación de las mismas frente a muestras de referencia empleando el método del estándar externo. Las longitudes de ondas empleadas fueron 325 y 254 nm, para la Vitamina A y D, respectivamente. Los métodos analíticos desarrollados resultaron lineales, precisos, específicos y exactos en el rango de concentraciones estudiadas.

SUMMARY. "HPLC Determination of Vitamins A and D in the Pool of Shark Liver Oil". In this work two analytic, easy and economic methods to determine vitamins A and D by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) applicable to the quality control of the Shark Liver Oil Pool were developed and validated. Both methods are based in the separation of the vitamins using a Lichrosorb RP - 18 (5 μ m) chromatographic column (25 cm x 4 mm), and a mobile phase composed by methanol-water (98:2). The quantification was achieved by using the external standard method. Different wavelengths (325 and 254 nm) were selected to determine vitamins A and D, respectively. The analytic methods developed were lineal, precise, specific and exact in the range of the studied concentrations.

INTRODUCCIÓN

Los océanos contienen el 90 por ciento de la biomasa del mundo, y son fuente primaria de alimentos para más de tres millones y medio de personas. Uno de sus habitantes más estudiados en el mundo entero, incluso desde épocas prehistóricas, es el tiburón, quien se localiza en todos los mares del planeta ¹. De manera general los tiburones se dividen en tres grupos: las especies de mar abierto o hábitat oceánico, las de hábitos costeros permanentemente y las especies que viven a gran profundidad. Los estudios evidencian que existen reportadas 250 y hasta 300 especies de tiburones en los mares, resultando pocas las que habitan en agua dulce.

En Cuba existen 5 órdenes, 12 familias, 29 géneros y 48 especies de tiburones ².

El aceite de hígado de tiburón constituye una importante fuente natural de vitaminas, principalmente Vitaminas A y D, además de otras vitaminas del complejo B. A este aceite se le atribuyen múltiples propiedades, entre las que se destacan fortalecer el sistema inmune, disminuir la fiebre, sinusitis y alergia, aliviar el dolor en la artritis, ayudar a mantener saludable la piel -hecho que beneficia a pacientes con soriasis y otras enfermedades dermatológicas-, disminuir los efectos indeseables de las radiaciones, poseer propiedades anticancerígenas, reducir el colesterol; aumentar la energía suminis-

PALABRAS CLAVE: Aceite de Hígado de Tiburón, CLAR, Validación, Vitamina A, Vitamina D.

KEY WORDS: A Vitamin, D Vitamin, HPLC, Shark Liver Oil, Validation.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: caridadgp@infomed.sld.cu, caridad@cidem.sld.cu

trando oxígeno a las células, presentar propiedades antioxidantes, proteger al organismo contra sustancias tóxicas, ayudar a lograr una recuperación completa en pacientes asmáticos, fortalecer al organismo contra los resfriados y la gripe y proporcionar energía a pacientes que padecen del síndrome de fatiga crónica; también se lo ha empleado en la producción de suplementos alimenticios ³.

El desarrollo de técnicas o métodos analíticos novedosos o la adecuación de algunos ya reportados es un problema cotidiano. Siempre que esto suceda se exige como parte integral del estudio, la validación del método en cuestión. En el presente trabajo se emplea el "pool" de aceite de hígados de tiburones aledaños a nuestras costas, ya que resulta muy difícil la captura de tiburones de una misma especie, y tiene como objetivo desarrollar y validar los métodos de análisis para la cuantificación de las vitaminas A y D por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se empleó una muestra de aceite de hígado de tiburón obtenida a escala de banco en el Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP, Cuba). Las muestras del pool de aceite de hígado de tiburón, y los patrones de referencia de las vitaminas A y D (Departamento de patrones, CIDEM, Cuba), fueron procesadas según la metodología propuesta a continuación con las modificaciones pertinentes.

Preparación de las soluciones de de las sustancias de referencia química y de las muestras para el análisis

Las vitaminas A y D se disolvieron en KOH metanólico 0,5 hasta lograr concentraciones de 9,6 µg/mL y 7,2 µg/mL, respectivamente.

A 1.000 g de aceite se le adicionaron 35 mL de etanol absoluto, 10 mL de KOH al 50% y 25 mg de Hidroquinona (Merck, Alemania), calentando a reflujo 30 min. Luego se adicionaron 40 mL de agua destilada y 50 mL de una mezcla de éter dietílico - n hexano (1:1), se extrajo durante 5 min y se dejó en reposo hasta la separación de fases. A la fase acuosa se le realizaron cinco extracciones, tomándose únicamente la fase orgánica, sobre la que se realizaron cuatro lavados con 50 mL de agua acidulada, se adicionaron 2 g de Na₂SO₄ anhidro (Merck, Alemania), concentrando a sequedad en rotoevaporador Buchi 461 RE 101 (Suiza). Se redisolvió en 25 mL de solución de KOH Met 0,5 N, inyectándose 20 y 50 µL para la Vitamina A y D, respectivamente.

Desarrollo del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para determinar las vitaminas en el pool de aceite de hígado de tiburón

Se desarrolló un método analítico por CLAR empleando diferentes proporciones de fase móvil, velocidades de flujo, volúmenes de inyección y longitudes de onda, lográndose los mejores resultados con el método que se refleja a continuación ⁴.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Merck) con integrador Shimadzu modelo CRD 8AV, detector UV (longitud de onda variable) Kanuer; Bomba Kanuer K-1001; Interface Box Kanuer, equipado con una columna Lichrosorb RP-18 (5µm) 25 cm-4mm (Merck, Alemania). La fase móvil utilizada fue metanol-agua (98:2) v\v y velocidad de flujo de 1,5 mL\min. La longitud de onda empleada para determinar la vitamina A fue 325 nm, mientras que para la vitamina D fue 254 nm.

Validación del método por CLAR para la cuantificación de las vitaminas

Especificidad

Se analizó una muestra del pool de aceite, y muestras de las soluciones de referencias de las vitaminas A y D, respectivamente. No se deben obtener señales de otras vitaminas presentes en el aceite en la zona de elución de la vitamina de interés ⁵⁻⁷. Simultáneamente se realizó un scanning a los picos correspondientes a las vitaminas A y D, en un rango de 200 a 500 nm.

Linealidad

Se prepararon curvas de calibración con soluciones patrones de cada vitamina: concentraciones de 5,76, 7,68, 9,60, 11,52 y 13,44 µg/mL para la vitamina A y 4,34, 5,79, 7,24, 8,69 y 10,14 µg/mL para la vitamina D, que representan el 60, 80, 100, 120 y 140%, para cada caso, realizándose tres réplicas para cada punto de análisis. Aplicando la ecuación de la recta ($y = mx + b$), el coeficiente de correlación debe ser ($r \geq 0.99$); el coeficiente de variación de los factores de respuesta (C.Vf) tiene que ser $\leq 5 \%$; en la prueba de significación del intercepto, mediante la t Student, la t calculada (t cal) debe ser menor que la t tabulada (t tab) para un 95% de confianza ⁵⁻⁷.

Precisión

Se evaluó la precisión del método mediante el estudio de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió sobre la base de ocho determinaciones que representan el 100%, mientras que para el estudio de precisión intermedia se efectuaron valoraciones, por dos ana-

listas, en tres días diferentes, a tres niveles de concentración que representan el 80, 100, 120% de la concentración teórica de la solución empleada en el análisis ⁵⁻⁷. En el estudio de repetibilidad el coeficiente de variabilidad (C.V. debe ser $\leq 2.0\%$). Para el estudio de precisión intermedia (prueba de Fischer) la F calculada debe ser menor que F tabulada y en la prueba de Student la t calculada debe ser menor que t tabulada.

Exactitud

En el estudio de la exactitud y linealidad del método se empleó el método de adición del patrón, preparando muestras del pool de aceite con diferentes niveles de vitamina, que representan el 80, 100 y 120%, realizándose tres réplicas para cada nivel estudiado. Teniendo en cuenta la concentración de vitaminas presentes en el pool de aceite (124,22 y 90,51 μg de Vitamina A y D, respectivamente por cada 0,5 g del pool de aceite), para la vitamina A se añadieron 67,78, 115,78 y 163,78 μg (correspondiente al 80, 100 y 120%) a 0,5 g del pool de aceite. Para la vitamina D se añadieron 54,45; 90,75 y 127,09 μg (correspondiente al 80, 100 y 120%) a 0,5 g del pool de aceite. Para la ecuación de la recta $y = mx + b$, el coeficiente de correlación (r) tiene que ser $\geq 0,999$, el coeficiente de variación de los factores de respuesta ($C.V_f$) $\leq 5\%$; lo recuperado debe estar entre 98-102 %; en la prueba de significación del intercepto, mediante la prueba t Student, la t calculada (t cal) debe ser menor que la t tabulada (t tab); en la prueba de Cochran la G calculada debe ser menor que la G tabulada ⁵⁻⁷. Todos los análisis estadísticos fueron procesados mediante el uso del Programa Statgraphics Plus versión 5.1, Abril 2002.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se empleó como fase móvil una mezcla de metanol-agua (98: 2) para la validación de los métodos analíticos aplicables para la determinación de la vitaminas A y D en el Pool de Aceite de Hígado de Tiburón, por ser la proporción donde se logra la mejor separación de las vitaminas, así como la mejor apariencia visual del pico y el mejor portentaje de pureza del pico, demostrándose el no solapamiento de las Vitaminas A y D.

Validación del método analítico para la cuantificación de vitamina A por CLAR

Especificidad

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método a 325 nm, longitud de máxima absorbancia de la Vita-

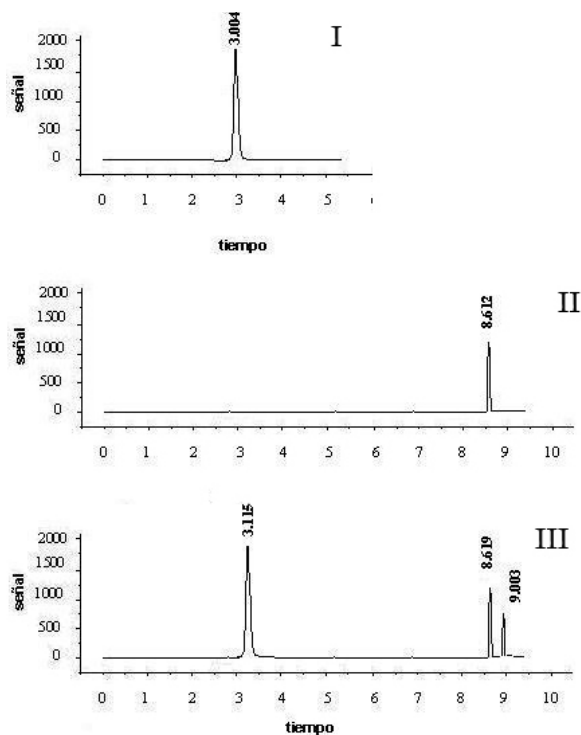


Figura 1. Resultados del estudio de especificidad del método para la Vitamina A. **I:** Cromatograma del estándar de vitamina A. **II:** Cromatograma del estándar de vitamina D. **III:** Cromatograma del Pool de Aceite de Hígado de Tiburón.

mina A. Como se observa en el cromatograma correspondiente a la solución de referencia de la vitamina A, el tiempo de retención de la misma coincide con el tiempo de retención reportado para el pool de aceite. En cuanto a la solución de referencia de vitamina D, presenta un tiempo de retención diferente a la vitamina A, lo cual indica que la vitamina presente en el Pool de aceite no interfiere en la determinación de la vitamina A.

Los resultados del scanning realizados mostraron que no había aparición de pico correspondiente a otras sustancias, ya que no observaron señales ocultas en ninguno de los espectros realizados.

Linealidad

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según $y = 1,25945 X + 124,507$, con $r = 0,999$. Al aplicar la prueba de significación del intercepto se obtuvo una t calc. = 1,220 para una t tab. = 2,015, obteniéndose valores de t calculada menores que la t tabulada. Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta CV_f se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV = 2,71\%$, demostrando-

se la adecuada linealidad de los métodos, de acuerdo con los límites establecidos.

Precisión

En los estudios de la repetibilidad realizados a una misma muestra por el mismo analista, el mismo día, a través de seis réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (1,32 %), lo que demuestra la buena precisión de los métodos según los límites para los métodos cromatográficos: $CV \leq 2,0\%$.

Los valores que se obtienen en los estudios de precisión intermedia (Tablas 1 y 2), de las pruebas de Fischer y t - Student, demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, así como entre los días estudiados, para una probabilidad de 0.05%, ya que los valores de F calculados son menores que la F tabulada. Al realizar las pruebas de t- Student los valores calculados resultaron menores que el tabulado, para una probabilidad de 0.05, lo que demuestran que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5%.

Exactitud

En la curva de recuperación, se reportan los mg teóricos contra los mg prácticos, correspondiéndose a la ecuación $y = 0,97622 X + 0,50657$, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,999. Al aplicar la prueba de significación para conocer la influencia de la concentración (G de Cochran), se obtuvo una G cal. = 0,634 para una G tab. = 0,797, obteniéndose valores de G calculada menores que la G tabulada. Al realizar la prueba de significación entre el % recuperado y el 100% de recuperación, se obtuvo un coeficiente de variación total de 1,02% y una t cal = 1,94 menor que t tab = 2,306, obteniéndose valores de t calculada menores que la t tabulada. El valor de porcentaje de recobro (99,75 %) se encuentra dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación, para cada uno de los niveles de concentración estudiados, son menores que el 2%.

Niveles	Analista 1 (µg/g aceite)			Analista 2 (µg/g aceite)		
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día
80 %	200,18	202,56	203,56	204,23	202,89	202,59
	202,65	203,89	202,89	203,54	201,56	200,89
	201,56	201,56	201,46	202,56	200,56	201,68
100 %	251,48	252,69	252,89	253,89	253,89	252,49
	250,48	253,69	251,46	252,69	251,78	251,73
	252,69	251,56	253,56	251,98	252,56	252,78
120 %	300,58	301,58	302,89	301,99	303,59	301,46
	301,56	302,49	301,45	302,59	302,72	300,83
	302,50	301,23	302,86	302,59	303,69	302,79

Tabla 1. Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico para la Vitamina A.

Prueba de significación de Fisher por analistas (F _{tab} (8/8; 0.05) = 3,44)	Prueba de significación de Fisher por día (F _{tab} (5/5; 0.05) = 5,05)				F exp ≤ F tab
	Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	1,07	80	1,49	1,39	2,06
100	1,81	100	1,50	1,51	2,26
120	1,29	120	1,62	1,24	1,30
Prueba de significación de student por analistas (t _{tab} (16; 0.05) = 2,12)	Prueba de significación de student por días (t _{tab} (10; 0,05) = 2,22)				t exp ≤ t tab
	Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	0,38	80	0,31	0,02	0,34
100	0,81	100	0,79	0,53	0,31
120	1,36	120	1,22	0,98	0,21

Tabla 2. Resultados estadísticos de la precisión intermedia del método analítico para la Vitamina A.

Validación del método analítico para la cuantificación de vitamina D por CLAR

Especificidad

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método a 254 nm, longitud de máxima absorbancia de la Vitamina D. Como se observa, en el cromatograma correspondiente a la solución de referencia de la vitamina D, el tiempo de retención de la misma coincide con el tiempo de retención detectado en el pool de aceite. En cuanto a la solución de referencia de vitamina A, presenta tiempo de retención diferente al de la vitamina D, lo cual indica que esta vitamina, presente en el pool de aceite, no interfiere en la determinación de la vitamina D.

Los resultados del scanning realizados mostraron que no había aparición de pico correspondiente a otras sustancias, ya que no observaron señales ocultas en ninguno de los espectros realizados.

Linealidad

La ecuación de la recta de la curva de calibración se expresa según: $y = 19835,11915 X + 39838,5536$, con $r = 0,999$. Al aplicar la prueba de significación del intercepto se obtuvo una $t_{calc} = 2,001$ para una $t_{tab} = 2,015$ obteniéndose valores de t calculada menores que la t tabulada. Cuando se aplica la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta (CV_p) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV = 3,88 \%$, demostrándose la adecuada linealidad de los métodos, de acuerdo con los límites establecidos.

Precisión

En los estudios de la repetibilidad, realizándose a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de seis réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado

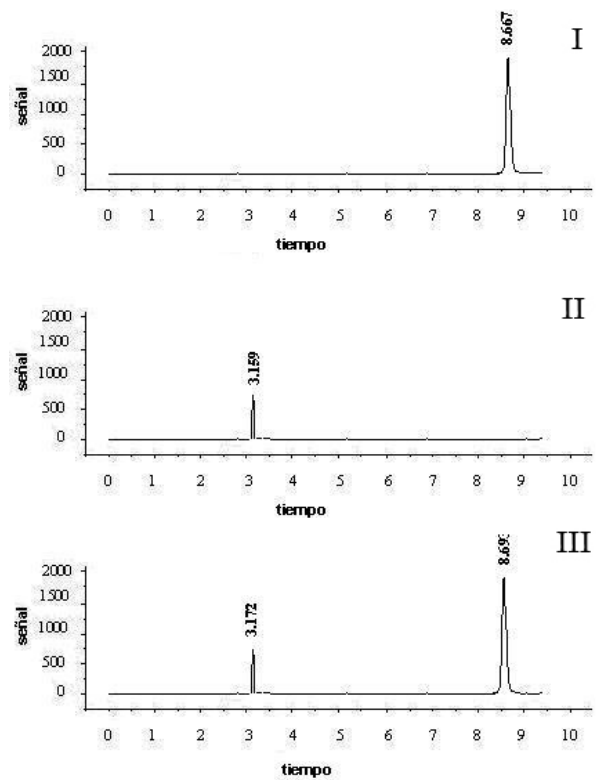


Figura 2. Resultados del estudio de especificidad del método para la Vitamina D. **I** Cromatograma de la Sustancia de referencia química de la vitamina D. **II** Cromatograma de la Sustancia de referencia química de la vitamina A. **III** Cromatograma del Pool de Aceite de Hígado de Tiburón.

canzó un coeficiente de variación adecuado (0,77 %), lo que demuestra la buena precisión de los métodos según los límites para los métodos cromatográficos: $CV \leq 2.0\%$. Los valores que se obtienen en los estudios de precisión intermedia (Tabla 3 y 4), de las pruebas de Fischer y t - Student, demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanza-

Niveles	Analista 1 (µg/g aceite)			Analista 2 (µg/g aceite)		
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día
80 %	125,03	126,75	126,39	126,89	126,78	124,79
	124,32	126,79	125,79	124,78	125,42	125,69
	126,78	124,78	126,79	125,45	126,13	124,89
100 %	175,45	174,89	175,89	174,98	175,48	175,25
	174,56	173,48	176,23	175,21	176,29	174,93
	176,56	176,29	174,28	176,49	175,89	175,35
120 %	224,89	224,79	226,83	224,79	225,79	224,16
	225,79	225,89	225,74	225,16	224,89	225,72
	224,13	226,75	224,53	226,70	226,49	226,49

Tabla 3. Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico para la Vitamina D.

Prueba de significación de Fisher por analistas ($F_{tab(8/8; 0.05)} = 3,44$)		Prueba de significación de Fisher por día ($F_{tab(5/5; 0.05)} = 5,05$)				F exp ≤ F tab
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	1,47	80	1,60	1,13	1,81	
100	3,32	100	1,73	2,41	1,40	
120	1,12	120	1,24	1,72	1,39	
Prueba de significación de student por analistas ($t_{tab(16; 0.05)} = 2,12$)		Prueba de significación de student por días ($t_{tab(10; 0.05)} = 2,22$)				t exp ≤ t tab
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	0,97	80	1,08	1,06	0,39	
100	0,79	100	0,32	0,15	0,73	
120	1,02	120	1,21	0,41	0,65	

Tabla 4. Resultados estadísticos de la precisión intermedia del método analítico para la Vitamina D.

das por los analistas en diferentes días, así como entre los días estudiados, para una probabilidad de 0.05%, ya que los valores de F calculados son menores que la F tabulada. Al realizar las pruebas de t- Student los valores calculados resultaron menores que el tabulado, para una probabilidad de 0.05, lo que demuestran que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5%.

Exactitud

En la curva de recuperación se reportan los mg teóricos contra los mg prácticos, correspondiéndose a la ecuación $y = 0,95801 X + 0,57927$, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.99936. Al aplicar la prueba de significación para conocer la influencia de la concentración (G de Cochran), se obtuvo un $G_{cal} = 0,420$ para una $G_{tab} = 0,797$, obteniéndose valores de G calculada menores que la G tabulada. Al realizar la prueba de significación entre el % recuperado y el 100 % de recuperación, se obtuvo un coeficiente de variación de 1,25 % y se obtuvo una $t_{cal} = 1,33$ menor que $t_{tab} = 2,306$, obteniéndose valores de t calculada menores que la t tabulada. El valor de por ciento de recobro (99,07%) se encuentra dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102%) y los valores del coeficiente de variación, para cada uno de los niveles de concentración estudiados, son menores que el 2%.

CONCLUSIONES

Los métodos desarrollados y validados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), para determinar las vitaminas A y D en el Pool de Aceite de Hígado de Tiburón resultaron lineales, precisos, específicos y exactos en el rango de concentraciones evaluadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nassif-Hadad, A. & E. Meriño-Ibarra (2003) *Rev. Cub. Med.* **42**: 49-55.
- Von Shacky, C. (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 224S-7S.
- Morón, C. (1999) "Producción y Manejo de datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición". Ed. Inta. Santiago de Chile.
- Dierksneier, G. (2005) "*Métodos Cromatográficos*". Ed. Científico - Técnica. La Habana, Cuba. págs. 1-4, 256- 412.
- U.S. Food and Drug Administration (2000) Guidance For Industry. "*Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*". Disponible en <<http://www.fda.gov/Cber/gdlns/methval.pdf>>
- International Conference on Harmonization (1995) "*Validation of Analytical Procedures . Technical Requirements For The Registration of Pharmaceuticals For Human Use*" ICH-Q2A, Geneva.
- Farmacopea de los Estados Unidos (2007) USP 30th Ed. The United States Pharmacopeial Convention. Estados Unidos de América. NF- 25.