

Separación e identificación del β -caroteno y sus isómeros *cis* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Fanny Carrillo de Padilla

Cátedra de Análisis de Alimentos. Facultad de Farmacia UCV. Caracas, Venezuela.

RESUMEN. Se estudió del β -caroteno y sus isómeros, el *13 cis* y *9 cis*, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La solución de β -caroteno al 1,26 mg/ml se sometió a un proceso de fotoisomerización en presencia de yodo como catalizador. Se realizó una cromatografía de absorción sobre $\text{Ca}(\text{OH})_2$, obteniéndose la separación en tres bandas por elución con una solución de 2 % acetona en hexano. Las diferentes fracciones se identifican por espectrofotometría UV/VIS y se les determinó el patrón de elución y los tiempos de retención por cromatografía líquida (HPLC), siendo la fase móvil 1 % acetona en hexano, obteniéndose tiempos de retención de 2,05, 2,4 y 2,8 min. para el *13 cis*, *todo-trans* y *9 cis* β -caroteno respectivamente. Se analizó una muestra de zanahorias enlatadas obteniéndose un resultado de 22,13 mg % de *todo-trans* β -caroteno. Se recomienda la aplicación del método a un mayor número de muestras, determinar la sensibilidad y la reproductibilidad. En vista de la dificultad de obtención de los isómeros *cis*, se recomienda la utilización de un patrón de referencia o un factor de respuesta para los cálculos.

SUMMARY. Separation and identification of β -carotene and its *cis* isomers by HPLC. The separation and identification by HPLC of the *cis* isomers of β -carotene was studied. A 1.26 mg/ml β -carotene solution previously isomerized with iodine as a catalyst, was eluted with 2 % acetone in hexane, from a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chromatographic column in three bands. The fractions were identified by spectrophotometry and the retention times of 2.05, 2.4 and 2.8 min for the *13 cis*, all-*trans*, and *9 cis* β -carotene isomers, determined by HPLC, with 1 % acetone in hexane as mobile phase. 22.13 mg % of all-*trans* β -carotene were found in a sample of canned carrots. It is recommended the analyses of a greater number of samples, the determination of the method's sensitivity, reproductibility, and the use of a standard of reference of a response factor for calculations.

INTRODUCCION

El análisis de la cantidad de vitamina A presente en los alimentos se ha basado hasta el presente en la asunción de que, de los diferentes precursores de la vitamina A, el que se encuentra en mayor cantidad en los alimentos es el *todo-trans* β -caroteno.

Las frutas y los vegetales no sólo contienen otros precursores de la vitamina A diferentes al *todo-trans* β -caroteno, que presentan una actividad biológica menor, sino que además pueden estar presentes estereo-isómeros de estos precursores, que son aun mucho menos activos biológicamente (1,2). Por lo tanto, para determinar en forma exacta la cantidad de vitamina A presente en los alimentos, los diferentes carotenoides activos y sus respectivos isómeros deben separarse, identificarse, medirse cuantitativamente y luego calcular la actividad biológica de cada uno de ellos.

El análisis de los carotenos por procedimientos físico-químicos es rápido y preciso; siendo la espectroscopia de absorción la técnica más comúnmente empleada, la cual aprovecha el sistema de 11 dobles enlaces conjugados presente en la molécula del *todo-trans* β -caroteno, el cual confiere a la molécula del *todo-trans* β -caroteno un amplio espectro de absorción con una absorbancia máxima a 450 nm en hexano. Cuando se usa esta técnica los resultados se expresan como β -caroteno total y este procedimiento significa una sobre estimación de la actividad biológica de una mezcla de isómeros.

La técnica más eficaz para separar los diferentes isómeros del β -caroteno es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica ha sido usada en la separación de los carotenos tanto en fase normal como reversa. sin embargo la fase normal no permite la

separación de los isómeros de posición como el ∞ y β caroteno (3-9), mientras que si se logra en fase reversa (10-16). Los estereo isómeros del *todo-trans* β -caroteno han sido separados usando una columna de alúmina, a 20 °C y n-hexano con un contenido de agua rigurosamente controlado como fase móvil (17), y a temperatura ambiente en una columna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, siendo la fase móvil una mezcla de acetona y n-hexano (18), así mismo en fase reversa (15-16) en columna C18 mantenida a una temperatura de 38 °C con una fase móvil de metanol: acetonitrilo:agua (88:9:3 v/v/v).

El presente estudio se hizo con el objeto de obtener la separación de los isómeros del *todo-trans* β -caroteno más importantes que son el *13 cis* y el *9 cis*, identificarlos por espectroscopia de absorción, adaptando el método de Tsukida et al (18) a las condiciones existentes, pues no existen en el mercado columnas empacadas con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con el tamaño de partícula adecuado.

MATERIALES Y METODOS

El β -caroteno fue suministrado por Hoffman La Roche Nuttley New Jersey. USA y β -caroteno Tipo IV (Sigma Cooperation USA). Hidróxido de calcio obtenido de Fisher Scientific, tamizado para producir partículas de tamaño entre 0 a 25 μm , y partículas de 0-10 μm para su uso en los estudios preliminares y en columnas preparativa y analítica respectivamente. Los demás reactivos y solventes fueron grado analítico con excepción de los usados en la cromatografía líquida de alta resolución, que fueron grado HPLC, filtrados a través de una membrana de 0.45 μm . y degasificados por agitación al vacío.

Purificación del β -caroteno: El β -caroteno (Roche) utilizado fue sometido a un proceso de purificación por recristalización (19). Los cristales se someten a observación microscópica, se les determina el punto de fusión en tubo capilar sellado al vacío en un Electrothermal Melting Point Apparatus. y el espectro de absorción en espectrofotómetro Beckman, calculándose luego la absorptividad.

Obtención de los isómeros: La solución del β -caroteno al 0.1 mg/ml o 0.2 mg/ml en hexano conteniendo una concentración de yodo equivalente al 2 % del peso del β -caroteno, se somete a la acción de una lámpara de luz de día en la cámara del Chromato-Vue durante 1 hora.

Separación e identificación de los isómeros *cis-trans* β -caroteno.

Cromatografía de absorción: Se empacó una columna de vidrio de 25x2.5 cm con placa porosa, con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, preparando una suspensión en hexano; se ajustó la velocidad de flujo a 1.5 ml/min. Se colocaron 4 ml de la solución de *todo-trans* β -caroteno 1.26 mg/ml, previamente sometida a fotoisomerización y se eluye con solución al 2 % de acetona en hexano. Se obtuvo una separación del pigmento en tres bandas que se recogieron en balones separados, mantenidos en baño de hielo y bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la degradación por acción de la temperatura y del oxígeno del aire. Se evapora al vacío y el residuo se retomó con 10 ml de hexano y se determina el espectro de absorción.

Espectrofotometría de Absorción: Se prepararon soluciones al 0.325 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en hexano del β -caroteno impuro y del purificado, y se les determinó el espectro de absorción entre 280-530 nm en el espectrofotómetro Beckman con las siguientes condiciones: slit 0.5mm, velocidad de barrido 50 nm/min. Esto se hizo con la finalidad de observar si la purificación había sido eficiente. Este mismo análisis se hizo para determinar el espectro de absorción de las diferentes bandas obtenidas en la cromatografía de absorción, para determinar las diferencias entre ellas.

Cromatografía Líquida HPLC.

Cromatografía preparativa: Cromatógrafo líquido compuesto por un detector UV/VIS (Spectro Monitor 1 unidad óptica y de control Laboratory Data Control. Division of Milton Roy Co Modelo 1201), trabajando a 440 nm. con una celda de 14 μl y un registrador Omni Scribe Fisher Recordall Series 5000 de Houston Instruments con columna de 25x1 cm, empacada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (10 μ), fase móvil 1 % acetona en hexano, velocidad de flujo de 3 ml/min. Se inyectaron 0.9 ml de la solución de β -caroteno al 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sometido a la fotoisomerización.

Cromatografía analítica: Cromatógrafo líquido: Perkin Elmer Series 2 Liquid Chromatograph con detector UV/VIS LC 75 de longitud de onda variable 190-600 nm, inyector Rheodyne modelo 7105 con un espiral de 175 μl , registrador Solttec con 10 mv de entrada, velocidad del papel de 2 pul/hr, con columna de 250x3.9 mm, empacada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, velocidad de flujo de 1 ml/min. siendo el resto de las condiciones iguales que para la columna preparativa. Se inyectaron 0.1 ml de la solución anterior.

Curva patrón: se preparó una solución de *todo-trans* β -caroteno (Sigma) en hexano al 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y diluciones que contenían 0,1,2,4,6

y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se inyectaron 10 μl por cuadruplicado. Se graficó área y altura de los picos obtenidos contra concentración y se aplicó regresión lineal.

Análisis de muestra: Se extrajeron 250 g de zanahorias enlatadas con varias porciones de 25 ml de acetona en una licuadora, hasta que los extractos resultaron incoloros. La separación de los carotenos y ésteres de los carotenoides de las xantofilas polares se realizó por partición en éter de petróleo y metanol al 90 % en agua. La fase orgánica contienen los carotenos y ésteres de los carotenoides además de las clorofilas (a) y (b). Para remover la clorofila y el material insaponificable se realizó una saponificación en frío durante la noche y bajo atmósfera de nitrógeno, con KOH metanólico al 10 % de donde se extraen los carotenos con éter, los extractos etéreos se lavaron con varias porciones de 20 ml de solución de NaCl al 5 % hasta eliminar la alcalinidad. El éter se evapora al vacío y el residuo se disolvió en hexano en un balón 25 ml. De esta solución se tomó una alícuota de 2,5 ml, se llevó a 10 ml con hexano, y se inyectaron 10 μl (triplicado) en el cromatógrafo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación del *todo-trans* β -caroteno: Los cristales obtenidos observados bajo el microscopio son comparables a los reportados por Jones y Bickoff (20), con punto de fusión 183-184 °C. De los espectros de absorción se obtuvieron valores de máximos de absorción (478-450) comparables con los existentes en la literatura consultada.

El coeficiente de absorción específico (a) calculado fue de 252 a 450 nm comparable también con los valores publicados de 251 a 451 nm (19). Los espectros de absorción de las fracciones provenientes de la cromatografía de adsorción son similares a los publicados (21).

Separación e identificación de los isómeros *cis* del β -caroteno: Los máximos de absorción (Tabla 1), son similares a los publicados. Estos resultados permiten la identificación de las fracciones como los isómeros 13, *todo-trans* y 9 *cis*, los cuales eluyeron en este mismo orden, ratificándose lo señalado por Zechmeister y Polgar (22).

TABLA 1

Comparación de las características de absorción (λ_{max}) del *todo-trans* β -caroteno y sus principales isómeros en diferentes solventes

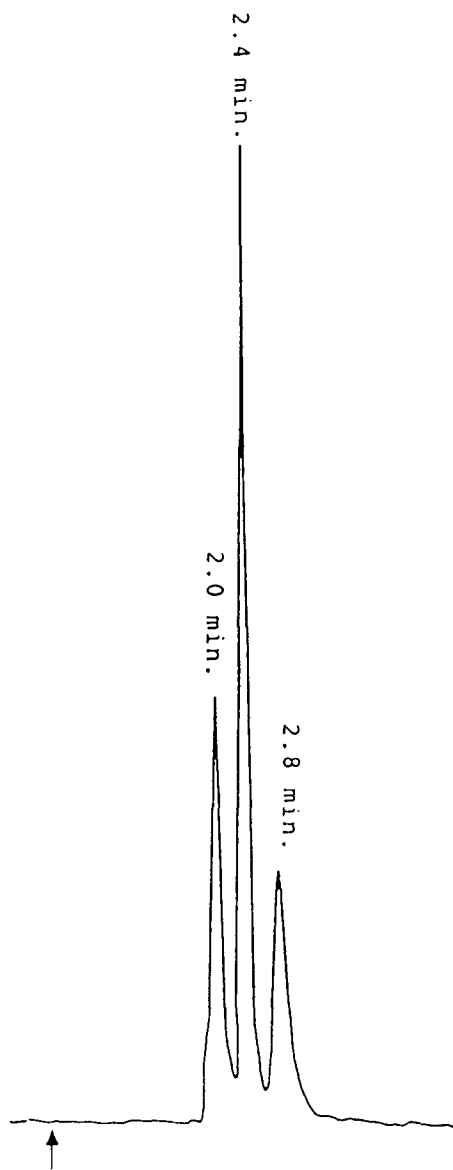
Isómero	Bickoff et al 1948 (a)nm	Valores obtenidos (c)nm	Zechmeister Polgar 1942(b)nm	Tsukida 1983(c) nm
<i>Todo-trans</i>	479-451	477-450	486-454	478-450
13 <i>cis</i>	470-443	468-443	475-444	467-442
9 <i>cis</i>	474-447	473-445	481-450	473-445

(a)= Isoctano (b)=Eter etílico (c)=Hexano

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Los tiempos de retención de una solución al 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *todo-trans* β -caroteno y de las fracciones identificadas por espectrofotometría como 13 y 9 *cis* β -caroteno, fueron determinados y se corresponden con los de la Fig. 1, con los picos característicos del 13 *cis*, *todo-trans* y *cis* β -caroteno y sus tiempos de retención de 2.0; 2.4; y 2.8 min., respectivamente.

FIGURA 1

Cromatograma de *all-trans* β -caroteno, sometido a fotoisomerización. Columna 250x3.9 mm $\text{Ca}(\text{OH})_2$, fase móvil: 1% acetona/hexano, flujo: 1 ml/min, Atn. 32, λ : 450 nm, conc. 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.1 ml)



Este estudio preliminar se realizó con la finalidad de determinar si los tiempos de retención o patrón de elución, en la columna de HPLC, se correspondían con la elución de las bandas de la cromatografía de adsorción en columna abierta (22,23).

En vista de la imposibilidad de obtener en el mercado los patrones de los isómeros 9 y 13 *cis-trans* β -caroteno, se llevó a cabo una cromatografía preparativa, de manera de obtener suficiente cantidad de dichos isómeros, en forma pura y plenamente identificados, para su utilización como patrones en la cuantificación de estos isómeros.

Tomando en consideración los estudios preliminares realizados, y la información de que cuando el *todo-trans* β -caroteno se degrada,

los principales isómeros formados son el 13 y 9 *cis*, representando cada uno de ellos aproximadamente el 20 % del total; se asume que en el cromatograma los picos con más o menos un 20 % del total son los isómeros mencionados. Las fracciones correspondientes fueron recogidas después de varias inyecciones, en balones fondo redondo purgados con argón para desalojar el oxígeno. El solvente se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en hexano para su análisis por fotometría de masas y espectrofotometría UV/VIS.

Espectrometría de masas: De acuerdo con el análisis las tres fracciones tienen un ion molecular (M^+ de 536.43 con un fragmento de m/z 444 correspondiente al $M-92$ del tolueno; siendo el PM calculado del β -caroteno de 536.89 g. Esta información solo permite afirmar que las fracciones son miembros de los isómeros *cis-trans* del β -caroteno.

Espectrofotometría UV/VIS: Los residuos obtenidos después de la evaporación se disolvieron en hexano y se les determinó el espectro de absorción en el Cary 2200. Determinándose las longitudes de onda de máxima absorción (Tabla 2), las cuales se corresponden con los datos de la literatura para los isómeros del β -caroteno.

TABLA 2
Máximos de absorción del β -caroteno y sus isómeros *cis* en hexano

Isómero	Fracción #	λ_{max} (nm)	Pico (<i>cis</i>)
<i>Todo-trans</i>	9	478 450 424	340
13 <i>cis</i>	6	467 442 422	336
9 <i>cis</i>	10	472 444 420	338
15 <i>cis</i>		462 436 418	336

Con estos resultados se corroboran el patrón de elución así como la identidad de las diferentes fracciones como el 13 *cis*, *todo-trans* y el 9 *cis* β -caroteno.

En la Fig. 2 se observa que todos los isómeros tienen una desviación hacia longitudes de onda menores a las del *todo-trans* β -caroteno, tal como lo han informado diferentes investigadores. Por otra parte, se evidencia la presencia del llamado pico *cis* en el área de 335-340 nm, el cual es más alto a medida que la longitud de la cadena se reduce por el pliegue de la molécula, como consecuencia del cambio en la configuración del doble enlace entre los carbonos 13-14 ó 9-10; siendo la mayor altura para el isómero 15 *cis* β -caroteno.

Curva patrón: En la Fig. 3 se observan las curvas patrón preparadas utilizando el β -caroteno Sigma tipo IV, graficando altura o área de los picos contra la concentración, aplicando regresión se obtuvo la pendiente, el punto de intersección y el factor de correlación r .

Análisis de Muestra: En el cromatograma de la Fig. 4 los tiempos de retención, corresponden al 13 *cis*, *todo-trans* y 9 *cis* β -caroteno respectivamente. Los cálculos dan como resultado que la muestra de zanahoria contiene 22,13 mg % de *todo-trans* β -caroteno.

FIGURA 2
Espectros de absorción del β -caroteno y sus isómeros

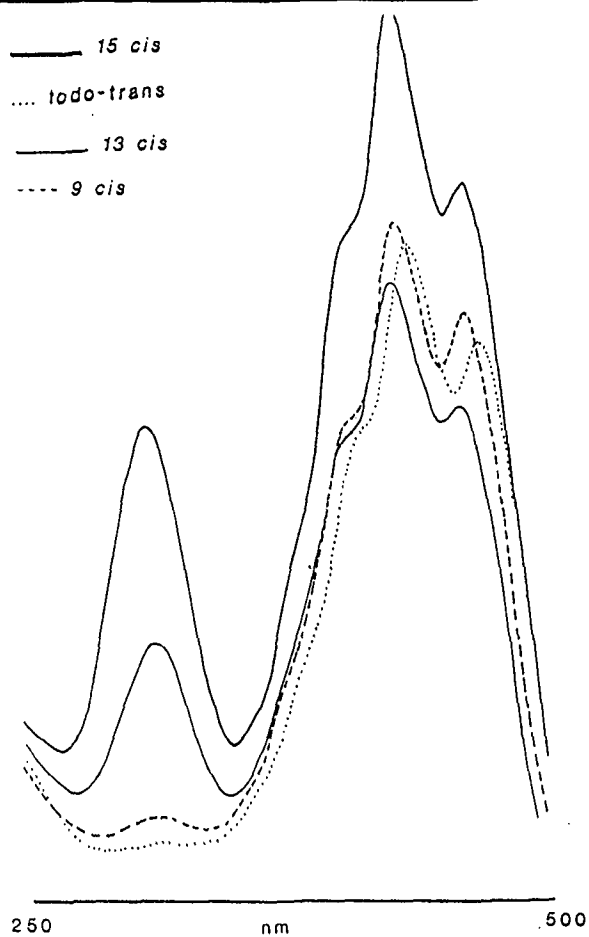


FIGURA 3
Curvas patrón de *todo-trans* β -caroteno

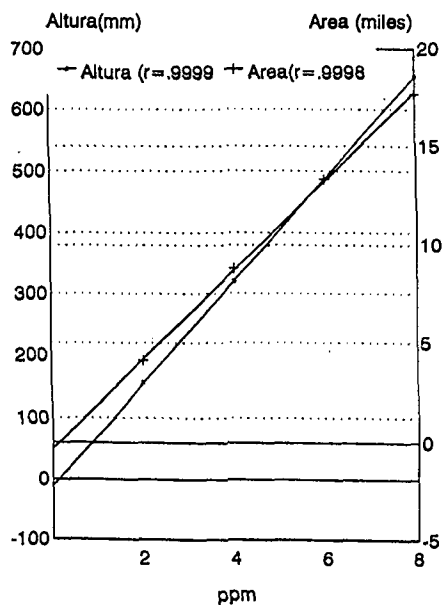
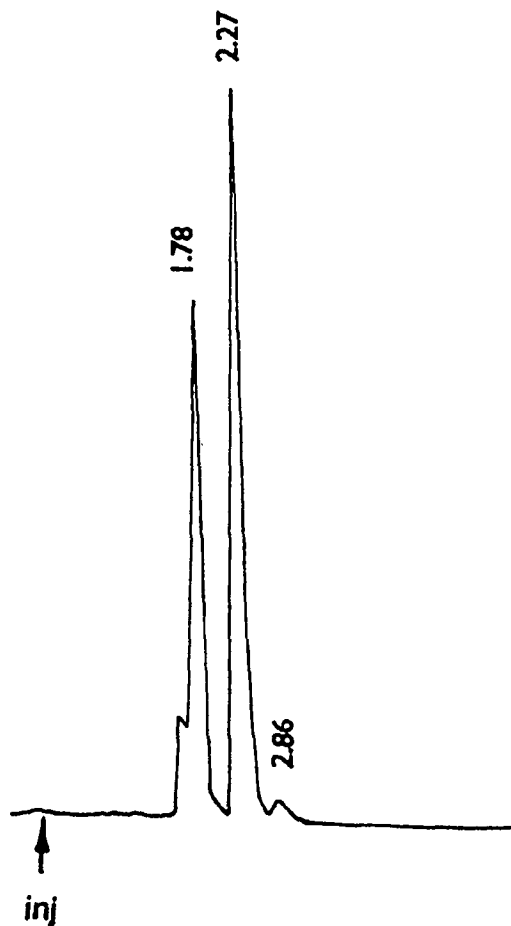


FIGURA 4

Cromatograma de la muestra de zanahoria. Columna 250x3.9 mm $\text{Ca}(\text{OH})_2$, λ : 450 nm, fase móvil: 1% acetona/hexano, Atn. 32, flujo: 1 ml/min, 10 μl muestra



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El patrón de elución de los diferentes isómeros del β -caroteno es 13 *cis*, *todo-trans* y 9 *cis* β -caroteno; dependiendo los tiempos de retención del tipo de columna usada (analítica o preparativa).
2. Los espectros de absorción UV/VIS, así como el patrón de fraccionamiento presentan características definidas para cada isómero en estudio, permitiendo de esta manera su identificación.
3. Se recomienda realizar análisis de mayor número de muestras, determinar la sensibilidad del método, y la utilización de factor de respuesta para los cálculos o la búsqueda de un patrón de referencia, en vista de la dificultad en la obtención de los isómeros 13 y 9 *cis* comercialmente en forma estable.
4. Este método por cromatografía líquida (HPLC) podría ser utilizado para calcular con mayor precisión el contenido de vitamina A de aquellos productos alimenticios que sean fuentes de β -caroteno, evitándose de esta manera la sobreestimación del contenido de vitamina A presente en estos productos, lo cual es

de suma importancia para la elaboración de las Tablas de Composición de Alimentos.

REFERENCIAS

1. Bauernfeind JC. «Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds». *J. Agric. Food Chem* 20:456, 1972.
2. Bauernfeind JC., Adams CR., Marusich WL. In «Carotenoids as colorants and vitamin A precursor». Ed. by JC Bauernfeind. Academic Press New York. 1981.
3. Fiksdahl A., Mortensen JT. and Liaaen-Jensen S. High pressure liquid chromatography of carotenoids. *J. Chromatogr.* 157:111-117, 1978.
4. Stewart I. and Wheaton TA. Continuous flow separation of carotenoids by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 55:325-336, 1971.
5. Stewart I. «Provitamin A and carotenoid content of citrus juices». *J. Agric. Food Chem.* 21(5):1132-1137, 1977.
6. Reeder SK., and Park G.L. «A specific method for the determination of provitamin A carotenoids in orange juice». *J.A.O.A.C.* 55(3):595, 1975.
7. Iriyama K., Yoshiura M. and Shirati M. «Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using high-performance liquid chromatography». *J. Chromatogr.* 154:302-305, 1978.
8. Fisher JF. and Rouseff RL. «Solid phase extraction and HPLC determination of β -cryptoxanthin and α and β -carotene in orange juice». *J. Agric. Food Chem.* 34:985-989, 1986.
9. Khachik F., Beecher GR. and Whittaker NF. «Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34:603-616, 1986.
10. Zakaria M., Simpson K., Brown PR., Krstulovic A. Use of reverse phase high performance liquid chromatography analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes». *J. Chromatogr.* 176:109-117, 1979.
11. Tangney CC. «Individual carotenoid determinations in human plasma by high performance liquid chromatography». *J. Liq. Chromatogr.* 7(13):2611-2630, 1984.
12. Quackenbush FW. and Sanllidge RL. «Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantification of provitamins A». *J.A.O.A.C.* 69(5):767-772, 1986.
13. Hart DJ. and Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54:101-110, 1995.
14. Nells HJF. and De Leenheer AP. «Isocratic non aqueous reverse phase liquid chromatography of carotenoids». *Anal. Chem.* 55:270-275, 1983.
15. Wagner LA. and Warthensén JJ. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *J. Food Sci.* 60(5):1048-1053, 1995.
16. Bryant JD., McCord JD., Unlu LK. and Erdman J.W. Isolation and partial characterization of α and β -carotene containing carotenoprotein from carrot (*Daucus carota* L.) root chromoplasts. *J. Agric. Food Chem.* 40:545-549, 1992.
17. Vechi VM., Englert G., Maurer R. and Meduna V. «Separation and characterization of the cis-isomers of β -carotene». *Helv. Chim. Acta* 64:2746-2758, 1981.
18. Tsukida K., Saiki K., Takii T. and Koyama Y. «Separation and determination of cis-trans β -carotenes by high-performance liquid chromatography». *J. Chromatogr.* 245:359-364, 1982.
19. Bickoff EM., White LM, Bevenue A. and Williams KT. «Isolation and spectrophotometric characterization of four carotene isomers». *J.A.O.A.C.* 31(3):632-646, 1948.
20. Jones FT. and Bickoff EM. Crystalline characteristics of four carotenoids. *J.A.O.A.C.* 31(4):776-781, 1948.
21. Moss GP. and Weedon BCL. Chemistry of carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.* TW. Goodwin 2nd. Ed. Vol. 2 p.210. Academic Press London N.M., 1976.
22. Zechmeister L. and Polgar A. «Cis-trans isomerization and spectral characteristics of carotenoids and some related compounds». *J. Am. Chem. Soc.* 65:1522-1528, 1943.
23. Polgar A. and Zechmeister L. «Isomerization of β -carotene. Isolation of a stereoisomer with increased adsorption affinity». *J. Am. Chem. Soc.* 64:1856-1861, 1942.

Recibido: 02-08-1995

Aceptado: 15-02-1996