

# Determinación simultánea y sin extracción previa de vitaminas liposolubles en suplementos multi-vitamínicos por cromatografía líquida de alta resolución

De Zan, Ma. Mercedes; Culzoni, Ma. Julia; Robles, Juan C.

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. Cátedra de Química Analítica I. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, C.C 242. (3000) Santa Fe, Argentina. TEL/FAX (54) (342) 4575205. e-mail: mmdazan@fbcb.unl.edu.ar

**RESUMEN:** Las vitaminas son compuestos esenciales para el funcionamiento celular, por lo que es de suma importancia disponer de preparaciones que reemplacen su posible carencia en la dieta diaria. En el presente trabajo se desarrolla una metodología analítica que utiliza cromatografía líquida de alta resolución para la identificación y valoración simultánea de vitaminas liposolubles (A, E y D) en distintas preparaciones farmacéuticas y veterinarias. El pretratamiento de la muestra consiste simplemente en una dilución de la misma en la fase móvil y posterior filtración, en contraposición a lo sugerido por el método oficial USP24 que indica saponificación, extracción y preconcentración previas a la valoración individual de cada vitamina. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil de metanol:acetonitrilo:hexano (46,5:46,5:7), flujo 3ml/min, temperatura 40°C, y detección a 265nm. Se ha logrado mejorar significativamente la recuperación de las vitaminas y reducir el consumo de solventes y los tiempos de análisis respecto al método de la USP.

**Palabras claves:** vitaminas liposolubles, preparaciones farmacéuticas, HPLC.

**SUMMARY:** Simultaneous determination without previous extraction of liposoluble vitamins in multi-vitamin formulations by high-performance liquid chromatography. De Zan, Ma. Mercedes; Culzoni, Ma. Julia; Robles, Juan Carlos. Vitamins are essential compounds for cellular functions. It is very important to have available preparations to replace the possible lack of them in daily diet. In this sense multi-vitamin pharmaceuticals and veterinary preparations are becoming widely employed. In the present work, an analytical methodology that uses high-performance liquid chromatography to allow the simultaneous identification and quantification of liposoluble vitamins (A, E and D) in this kind of preparations is developed. The sample pre-treatment simply consists in a dilution and filtration, in contrast with the official method USP24 which involves saponification, extractions, and preconcentration steps prior to the determination of each vitamin. The chromatographic conditions were: mobile phase of methanol:acetonitrile:hexane (46,5:46,5:7) at 3ml/min, temperature at 40°C and Uvis detection at  $\lambda = 265$ . The method enhances the recoveries of vitamins, and reduces the use of solvents and analysis time, in reference to the USP method.

**Key words:** liposoluble-vitamins, pharmaceuticals, HPLC.

## Introducción

Se define como vitaminas a un grupo de sustancias orgánicas que, en cantidades mínimas, son vitales para la función de todas las células y deben figurar en la dieta de algunas especies (1). Estos compuestos pueden clasificarse en dos grandes grupos: las vitaminas solubles en agua y las vitaminas

liposolubles sobre las que se centra el presente trabajo y que incluye las vitaminas A, D y E. La vitamina A es esencial para el funcionamiento de la retina, necesaria para el crecimiento y la diferenciación del tejido epitelial y se requiere en el crecimiento del hueso, la reproducción y el desarrollo embrionario. Además aumenta la función inmunitaria, reduce las consecuencias de algunas enfermedades infecciosas y puede proteger contra la aparición de algunas enfermedades malignas(2). La vitamina E actúa como un antioxidante, evita la oxidación de constituyentes celulares esenciales y la formación de productos tóxicos de oxidación. Además aumenta la absorción intestinal de la

### Nota:

El trabajo fue parcialmente presentado en XXIV Congreso Argentino de Química. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, agosto de 2002

vitamina A(2). La vitamina D tiene, junto con la hormona paratiroidea, una importante función en la regulación de las cifras plasmáticas de calcio (2).

La mala alimentación, dietas deficientes o poco variadas conducen a una pobre ingesta vitamínica produciendo trastornos específicos a causa de las hipovitaminosis. Esto ha llevado al desarrollo por parte de la industria farmacéutica de suplementos vitamínicos para prevenir y/o curar estas deficiencias. Igualmente se han desarrollado productos de uso veterinario con el mismo fin. Actualmente la crisis socioeconómica por la que atraviesa nuestro país ha generado una creciente demanda de estas preparaciones sobretodo para uso pediátrico y en embarazadas. Esto genera la necesidad de disponer en el laboratorio de una metodología analítica que permita realizar el control de calidad de las mismas.

El método oficial, codificado por la USP 24 (3), establece la valoración de cada vitamina por separado haciendo previamente una serie de extracciones líquido-líquido, evaporaciones, redisoluciones y posterior cromatografía líquida. Para la vitamina E indica además realizar una saponificación de la muestra que consiste en calentamiento a reflujo por media hora con KOH en etanol, luego del cual se hace una serie de extracciones y lavados en medio alcalino y en medio ácido. Esta metodología, además de ser trabajosa, larga y consumir grandes cantidades de solventes, produce bajas recuperaciones de las vitaminas posiblemente por su prolongada exposición a la luz, el aire y el calor. Se sabe con certeza que las vitaminas liposolubles, sobretodo la A y la D son muy inestables siendo degradadas fácilmente por la luz, la temperatura y diversas reacciones químicas con la matriz en que se encuentran (4,5).

Hay varios trabajos publicados sobre determinación de vitaminas en alimentos (6-7), leche y sus derivados (8), grasas y tejido adiposo (9) en los que se utiliza métodos analíticos que emplean diversas extracciones, generalmente sólido-líquido con distintos solventes, seguidas de preconcentración, como un paso previo a la cuantificación. Igualmente se han publicado trabajos que proponen la determinación de vitaminas liposolubles y sus metabolitos en muestras clínicas (suero, orina), en las que siempre fue necesario un pretratamiento de la muestra incluyendo desproteínización, saponificación y extracciones líquido-líquido, para finalmente preconcentrarlas por

evaporación por calor o corriente de nitrógeno(10-12). P. Moreno y V. Salvadó (13), en un trabajo reciente, determinaron simultáneamente las vitaminas liposolubles en un producto multivitamínico de uso veterinario, luego de separarlas de la matriz y de las vitaminas hidrosolubles por una extracción en fase sólida. La muestra se disuelve en agua y se pasa por un cartucho de fase reversa que retiene las vitaminas liposolubles, y deja pasar las hidrosolubles. Luego de lavar con metanol-agua se seca el cartucho y se eluyen las vitaminas liposolubles con cloroforno para finalmente cuantificarlas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En el proceso analítico el pretratamiento de la muestra es un paso crítico. La manipulación consume tiempo y muchos recursos económicos, además de ser la principal causa de errores. Por lo tanto debe minimizarse tanto como sea posible (14).

En el presente trabajo se propone la determinación simultánea de tres de las vitaminas del grupo liposoluble en preparaciones farmacéuticas para uso humano y veterinario, con un pretratamiento de la muestra que consiste simplemente en una dilución de la misma, agitación y posterior filtración, para finalmente identificarlas y cuantificarlas simultáneamente por HPLC. La metodología es aplicable a distintos tipos de preparaciones farmacéuticas como soluciones orales, gotas, suspensiones o inyectables, con distintos tipos de matrices, principios activos y excipientes.

## **Materiales y Métodos**

### **Equipos**

Cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japón) equipado con dos bombas LC-10AS, un espectrofotómetro UV-Vis SPD-10AV para dos  $\lambda$ , un horno CTO-10 y un procesador e integrador CLASS- CR10.

Evaporador rotatorio Büchi R-124/V con módulo de vidrio, baño de agua modelo B-480 y sistema de vacío Vacuum System Büchi B-169.

### **Reactivos**

Se utilizaron retinil palmitato (Fluka, Suiza) como estándar de vitamina A, colecalciferol (Roche, Francia) como estándar de vitamina D y  $\alpha$ -tocoferol acetato (Roche, Francia) como estándar de vitamina E.

Los solventes Metanol y Acetonitrilo fueron calidad HPLC (Riedel-de Haën, GmbH), el Hexano y el Etanol fue de calidad analítica (Cicarelli, Argentina) y el Sulfato de Sodio anhidro p.a. (Merck, Alemania).

#### Soluciones estándar

Se prepararon distintas soluciones estándar concentradas de las vitaminas por pesada en balanza analítica y disolución en hexano, solvente en el que demostraron ser estables por varios días al conservarse refrigeradas y en oscuridad. Se trabajó siempre en un ambiente protegido de la luz, para evitar la fotodescomposición de las vitaminas.

Las soluciones estándares de trabajo se prepararon siempre en el momento de usar por diluciones apropiadas de las soluciones concentradas en fase móvil. Se prepararon tanto estándares individuales de cada vitamina, como estándares combinados, respetando las concentraciones relativas de las vitaminas en las distintas muestras a analizar.

#### Muestras

Las muestras comerciales analizadas fueron:

**Muestra 1:** Cobremas D crecimiento, Laboratorios Zoovet: suspensión en frascos ampolla inyectables de uso veterinario cuya formulación era: Vitamina D<sub>3</sub> 0.150 g, Edetato cúprico cálcico 8.5g, Excipientes: aerosil, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, metilparabeno, propilparabeno, agua destilada c.s.p. 100 ml.

**Muestra 2:** Cobremas A+E reproducción, Laboratorios Zoovet: suspensión en frascos ampolla inyectables de uso veterinario cuya formulación era: Vitamina A 2g, Vitamina E 3g, Edetato cúprico cálcico 17g, Excipientes: aerosil, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, metilparabeno, propilparabeno, agua destilada c.s.p. 100 ml.

**Muestra 3:** ACD GOBBI, multivitamínico en solución oral, Laboratorios Gobbi- Novag, Argentina, de composición: Vitamina A 833.300 UI, Vitamina C 8.33 g, Vitamina D 166.600 UI, Excipientes: sacarosa, ácido cítrico, carbonato ácido de sodio, hidróxido de sodio, esencia de frutilla, polisorbato, metilparabeno, propilparabeno, agua destilada c.s.p. 100 ml.

La concentración de vitaminas en esta muestra corresponde a 0,250g /100 ml de vitamina A y  $4,15 \times 10^{-3}$  g /100 ml de vitamina D.

#### Sistema Cromatográfico

Para adecuar las condiciones cromatográficas se partió de lo que establece la USP24 para posteriormente introducir cambios que mejoraron el método. Se utilizó una columna para HPLC en fase reversa LiChro CART 250-4 RP-18 (5 $\mu$ m), Merck, (Darmstadt, Alemania) con guardacolumna. La fase móvil fue metanol:acetonitrilo:hexano (46,5:46,5:7,0) filtrada por membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m para remover impurezas y sonicada para desgasificar antes de usar. Se trabajó a flujo constante y se estudiaron los tiempos de retención ( $t_R$ ) y las resoluciones para 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5ml/min. La temperatura de trabajo se mantuvo con el horno a 40°C. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l y tanto los estándares como las muestras se filtraron inmediatamente antes de inyectar por filtros de nylon de 0,45 $\mu$ m. Se realizaron experiencias con el detector a  $\lambda = 265$  nm y  $\lambda = 291$ nm para evaluar las absorbancias obtenidas para cada vitamina. Las soluciones se inyectaron por triplicado con el fin de obtener el coeficiente de variación de inyecciones repetidas.

#### Preparación de las muestras

Las muestras 1 y 2 se pretrataron por dos metodologías, I) la propuesta por USP 24 para vitaminas A y D; y II) por dilución directa en fase móvil, con posterior filtración. Se evaluaron y compararon los resultados. La muestra 3 fue pretratada directamente por la metodología II.

En la metodología I un volumen de 500  $\mu$ l de muestra se colocó en ampolla de decantación que contenía 10 ml de agua y 20 ml de etanol. Se homogenizó y se extrajeron las vitaminas con dos porciones de 150 ml de hexano. Los extractos combinados de hexano se secaron filtrando a través de un lecho de sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a sequedad en evaporador rotatorio sobre baño de agua a 65 °C. El residuo se redisolvió en 10,00 ml de fase móvil y se filtró antes de inyectar por filtro de nylon de 0,45 $\mu$ m.

En la metodología II un volumen de 500  $\mu$ l de muestra se diluyó directamente a 5,00 ml con fase móvil, se homogenizó en agitador magnético para asegurar la completa disolución de las vitaminas y se filtró por un lecho de sulfato de sodio anhidro recogiendo el eluido en matraz de 10,00 ml, se lavó con pequeñas porciones de la misma fase móvil y

finalmente se llevó a volumen. Se trabajó siempre al abrigo de la luz directa y protegiendo el material volumétrico con papel de aluminio. Se observó que todos los componentes en suspensión de las muestras 1 y 2 (edetatos y excipientes) permanecieron insolubles y fueron retenidos por el filtro. Al diluir la muestra 3 en fase móvil se produjo la precipitación de los compuestos hidrosolubles y fueron retenidos en la filtración. Inmediatamente antes de inyectar las soluciones muestras en el cromatógrafo se volvieron a filtrar por filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

## Resultados y discusión

### Selección de las condiciones experimentales

Se inyectaron primero soluciones estándar de cada vitamina por separado para determinar los  $t_R$  individuales, la sensibilidad a las distintas longitudes de onda y los coeficientes de variación de inyecciones repetidas. Luego se inyectaron estándares combinados de las distintas vitaminas para estudiar la resolución a distintas velocidades de flujo de la fase móvil. Luego de optimizar las condiciones cromatográficas se establecieron en: flujo 3ml/min, temperatura 40°C y detector a  $\lambda = 265\text{nm}$ .

En estas condiciones los  $t_R$  obtenidos fueron: vit. D  $\sim 1,9$  min, vit. E  $\sim 2,9$  min y vit. A  $\sim 6,7$  min. Como puede observarse en las Figuras 1 y 2 todas las vitaminas estudiadas eluyen como picos agudos, bien definidos, sin deformaciones y se resuelven perfectamente en las mezclas analizadas. Si bien se observaron pequeñas variaciones en los tiempos de retención en análisis realizados en distintos días, los mismos pueden atribuirse a pequeños cambios en la fase móvil (15) que no alteraron la secuencia de elusión.

### Adecuación del sistema

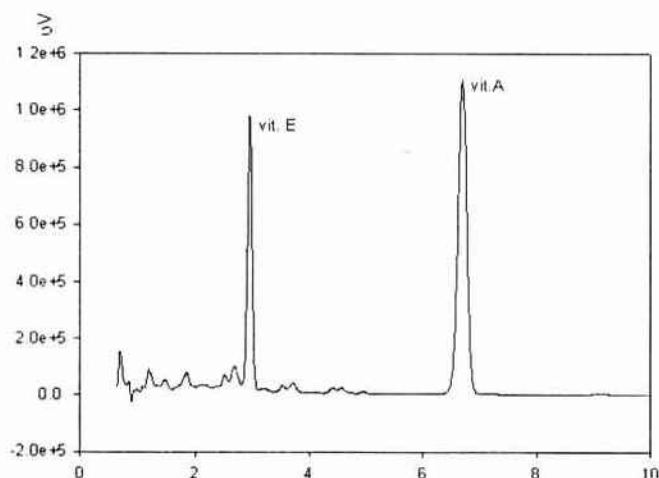
Los coeficientes de variación obtenidos para tres inyecciones repetidas fueron de 1,73% para vit D, 2,41% para vit. A y 0,30% para vit. E con las soluciones estándares, siendo el coeficiente permitido en la USP 24 menor a 5,0 % para aceptar las condiciones del sistema.

### Cromatogramas

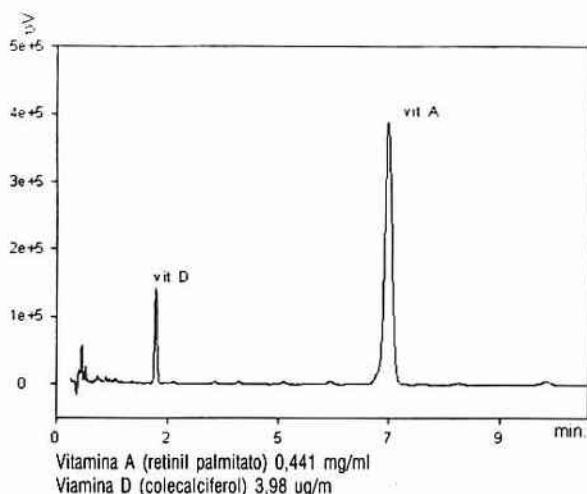
Los  $t_R$  de cada pico fueron utilizados para identificar a cada vitamina.

Las vitaminas se cuantificaron en las muestras 1 y 2 por ambos métodos utilizando estándares exter-

Figura 1: Estándar combinado de vit. A y vit. E.



Vitamina A (retinil palmitato) 0,334 mg/ml  
 Vitamina E (tocopherol acetato): 0,788 mg/m

**Figura 2:** Estándar combinado de vit. A y vit. D.

nos para evaluar las áreas de los picos eluidos. La muestra 3 se procesó directamente por el método II.

Como puede observarse en las Figuras 3 y 4 el agua y compuestos hidrosolubles que quedaron en solución eluyeron en el frente de corrida y no interfirieron con los analitos, ni modificaron la forma o los tiempos de retención de los picos.

### Recuperación

La recuperación de ambos métodos se estudió mediante el análisis de soluciones estándares en hexano y en aceite de girasol, como por el método de adición de estándar.

Las recuperaciones obtenidas por el método propuesto fueron cercanas al 100% para todas las vitaminas, mientras que para el método USP las recuperaciones fueron en general bajas: 55,1 % de vi-

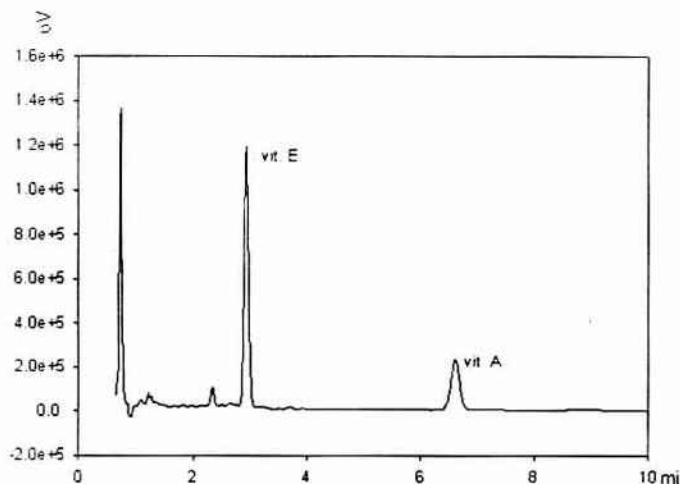
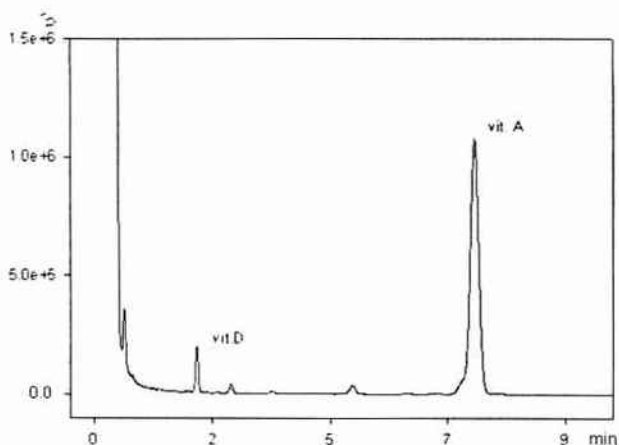
**Figura 3:** Muestra 2 "Cobremas A + E reproducción"

Figura 4: Muestra 3 <sup>14</sup>C D Gobbli multivitaminico oral

vitamina A, 73,3 % para vitamina D y 93,0% para vitamina E.

En la Tabla 1 se informan los resultados obtenidos para las muestras 1 y 2 por ambos métodos y para la muestra 3 por el método II.

El resultado obtenido para la vitamina E en la muestra 2 corresponde al 120% de la dosis declarada, siendo el rango aceptado por la Farmacopea USP24 de 90 – 250% de la dosis rotulada.

Tabla 1: Resultados obtenidos al procesar las muestras por los distintos métodos.

Muestra	Vitamina	Métodos			
		I		II	
		Promedio (g% p/v)	CV (%)	Promedio (g% p/v)	CV (%)
1	D (colecalfiferol)	<sup>a</sup> 0,0122 <sup>b</sup> (n=3)	23,8	0,0167 (n=5)	7,4
2	A (retinil palmitato)	<sup>a</sup> 0,199 (n=3)	13,6	0,361 (n=5)	8,8
	E (tocoferol acetato)	3,97 (n=3)	4,2	4,27 (n=5)	4,1
3	A (retinil palmitato)	_____	_____	0,300 (n=5)	3,7
	D (colecalfiferol)	_____	_____	5,24x10 <sup>-3</sup> (n=5)	4,0

Método I: Método oficial USP24, pretratamiento consistente en extracciones, evaporación del solvente y redisolución de las vitaminas.

Método II: Método propuesto, pretratamiento consistente en dilución en fase móvil y posterior filtración.

CV: Coeficiente de variación.

<sup>a</sup>Las muestras 1 y 2 estaban siendo evaluadas por el fabricante y se demostró que las vitaminas A y D eran inestables en la matriz suministradas, por tal motivo sus concentraciones en el momento del estudio resultaron mucho menores a lo declarado.

<sup>b</sup> El número de repeticiones corresponde a análisis completos tanto para el método I como el II.

## Conclusiones

Los procedimientos de extracción, saponificación y preconcentración previos a la cuantificación de vitaminas liposolubles se justifican en muestras biológicas o en alimentos en los que las vitaminas, además de encontrarse asociadas a lipoproteínas, membranas celulares u otras estructuras, se encuentran en bajas concentraciones. En el tipo de preparaciones farmacéuticas analizadas, en donde la matriz es simple y conocida y donde las vitaminas se encuentran relativamente en grandes concentraciones, no es recomendable la aplicación de complicados y largos pretratamientos como los propuestos en el método oficial, que no sólo consumen tiempo y reactivos, sino que, además, producen bajos rendimientos. En el método propuesto se logra minimizar la etapa preanalítica obteniéndose excelentes resultados en la recuperación de los analitos. Se plantea además la posibilidad de cuantificar simultáneamente un grupo de vitaminas liposolubles en un mismo procedimiento cromatográfico que produce una buena resolución entre los picos y permite completar el análisis en tiempos inferiores a los 15 minutos.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con fondos aportados por el proyecto CAI+D 2000 (17-1-41) programa 1 y por el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos.

Al Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por facilitarnos el uso del cromatógrafo líquido de alta resolución.

Al Laboratorio Productos Veterinarios S.A. por facilitarnos muestras de sus productos Cobremas D crecimiento y Cobremas A+E reproducción y los estándares de vitaminas D y E.

## Bibliografía

1. Lehninger, Albert L, 1983. "Bioquímica" Ediciones Omega S.A.(Barcelona),191,341-343.
2. Goodman Gilman, Alfred y otros, 1996. "Las bases farmacológicas de la terapéutica", Ediciones The McGraw-Hill

- Companies, Inc. (México), II ; 1626-1634, 1675-1685, 1689-1692.
3. United States-Pharmacopeia XXIVth revision,2000; US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
4. M.D. Luque de Castro, J.M. Fernández-Romero, F. Ortiz Boyer, 2000. J of Chromatogr. A **885**: 115.
5. R. Gatti, M.G. Gioia, V. Cavrini, 2000. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescent detection. J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **23**: 147-159.
6. J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, 2001. Extraction of fat-soluble vitamins. J of Chromatogr. A, **935**: 3-11.
7. H.Qian, M Sheng, 1998. Simultaneous determination of fat soluble vitamins A D and E and provitamin D in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. J. Chromatogr. A **825**: 127-133.
8. A. Escrivá, M.J. Esteve, R. Farré, A. Frigola, 2002. Determination of liposoluble vitamins in caged meals, milk and milk products by liquid chromatography. J of Chromatogr. A, **94**: 313-318.
9. S.Casal, B.Macedo, M.B.PP. Oliveira,2001. Simultaneous determination of retino,  $\beta$ -caroteno and a-tocopherol in adipose tissue by high performance liquid chromatography, J. of Chromatogr. B, **763**:1-8.
10. M.D. Luque de Castro, J.M. Fernández - Romero, F. Ortiz-Boyer, J.M. Quesada, 1999. Determination of vitamin D metabolites:state-of-the-art and trends, J.of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **20**: 1-17.
11. J.C Alvarez, P. De Mazancourt, 2001. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinal, a-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in human plasma with photodiode-array ultraviolet detection, J.of Chromatogr.B **755**: 129-135.
12. M.A. Rodríguez-Delgado et al, 2002. Fast determination of retinol and a-tocopherol in plasma by LC. J. of Pharmaceutical and Biomedical Anal. **28**: 991-997.
13. P. Moreno, V. Salvadó, 2000. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, J. of Chromatogr. A, **870**: 207-215.
14. F.J. Rupérez et al, 2001. Chromatographic analysis of a-tocopherol and related compounds in various matrices. J. of Chromatogr. A, **935**: 45-69.
15. O.A. Quattrocchi, S.I. Abelaire , R.F. Laba, 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes gráficas Faro S. A. (Buenos Aires).