

# PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE VITAMINA A EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

## PROTOCOL FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN A IN AQUATIC ORGANISMS

Anthony Ruiz<sup>1</sup>

Leenin Flores

Alberto Oscanoa

### RESUMEN

RUIZ A, FLORES L, OSCANO A. 2021. Protocolo para determinación de vitamina A en organismos acuáticos. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 16-19.- La vitamina A es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos acuáticos. El organismo no puede sintetizarlo y debe obtenerlo a través de los alimentos. El análisis de vitamina A en muestras de organismos acuáticos y alimentos se realiza principalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la mayoría de los casos, la preparación de la muestra implica un proceso de saponificación, una etapa crítica, por la sensibilidad de la vitamina al calor. El objetivo del protocolo es determinar el contenido de vitamina A en organismos acuáticos por cromatografía líquida de alta resolución.

PALABRAS CLAVE: vitamina, saponificación, organismos, cromatografía

### ABSTRACT

RUIZ A, FLORES L, OSCANO A. 2021. Protocol for the determination of vitamin A in aquatic organisms. *Inf Inst Mar Peru*. 48(1): 16-19.- Vitamin A is an essential nutrient for the growth and development of aquatic organisms. However, it cannot be synthesized by the organism and must be obtained from food. The analysis of vitamin A in samples of aquatic organisms and food is mainly performed via high-performance liquid chromatography (HPLC). Mostly, sample preparation involves a saponification process, which is a critical step since the vitamin is sensitive to heat. This protocol aims to determine the vitamin A content in aquatic organisms using high-performance liquid chromatography.

KEYWORDS: vitamin, saponification, organisms, chromatography

## 1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios del AFIA-IMARPE desarrollan proyectos de investigación orientados al cultivo de peces importantes para la acuicultura, como el "lenguado" (*Paralichthys adspersus*), la "chita" (*Anisotremus scapularis*) y la "cabrilla" (*Paralabrax humeralis*). Mejorando las técnicas de cultivo respectivamente, pues poseen un alto valor nutricional y comercial.

El éxito de la acuicultura comercial depende de varios factores relacionados a la biología, ingeniería y economía. Un componente biológico clave, es la disponibilidad de dietas adecuadas, que sean digeribles y aporten los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de los organismos acuáticos (MOKOLENSANG, YAMASAKI & ONOUE, 2003).

El desarrollo de una dieta adecuada para la producción de las demandas acuícolas, exige mejoras nutricionales para evaluar la calidad de los ingredientes de un alimento. Hoy en día,

las vitaminas son nutrientes esenciales para la mayoría de especies animales.

La vitamina A (vitA) juega un papel importante en varios procesos fisiológicos incluyendo la visión, reproducción, embriogénesis, crecimiento, diferenciación y mantenimiento de células epiteliales. Poco se conoce aún sobre el rol de la vitA en los organismos acuáticos; sin embargo, se ha desarrollado en los últimos años (HERNÁNDEZ, FERNÁNDEZ & RUEDA, 2010).

El término vitamina A se ha definido como el descriptor genérico para todos los derivados de ion  $C_{20}$ - $\beta$ -ionona con actividad biológica cualitativa del *all-trans*-retinol. Los compuestos activos de vitA pueden clasificarse en dos grupos básicos: vitA (retinoides) y provitamina A (ROGERS, DIEFFENBACHER & HOLM, 2001).

Hasta la fecha, se han desarrollado muchos protocolos para analizar la concentración de retinol y el éster de retinilo en muestras biológicas (KYUNG KIM & QUADRO, 2010).

<sup>1</sup> IMARPE Esq. Gamarra y Gral. Valle s/n, Callao, Perú. aruiz@imarpe.gob.pe

La cromatografía líquida de alta resolución HPLC, es de las mejores técnicas analíticas para evaluar y caracterizar las concentraciones de retinoides en muestras biológicas. Sin embargo, las propiedades químicas de sus metabolitos no permiten la cuantificación precisa de cada uno en un solo ensayo. Algunos de estos métodos pasan por etapas que consumen mucho tiempo (YOKOTA & OSHIO, 2017).

Como resultado, desarrollaron métodos analíticos para la extracción y cuantificación simultánea de vitamina A por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas LC-MS (WILLS, HAMMOND & CALTON, 2019).

Ya que este ensayo nos permite obtener la concentración de vitamina A en los organismos acuáticos, el objetivo del protocolo es desarrollar un procedimiento para precisar el contenido de vitamina A en organismos acuáticos por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales a usar en el proceso se listan a continuación.

- UPLC-QTOF Xevo G2-XS Waters con el programa MassLynx 4.1 ver. 3.2.1.
- Balanza semi-micro analítica Sartorius MSU225S-000-DU.
- Vórtex VELP Scientific Wizard.
- Baño de ultrasonido Branson 2510.
- Micropipetas de rango variable de 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L y 500-5000  $\mu$ L.
- Evaporador-concentrador Glas-Col para viales de 4 mL.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa rosca de PTFE.
- Pipeta volumétrica de 10 mL.
- Vial de 4 mL.
- Viales de HPLC de 2 mL.
- Filtro de jeringa de nylon de 0,22  $\mu$ m.
- Metanol grado LC-MS.

- Hexano grado LC-MS.
- Agua grado LC-MS.
- Etil acetato grado HPLC.
- Acetonitrilo grado LC-MS.

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Estándar de Acetato de Retinol** de 1000 ng/mL: pese 1 mg de Acetato de Retinol (Vitamina A) en una fiola de 100 mL, añada 50 mL de metanol y disuelva en el baño de ultrasonido, enrase a 100 mL con metanol. Tome una alícuota de 10 mL de la solución anterior, para diluirla en una fiola de 100 mL con metanol.
- **Hidróxido de potasio KOH 30%**: pese 3 g de KOH en un tubo de ensayo de 10 mL, añada 10 mL de agua ultrapura y disuelva en baño de ultrasonido.
- **Pirogalol 75 g/L**: pese 0,75 g de pirogalol en un tubo de ensayo, añada 10 mL de agua ultrapura y disuelva en baño de ultrasonido.
- **BHT 20 g/L**: pese 0,20 g de BHT en un tubo de ensayo, añada 10 mL de metanol y disuelva en baño de ultrasonido.

### SAPONIFICACIÓN

- Trabaje las muestras en un ambiente con luz muy tenue para evitar la degradación de la vitamina A.
- Pese 100 mg de tejido (Ps) en un tubo de ensayo de 10 mL con tapa de PTFE, repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar (Fig. 1). Prepare un tubo sin muestra (blanco de reactivos).
- Agregue 1200  $\mu$ L de etanol, luego 325  $\mu$ L de KOH 30% y 100  $\mu$ L de pirogalol 75 g/L.
- Hidrolize las muestras a 80 °C por 2 h y deje enfriar a temperatura ambiente cuando finalice.

### EXTRACCIÓN

- Agregue 1 mL de agua ultrapura al hidrolizado y agite en un vórtex.
- Añada 5 mL de hexano-etil acetato (8:2) a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivos.
- Agite en un vórtex por 1 min.

- Centrifugue las muestras a 4 °C y 3500 rpm por 20 min.
- Separe el sobrenadante en otro tubo y añádale 5 mL de metanol-agua 1:1.
- Agite en un vórtex por 1 min.
- Separe el sobrenadante en un vial, añada 10 µL de BHT 20 g/L y evapórelo hasta sequedad con nitrógeno gas.
- Reconstituya con 2 mL de metanol (Ve) y filtre con el destilador de nylon de 0,22 µm en un vial antes de ser inyectados en el LC-MS (Fig. 2).

### CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se prepara a partir de una solución estándar de vitamina A de acuerdo a la Tabla 1.

### CONDICIONES DE HPLC

- Columna Acquity UPLC BEH C18 2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm con guardacolumna.
- Temperatura del horno de la columna de 40 °C.
- Temperatura del *autosampler* de 24 °C.
- Volumen de inyección de 5 µL.
- Fases móviles: A= Acetonitrilo-Agua 90:10 (v/v) y B = Metanol.
- Rampa de fase móvil (Tabla 2).
- Volumen gastado aproximado de fase móvil por muestra: 1,65 mL A y 1,95 mL B.
- Modo de ionización APCI positivo.
- Corriente corona de 15 µA.
- Temperatura de la fuente de 150 °C.
- Temperatura de desolvatación de 550 °C.
- Gas de desolvatación de 1000 L/h.
- Gas de colisión Argón a 3,5 x 10<sup>-3</sup> mbar.

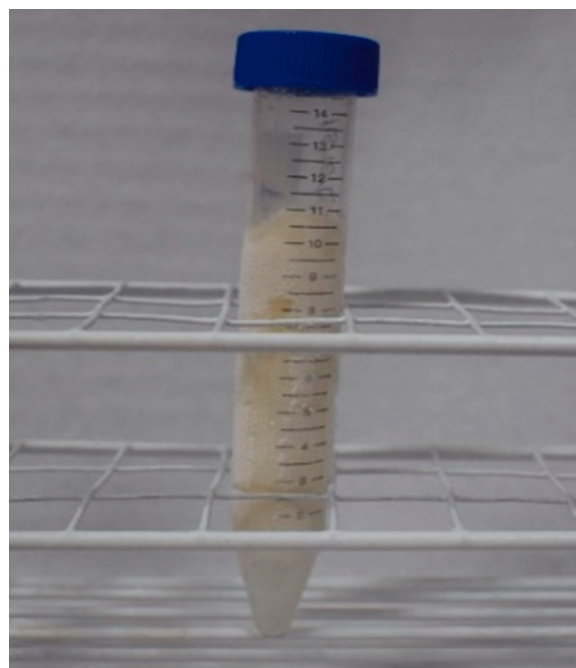


Figura 1.- Muestra de tejido



Figura 2.- UPLC-QTOF Xevo G2-XS Waters

- El cromatograma y espectro de masas típico del estándar de acetato de retinol (Vitamina A) se muestra en la figura 3.

Tabla 1.- Volúmenes de los reactivos para la curva de calibración

Nivel	Volumen de estándar de vitamina A de 1000 ng/mL (µL)	Volumen de agua ultrapura (µL)	Concentración final de vitamina A (µg/mL)
0	0	5000	0
1	50	4950	10
2	125	4875	25
3	250	4750	50
4	375	4625	75
5	500	4500	100

## PROCESAMIENTO DE DATOS

La concentración de vitamina A expresado como acetato de retinol en  $\mu\text{g/g}$ , se calcula mediante la fórmula

$$\mu\text{g vitamina A/g muestra} = \frac{C_{mi} * V_e}{P_s}$$

Donde:

$C_{mi}$  = Concentración de vitamina A de la curva de calibración (ng/mL)

$V_e$  = Volumen de extracción (mL)

$P_s$  = Masa del tejido (mg)

Tabla 2.- Rampa de fase móvil

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0,0	0,6	100	0
0,5	0,6	100	0
2,5	0,6	0	100
4,5	0,6	0	100
5,0	0,6	100	0
6,0	0,6	100	0

## CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 10%, en caso contrario se repite la prueba.

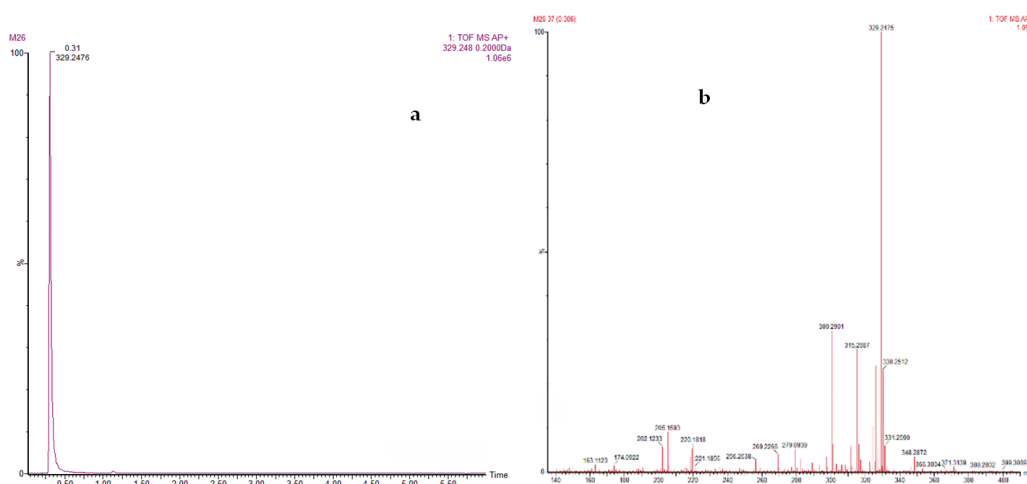


Figura 3.- Cromatograma típico del estándar de acetato de retinol (a) y el espectro de masas (b)

## 3. REFERENCIAS

- HERNÁNDEZ L H, FERNÁNDEZ M A, RUEDA P. 2010. Vitamin A: Requirements and Functions on Aquatic Organisms. 79-97.
- KYUNG KIM Y, QUADRO L. 2010. Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Retinol and Retinyl Esters in Mouse Serum and Tissues. In J. M. Walker, Methods in Molecular Biology. 652: 263-275. doi:10.1007/978-1-60327-325-1\_15
- MOKOLENSANG J F, YAMASAKI S, ONOUE Y. 2003. Utilization of Shochu Distillery By-products for Culturing the Common Carp *Cyprinus carpio* L. Journal of Biological Sciences. 3(5): 502-507. doi:10.3923/jbs.2003.502.507
- ROGERS B, DIEFFENBACHER A, HOLM J V. 2001. Lexicon of lipid nutrition. IUPAC Technical Report. 73(4): 685-744.
- WILLS M, HAMMOND G, CALTON L. 2019. Simultaneous analysis of Vitamin A and E in serum by UPLC-MS/MS for clinical research. Waters Corporation. 1-5.
- YOKOTA S, OSHIO S. 2017. A simple and robust quantitative analysis of retinol and retinyl palmitate using a liquid chromatographic isocratic method. Journal of food and drug analysis. 26(2): 1-8. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.002