

## Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de niveles de vitamina A en leche materna. Su aplicación a una población rural de Argentina

Laura B. López, Andrea V. Baroni, Viviana G. Rodríguez, Carola B. Greco, Sara Macías de Costa, Silvia Rodríguez de Pece y Patricia Ronayne de Ferrer

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Centro de Investigaciones Apícolas (CEDIA).  
Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina

**RESUMEN.** Se desarrolló y validó una metodología para la cuantificación de vitamina A en leche humana. Se determinaron los niveles en 223 muestras correspondientes a los meses 5, 6 y 7 posparto, obtenidas en la provincia de Santiago del Estero. Las muestras (500 µL) se saponificaron con hidróxido de potasio/ etanol, se extrajeron con hexano, se llevaron a sequedad y se reconstituyeron con metanol. Se utilizó una columna RP-C18, fase móvil metanol /agua (91:9 v/v) y detector de fluorescencia ( $\lambda$  excitación 330 nm y  $\lambda$  emisión 470 nm) para la separación y cuantificación de vitamina A. Los parámetros analíticos de linealidad ( $r^2$ : 0,9995), límites de detección (0,010 µg/mL) y de cuantificación (0,025 µg/mL), precisión del método (desvío estándar relativo, RSD = 9,0% en el día y RSD = 8,9% entre días) y exactitud (recuperación = 83,8%) demuestran que el método desarrollado permite cuantificar la vitamina A en forma eficiente. Los valores promedios  $\pm$  desvío estándar (DE) obtenidos en las muestras analizadas fueron  $0,60 \pm 0,32$ ;  $0,65 \pm 0,33$  y  $0,61 \pm 0,26$  µg/mL para 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> mes, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los tres meses analizados y los valores hallados fueron similares a los de bibliografía. El 19,3% del total de la población estudiada presentó niveles inferiores a 0,40 µg/mL, lo que supone un riesgo para los niños de ese grupo, ya que son necesarios al menos 0,50 µg/mL para cubrir los requerimientos diarios del bebé.

**Palabras clave:** HPLC, validación, retinol, leche materna.

**SUMMARY.** Development and validation of an HPLC method for the quantification of vitamin A in human milk. Its application to a rural population in Argentina. A methodology for the quantification of vitamin A in human milk was developed and validated. Vitamin A levels were assessed in 223 samples corresponding to the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> postpartum months, obtained in the province of Santiago del Estero, Argentina. The samples (500 µL) were saponified with potassium hydroxide/ ethanol, extracted with hexane, evaporated to dryness and reconstituted with methanol. A column RP-C18, a mobile phase methanol /water (91:9 v/v) and a fluorescence detector ( $\lambda$  excitation 330 nm and  $\lambda$  emission 470 nm) were used for the separation and quantification of vitamin A. The analytical parameters of linearity ( $r^2$ : 0.9995), detection (0.010 µg/mL) and quantification (0.025 µg/mL) limits, precision of the method (relative standard deviation, RSD = 9.0% within a day and RSD = 8.9% among days) and accuracy (recovery = 83.8%) demonstrate that the developed method allows the quantification of vitamin A in an efficient way. The mean values  $\pm$  standard deviation (SD) obtained for the analyzed samples were  $0.60 \pm 0.32$ ;  $0.65 \pm 0.33$  and  $0.61 \pm 0.26$  µg/mL for the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> postpartum months, respectively. There were no significant differences among the three months studied and the values found were similar to those in the literature. Considering the whole population under study, 19.3% showed vitamin A levels less than 0.40 µg/mL, which represents a risk to the children in this group since at least 0.50 µg/mL are necessary to meet the infant daily needs.

**Key words:** HPLC, validation-retinol, human milk.

### INTRODUCCION

La lactancia es la alimentación óptima del neonato, pero han surgido interrogantes sobre posibles cambios en los niveles de algunos nutrientes, debido a la dieta. Es sabido que mujeres deficientes en vitamina A presentan bajos niveles de retinol lácteo. Esta situación incidiría negativamente en el estado nutricional del lactante con respecto a esta vitamina y podría relacionarse con una mayor morbi-mortalidad. De acuerdo

con los datos hallados en bibliografía las poblaciones con suficiente vitamina A alcanzan concentraciones en la leche entre 0,50 y 0,70 µg/mL (1). Se considera que concentraciones por debajo de 0,40 µg/mL son típicas de poblaciones deficientes (2-4).

Hasta el momento, la única forma de evaluar si la cantidad de vitamina A que los niños ingieren es la adecuada, es a través de la cuantificación de dicho nutriente en la leche materna, ya que no existe una buena correlación entre los niveles de

vitamina A en suero materno y los niveles lácteos (5).

Para la cuantificación de retinol en muestras de leche y fórmulas infantiles a base de leche es necesario realizar una saponificación de la muestra, una extracción de dicha vitamina con un solvente orgánico y un análisis posterior por HPLC utilizando un detector UV/visible (6-9). Sin embargo, cuando la muestra a analizar es leche materna, en general se dispone de un pequeño volumen de muestra. Esto hace necesario contar con una técnica muy sensible. Es por este motivo que en el presente trabajo se desarrolló y validó un método para la determinación de vitamina A en leche materna adaptando la técnica de saponificación y extracción a una pequeña cantidad de muestra (500  $\mu$ L) y realizando la detección por fluorescencia ya que permite obtener una sensibilidad mucho mayor.

Con esta metodología se analizaron muestras de leche materna correspondientes a los meses 5, 6 y 7 posparto de madres de niños nacidos a término de una población rural de bajos recursos de Argentina, con el objetivo de conocer los niveles de vitamina A láctea de este grupo poblacional.

## MATERIALES Y METODOS

### Aparatos

El sistema utilizado consistió en una bomba 515 HPLC Pump (Waters) con inyector Rheodyne (loop de 50  $\mu$ L), un detector de fluorescencia (474 Scanning Fluorescence Detector, Waters) y una columna ET 250/8/4 Nucleosil® 10 C<sub>18</sub> (Macherey Nagel). Se utilizó como fase móvil metanol:agua (91:9, v/v) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a  $\lambda$  excitación 330 nm y  $\lambda$  emisión 470 nm. La adquisición de datos se realizó con el programa Chromatography Station CSW de DataApex Ltd. Se trabajó con solventes de calidad HPLC (J.T. Baker) y agua ultrapura (EASYpure RF, Barnstead).

### Muestras

En primera instancia, se trabajó con muestras provenientes de mujeres sanas de clase media con niveles normales de vitamina A, tomadas alrededor del 1er mes posparto, para realizar los ensayos de validación.

Posteriormente, se analizaron 223 muestras de leche materna, correspondientes a madres de niños nacidos a término y que asistían al Hospital Distrital de Forres, Santiago del Estero, Argentina, para sus visitas periódicas de control. En todos los casos se les solicitó su consentimiento para la realización del presente estudio. Las muestras correspondieron a los meses 5 (n= 75), 6 (n= 80) y 7 (n= 68) posparto.

Las muestras de leche se obtuvieron por extracción manual de un seno, vaciándolo completamente. La leche se colocó en frascos de plástico y se conservó a -20°C y al abrigo de la luz hasta su procesamiento. Todas las recolecciones se efectuaron entre las 10 y 12 horas.

### Preparación del estándar

Se preparó una solución madre de retinol disolviendo una alícuota de todo- trans retinol (Sigma – Aldrich) en metanol calidad HPLC (J. T. Baker). Se realizaron diluciones con el mismo solvente hasta obtener valores de absorbancia entre 0,3 y 0,5 a 325 nm. Se calculó la concentración de esta solución utilizando la Ley de Lambert - Beer y se diluyó, aproximadamente a 0,5  $\mu$ g/mL, para realizar la inyección cromatográfica.

### Preparación de las muestras

#### Saponificación

Se colocaron exactamente 500  $\mu$ L de leche materna en erlenmeyer color caramelo, se agregaron 2 g de hidróxido de potasio p.a., 12 mL de etanol y 120 mg de hidroquinona p.a. Se colocó un tubo refrigerante y se calentó en baño de agua a 70 - 80°C durante 45 minutos. Inmediatamente, sin enfriar, se realizó la extracción.

#### Extracción

Se trasladó la muestra a una ampolla de decantación color caramelo con 6 mL de solución saturada de cloruro de sodio p.a. Se realizaron dos extracciones con 15 mL de hexano p.a. Ambas fases de hexano se recogieron en un balón, previa filtración por papel de filtro Whatman N° 2 que contenía sulfato de sodio anhidro p.a. y se evaporaron en rotavapor (temperatura no mayor de 40°C) hasta sequedad. Inmediatamente antes de la inyección se reconstituyó la vitamina A con 1,0 mL de metanol HPLC.

Para el blanco de reactivos se realizó el proceso de saponificación y de extracción en ausencia de leche materna.

Todas las muestras fueron procesadas por duplicado y cada replicado se inyectó dos veces.

### Estudio estadístico

Para la evaluación estadística de los resultados se aplicó el test de ANOVA. El nivel de significación se fijó en un 5%. Se utilizó el programa InStat versión 3.01.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Desarrollo y validación del método analítico

Para el desarrollo del método se realizó una búsqueda bibliográfica acerca del contenido promedio de vitamina A en leche materna (5, 10) y se estudió la respuesta del estándar cuando se utiliza un detector de fluorescencia. Se estableció que, debido a la alta sensibilidad de esta metodología, es posible trabajar con 500  $\mu$ L de leche materna, a los fines de cuantificar vitamina A, aún en muestras deficientes, cuando la muestra es saponificada, extraída y posteriormente reconstituida con 1,0 mL de metanol.

Se optimizó la resolución de la separación cromatográfica trabajando con muestras reales. Para ello se aumentó progresivamente la proporción de agua en la fase móvil, hasta 9%, sin alterar el factor de asimetría del pico de análisis.

La saponificación de las muestras se realizó según la metodología descrita por Escrivá y col. (8) reemplazando la utilización de ácido ascórbico por hidroquinona como antioxidante.

Para establecer la linealidad se realizaron 6 diluciones del estándar y cada una se inyectó tres veces. Se demostró respuesta lineal en el rango de 0,05 – 1,50 µg/mL (n= 18), con un coeficiente de correlación de 0,9995; ecuación de la recta  $y = 2029x + 14,6$  y un error estándar de 0,0139.

La determinación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) fue realizada en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y a la pendiente de la curva de linealidad, obteniéndose valores de 0,010 µg/mL para el LD y de 0,025 µg/mL para el LC.

Para evaluar la exactitud del método se determinó el nivel basal de vitamina en una muestra proveniente de una mujer sana (n=6), luego se realizó la adición de vitamina A en cantidades correspondientes al 50%, 100% y 125% del nivel basal. Las muestras de cada nivel se procesaron por triplicado. El porcentaje de recuperación promedio fue  $83,8 \pm 6,9$  (n= 9) (Tabla 1).

**TABLA 1**  
Recuperación de vitamina A en leche materna correspondiente a 50%, 100% y 125% de adición respecto del nivel basal de la muestra

	Nivel 50 %	Nivel 100 %	Nivel 125 %	Promedio ± DE
Recuperación (%) <sup>a</sup> ± DE	80,7 ± 8,7	91,6 ± 2,7	79,0 ± 5,3	83,8 ± 6,9

<sup>a</sup> n= 3

Se evaluó la precisión como el desvío estándar relativo (RSD) en el día y entre días. Para ello se realizaron 5 determinaciones de una muestra durante tres días consecutivos. Cada día se trabajó con una alícuota distinta de la misma muestra mantenida a -20°C y al abrigo de la luz. Para el ensayo en el día (n= 5) se obtuvo un RSD de 9,0% y para el ensayo entre días (n= 15) un RSD de 8,9% (Tabla 2).

Los resultados obtenidos para la exactitud y precisión del método analítico responden a las tolerancias recomendadas para este tipo de muestra y para esta concentración de analito (11).

### Cuantificación de vitamina A en muestras de una población rural

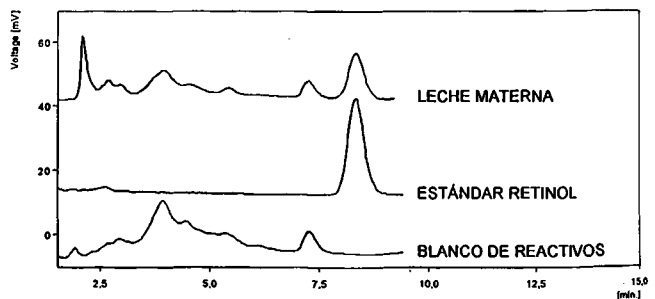
En la Figura 1 se observan, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a blanco de reactivos, estándar de vitamina A y leche materna.

**TABLA 2**  
Precisión del método analítico en el día y entre días

	Promedio (µg / mL)	DE (µg / mL)	RSD (%)
En el día <sup>a</sup>	0,598	0,054	9,0
Entre días <sup>b</sup>	0,601	0,054	8,9

<sup>a</sup> n=5, <sup>b</sup> n=15

**FIGURA 1**  
Cromatogramas correspondientes a blanco de reactivos, estándar de retinol (0,47 µg / mL) y leche materna. Las condiciones cromatográficas se describen en Materiales y Métodos



En la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a las 223 muestras analizadas. No se observaron diferencias significativas en el contenido de vitamina A entre los tres meses analizados. Los valores hallados fueron similares a los de bibliografía (1), los cuales indican que durante los primeros seis meses, en poblaciones con suficiente vitamina A, el rango de concentración promedio de retinol en leche materna es de 0,50 a 0,70 µg/mL. En el presente estudio, para los tres meses analizados el promedio fue de  $0,62 \pm 0,31$  µg/mL.

**TABLA 3**  
Concentraciones de vitamina A (µg/mL) en leches humanas correspondientes a 5°, 6° y 7° mes posparto

n	5° mes 75	6° mes 80	7° mes 68	p
Promedio ± DE	0,60 ± 0,32	0,65 ± 0,33	0,61 ± 0,26	n.s.
Rango	0,13 – 2,39	0,19 – 1,83	0,24 – 1,84	

Las ingestas recomendadas de vitamina A son de 400 µg/día para bebés de 0 – 6 meses y de 500 µg/día para bebés de 7-12 meses (10). Estas cifras se calcularon teniendo en cuenta que el nivel promedio de vitamina A en leche humana entre 0 y 12 meses es de 0,485 µg/mL. Para el cálculo del primer grupo (0 -6 meses) se tuvo en cuenta que la producción promedio de leche por día es de 780 mL. Para el segundo grupo (7 - 12 meses) se debe sumar el aporte estimado debido a la alimentación complementaria (244 µg/día) y el aporte correspondiente a la leche materna (promedio de producción 600 mL) equivalente a 291 µg/día (10). De acuerdo con estos datos consideramos que los bebés que sólo ingieren leche materna con valores inferiores a 0,40 µg/mL podrían no cubrir sus necesidades diarias de vitamina A.

Según nuestros resultados diecinueve muestras del 5º mes (n=75), catorce muestras del 6º mes (n= 80) y diez muestras del 7º mes (n= 68) presentaron valores de vitamina A por debajo de 0,40 µg/mL. Esto indica que el 19,3% de las muestras analizadas presentaron valores de vitamina A característicos de poblaciones deficientes.

### CONCLUSIONES

Los parámetros analíticos de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión del método para el ensayo en el día y para el ensayo entre días demuestran que el método desarrollado permite cuantificar, en forma eficiente, vitamina A en muestras de leche humana.

Un elevado porcentaje (80,7%) de las muestras correspondientes a una población rural de Santiago del Estero, Argentina, presentaron niveles de vitamina A suficientes para cubrir las necesidades metabólicas del bebé aún en el caso de ser amamantados en forma exclusiva. Sin embargo el 19,3% de la población presentó valores de vitamina A compatibles con poblaciones deficientes (menor a 0,4 µg/mL). Sería necesario evaluar si estos niños reciben alimentación complementaria suficiente para cubrir sus necesidades diarias de esta vitamina.

Dado que en la Argentina no se cuenta con información acerca de los niveles de vitamina A en leche materna, se propone esta metodología para realizar un estudio de los niveles de retinol en muestras de mujeres en distintas etapas de la lactancia, de diferentes estratos socioeconómicos y de diversas regiones del país a fin de establecer la adecuación con respecto a la vitamina A de los niños amamantados.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las autoridades del Hospital Distrital de Forres por su apoyo en la realización del presente trabajo.

### REFERENCIAS

1. World Health Organization. 1996. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. WHO/NUT/96 10. WHO, Geneva, Switzerland.
2. Muslimatun S, Schmidt MK, West CE, Schültink W, Hautvast JGAJ, Karyadi D. Weekly vitamin A and iron supplementation during pregnancy increases vitamin A concentration of breast milk but not iron status in Indonesian lactating women. *J Nutr.* 2001; 131:2664- 2669.
3. Ortega RM, Andrés P, Martínez RM, López- Sobaler AM. Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: Influence of concentration of vitamin A in breast milk. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66 (3): 564-8.
4. Gross R, Hansel H, Schültink W, Shrimpton R, Matulesi P, Gross G et al. Moderate zinc and vitamin A deficiency in breast milk of mothers from East- Jakarta. *Eur. J Clin Nutr.* 1998; 52 (12): 884- 90.
5. Jensen RG, Editor. Handbook of milk composition New York: Academic Press; 1995.
6. Chase WG. En: *Infant Formulas, Baby Foods, and Enteral Products.* AOAC International, 17 th ed. 2000; Chapter 50. p.1-3.
7. Ake M, Fabre H, Malan AK, Mandrou B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powder milk and local flour: A validation procedure. *J Chromat. A.* 1998; 826: 183 -189.
8. Escrivá A, Esteve MJ, Farré R, Frígola A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J Chromat. A.* 2002; 947: 313-318.
9. Tanumihardjo SA, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 2002; 43 (2): 350-5.
10. Food and Nutrition Board. Institute of medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington: National Academy Press; 2001.
11. Appendix E: Laboratory Quality Assurance. AOAC. Association of Official Analytical Chemist. *Official Methods of Analysis*, 17 th. ed; Horwitz W. Ed. Washington, DC. 2000.

Recibido: 07-11-2003

Aceptado: 16-05-2005