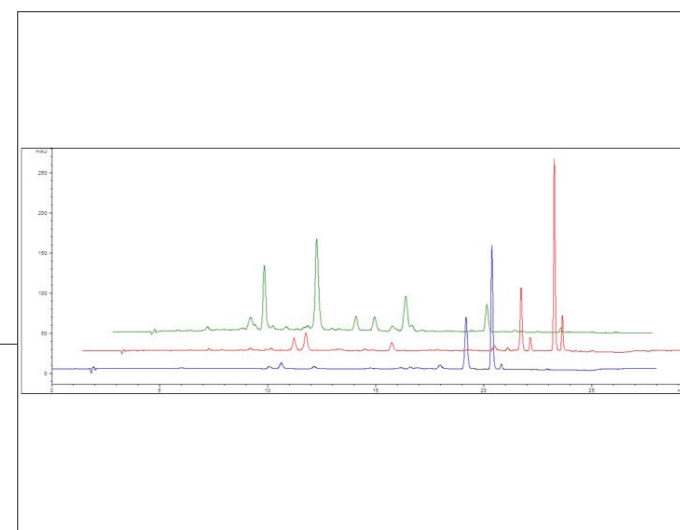


CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE CAROTENOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Antonio Pérez-Gálvez, Ana Augusta O. Xavier, Manuel Jarén-Galán,
Antonio J. Meléndez-Martínez, Ana Benítez-González, Carla M. Stinco,
Juan Garrido-Fernández



INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de la cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que utiliza los principios básicos de la cromatografía líquida —separación basada en la interacción del analito entre una fase líquida móvil y una fase estacionaria— y emplea instrumentos avanzados: inyector, bomba, columna y detector. En este tipo de cromatografía, el líquido que compone la fase móvil se bombea mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Así, un equipo de HPLC consiste en bomba mecánica, controlador y detector, equipos entre los que se intercala la columna cromatográfica en la que se realiza la separación y el conjunto está controlado por un software de gestión del sistema cromatográfico, adquisición de datos y posterior análisis de los mismos (Weston y Brown, 1997).

Antes de la aparición de la cromatografía líquida de alta resolución, a mediados de la década de 1970, la separación de los pigmentos carotenoides se realizaba por cromatografía en columna abierta (OCC) y por cromatografía en capa fina (TLC). Una de las primeras memorias sobre la aplicación de separación por HPLC a los pigmentos carotenoides data de 1971 y la realizaron Wheaton y Stewart, separando carotenos y xantofilas de extractos cítricos mediante el uso de cromatografía de flujo continuo en una columna de fase normal compuesta por óxido de magnesio. Unos años más tarde, Fiksdahl, Mortensen y Liaaen-Jensen (1978) estudiaron las aplicaciones y limitaciones de HPLC acoplada a espectrometría de UV-visible en la separación de carotenoides, xantofilas, isómeros *cis-trans*, y diastereoisómeros, empleando columnas rellenas de sílice y usando diferentes gradientes de acetona, hexano y metanol como fase móvil.

En la actualidad la técnica de HPLC es el método de elección más popular para la separación, análisis y cuantificación de carotenoides al presentar muchas ventajas en comparación con otras técnicas cromatográficas, sobre todo en términos de resolución, separación, tiempo necesario de análisis y la cantidad requerida de muestra (Mínguez-Mosquera, 1997). Así, el tiempo de análisis necesario, incluyendo la preparación de la muestra y la propia separación, permite la evaluación de un gran número de muestras y replicados en un tiempo corto. El acoplamiento de equipos de HPLC con diferentes tipos de detectores facilita la tarea de identificación de estos compuestos; la detección se hace mediante espectrometría UV-visible (longitud de onda y sistemas de matriz de diodos individuales) o espectrometría de masas, que son los sistemas empleados hoy (Schoefs, 2004).

Características físicas y químicas de los carotenoides y su relación con la cromatografía líquida de alta resolución

Los carotenoides tienen como estructura básica un esqueleto tetraterpeno con 40 átomos de carbono, que consta de ocho unidades de isopreno enlazadas en un patrón de cabeza a cola con una simetría invertida en el centro de la molécula (Britton, 1995). Esta estructura puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación y oxidación, dando lugar a estructuras diferenciadas que comprenden más de 700 carotenoides, cifra de los compuestos que han sido identificados hasta el momento en la naturaleza (Davies, 1976). Su característica estructural principal es el sistema de dobles enlaces conjugados, donde los electrones están deslocalizados eficientemente. Este cromóforo es responsable de la capacidad de los carotenoides para absorber luz en la región visible, por lo que la detección mediante espectrometría de UV-visible de diodos en línea es particularmente adecuada. Además, el cromóforo de los carotenoides hace que los isómeros *todo-trans* sean moléculas rígidas y lineales, lo que deriva en una propiedad importante para el resultado de las interacciones con las fases estacionarias en HPLC (Khachik, 2009).

Además del comportamiento cromatográfico de los carotenoides en relación con el número de dobles enlaces conjugados en el cromóforo, se deben considerar la naturaleza de los grupos terminales y el tamaño de la moléculas (Davies, 1976). La influencia de los dobles enlaces se ilustra bien por adsorción mediante afinidad de los carotenoides acíclicos con fase normal, eluyendo en la siguiente secuencia: fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, licopeno y neurosporeno (Davies, 1976; Rodríguez-Amaya, 2001; figura 1). La ciclación, en general,

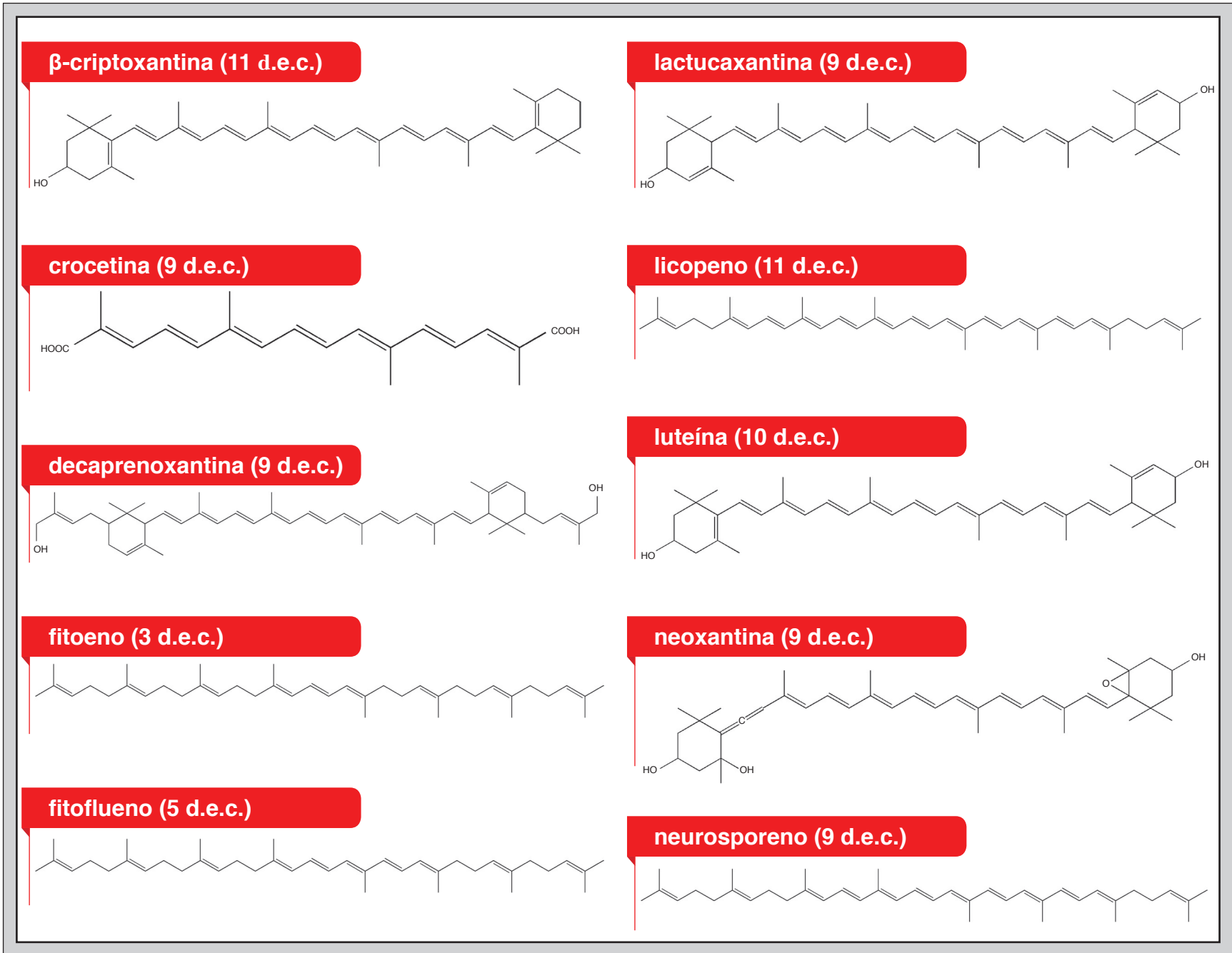


FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

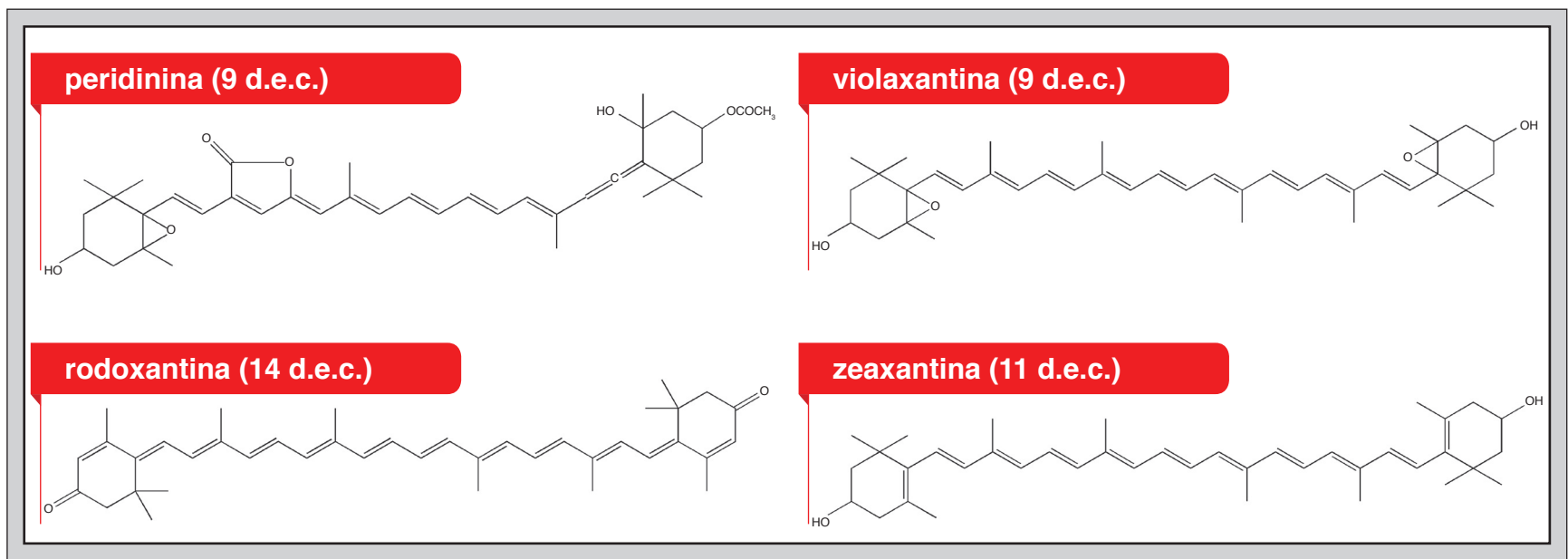


FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

reduce la afinidad de adsorción y, por lo tanto, β -caroteno (con dos anillos tipo β) se absorbe más débilmente que γ -caroteno (un anillo β). Por otro lado, la presencia de grupos oxigenados aumenta la polaridad y por lo tanto la adsorción de los carotenoides, y la magnitud de este incremento depende del tipo, número y ubicación de esos grupos (Rodríguez-Amaya, 2001). En fase reversa, el orden de elución es prácticamente el orden inverso que se observa en fase normal de elución. Las xantofilas, al ser más polares eluyen antes que los carotenos, con las xantofilas di-hidroxiladas (tales como luteína y zeaxantina), eluyendo primero, seguidas por las mono-hidroxiladas. Los carotenos, a su vez, no siguen un orden de elución estándar, y su comportamiento cromatográfico depende del tipo de fase estacionaria (monómero o polímero) utilizada y la composición de la fase móvil (Rodríguez-Amaya, 2001).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Procedimientos analíticos generales

La alta susceptibilidad a la degradación y la isomerización inherente a la estructura química de los carotenoides requiere precauciones especiales durante su análisis con el fin de evitar los efectos deletéreos del oxígeno, la temperatura, la luz y los ácidos. Aunque no existe un protocolo normalizado para la preparación de muestras para el análisis de los carotenoides, ya que el perfil y la concentración de estos pigmentos varía ampliamente de acuerdo con la matriz que los contiene, sí se puede indicar un procedimiento típico a seguir en la preparación de la muestra para su análisis por HPLC: muestreo y preparación de la muestra, extracción, partición por disolventes compatibles con cromatografía, en algunos

casos saponificación y lavado, concentración y la evaporación del disolvente (Mercadante, 2008; Rodríguez-Amaya, 2001) hasta obtener un extracto seco listo para su dilución y análisis. En el capítulo 2 se ofrece información detallada de las consideraciones generales para el análisis de carotenoides.

Saponificación de muestras con alto contenido graso o con ésteres de carotenoides

La etapa de hidrólisis alcalina, también conocida como saponificación, se aplica para la eliminación de los lípidos en las muestras con alto contenido graso y la hidrólisis de los ésteres de carotenoides presentes habitualmente en tejidos de origen vegetal (Mercadante, 2008; Rodríguez-Amaya, 2010). Como ya se ha indicado en el capítulo 2, se trata de una etapa con ventajas e inconvenientes, por lo que siempre debe considerarse si es realmente necesaria.

Derivación de grupos funcionales

Mientras que la espectrometría de UV-visible revela la naturaleza del cromóforo de los carotenoides y el comportamiento cromatográfico proporciona cierta información sobre su polaridad relativa, hay algunas pruebas químicas bastante simples que proporcionan información acerca de la naturaleza, la estructura y la posición de algunos grupos funcionales (Davies, 1976). Las pruebas más utilizadas se discuten brevemente a continuación, sobre la base de procedimientos descritos por Eugster (1995) y Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez (2002).

a) Grupo 5,6-epóxido: reordenamiento furanoide
La prueba se basa en la modificación de aquella transformación en el cromóforo resultante de la presencia de un grupo 5,6-epóxido a 5,8-epóxido en medio ácido (figura 2), lo que resulta en un desplazamiento hipsocrómico del espectro

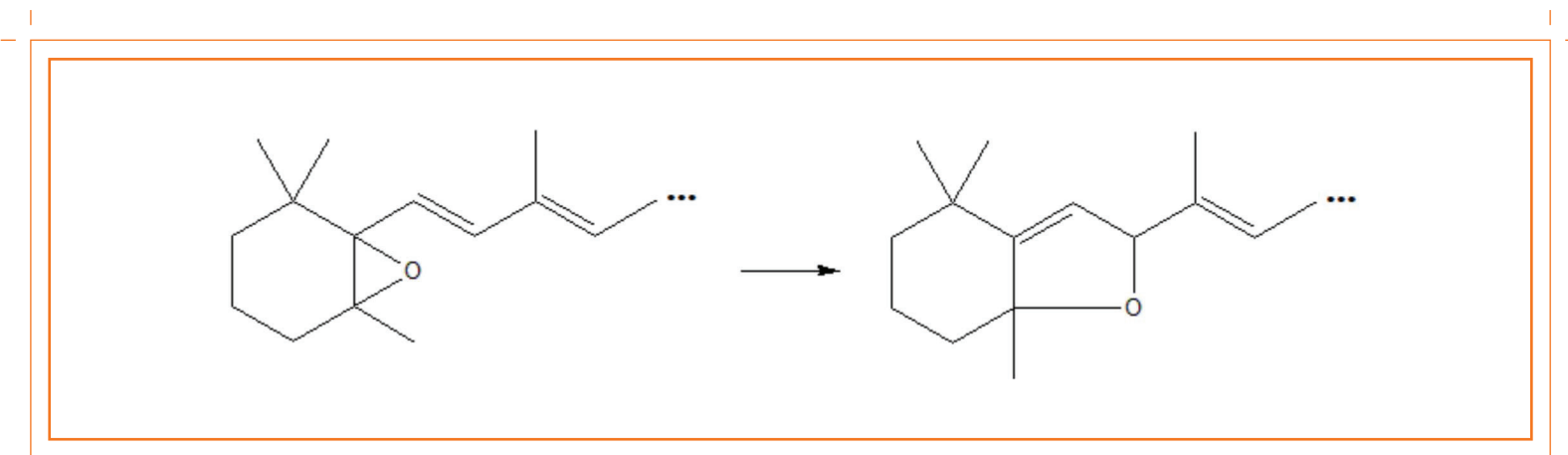


FIGURA 2. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

de absorción entre 15 y 20 nm. La reacción puede llevarse a cabo directamente en la cubeta del espectrofotómetro mediante la adición de varias gotas de HCl 0.1 N y medir los cambios en el espectro de absorción UV-visible, *in situ*, o bien mediante TLC tras pulverizar la banda cromatográfica de interés con HCl una vez completada la separación cromatográfica. En este caso, la aparición de un color azul característico identifica la presencia del grupo 5,6-epóxido: los diepóxidos se revelan mediante un color azul oscuro y los monoepóxidos con un color verde azulado. La prueba también puede realizarse inyectando en el sistema de HPLC un extracto antes y después de acidificar con el HCl diluido.

b) Carbonilo: reducción de aldehídos y cetonas

Los reactivos LiAlH_4 o NaBH_4 se utilizan en general como agentes de reducción de grupos carbonilo para formar los correspondientes alcoholes. Los aldehídos se reducen a alcoholes primarios y las cetonas a alcoholes secundarios. La prueba se realiza mediante la adición de NaBH_4 a la solución carotenoide, que se mantiene en condiciones de refrigeración y en la oscuridad durante tres horas. Si hay algún grupo carbonilo conjugado con cadena polienoica, se observará tanto un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción y un aumento considerable en la estructura fina del espectro UV-visible.

c) Ensayo de acetilación de grupos hidroxilo

La prueba se basa en la conversión de alcoholes a ésteres, que son menos polares, pero que tienen el mismo espectro de absorción UV-visible. La reacción se produce mediante la adición de anhídrido acético en piridina a la solución carotenoide. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante 12 horas y la reacción se detiene mediante la adición de agua. El seguimiento de esta reacción se lleva a cabo por TLC o

HPLC, y el número de productos formados sugiere el número de grupos hidroxilo que han sido acetilados. La aparición de un derivado monoacetilado indica la presencia de un solo grupo hidroxilo. En el caso de tener dos grupos hidroxilo en la estructura original, se pueden observar uno (monoacetilado) o dos (diacetilado) derivados como productos de reacción, dependiendo de si la posición de los grupos hidroxilo es simétrica o no.

d) Ensayo de grupo hidroxilo alílico

La presencia del grupo funcional se detecta a través de una reacción de deshidratación que introduce un doble enlace adicional en el cromóforo del carotenoide. Este aumento de los dobles enlaces del cromóforo produce un desplazamiento batocrómico (a mayor longitud de onda) de 10 a 16 nm que se puede observar en el espectro UV-visible. La reacción consiste en la adición de HCl diluido a una solución del carotenoide en cloroformo.

ELEMENTOS CRÍTICOS EN HPLC PARA LA SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES

Eluyentes en la fase móvil

Las propiedades más importantes que se deben observar e influyen en la elección de la fase móvil son la viscosidad y la polaridad que, si es posible, debe ser baja. La fase móvil debe ser compatible con el método de detección, en especial para los carotenoides que absorben en la zona del UV, y que la mezcla óptima de elución sea completamente clara e incolora (Pfander, 1995). También es necesario que los carotenoides sean completamente solubles en la fase móvil utilizada para la separación cromatográfica. Los carotenoides en general son

moléculas altamente hidrófobas y solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, como acetona, éter dietílico, cloroformo, acetato de etilo y presentan ninguna o muy baja solubilidad en agua (Rodríguez-Amaya, 2001).

Hay dos tipos de fases estacionarias para la separación de los carotenoides mediante HPLC: fase normal y fase reversa (véase abajo). En fase normal, la fase estacionaria es de naturaleza polar por lo que requiere una fase móvil no polar o de baja polaridad. El hexano es el disolvente más ampliamente utilizado en este caso, junto con pequeñas cantidades de otros disolventes más polares tales como metanol y propanol; el uso de agua no se recomienda porque es un disolvente altamente polar.

La cromatografía líquida de fase reversa utiliza como fase estacionaria un material de naturaleza apolar y como fase móvil disolventes polares, como mezclas de metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano y agua, aunque se prefieren los sistemas no acuosos para la separación cromatográfica de los carotenos (Pfander y Riesen, 1995; Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002).

Separación por cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal combina una fase estacionaria polar con la fase móvil de carácter no polar. Los materiales más comunes para el relleno de la columna son sílice y nitrilo usando fases o grupos amino (Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002). La presencia de grupos polares es el factor determinante en las interacciones entre los carotenoides y los grupos complejados con la sílice. Los carotenos tienen baja afinidad por la sílice, eluyendo

al comienzo de la cromatografía y por lo tanto la resolución y selectividad para esta familia de carotenoides no es la adecuada. En el caso de las xantofilas, su interacción con los grupos polares de la fase estacionaria es tal que el aumento en el número de grupos funcionales de aquellas incrementa la afinidad por adsorción. Por lo tanto, la elución de xantofilas en fase normal sigue el siguiente orden: monohidroxiladas, dihidroxiladas y trihidroxiladas. El efecto de los grupos funcionales polares se modula por las interacciones y otras características, como su posición, la ciclación y el tipo de anillo (α , β o ϵ), el nivel de saturación y la forma del isómero geométrico *cis* o *trans* (Khachik, 2009).

Panfili, Fratianni e Irano (2004) determinaron la composición de carotenoides en cereales y sus subproductos mediante HPLC en fase normal, empleando una columna de sílice Phenomenex Kromasil (250 mm I.D. x 4.6 mm, 5 μ m) y una fase móvil de n-hexano e isopropanol (5%) con un flujo de 1.5 mL/min. La columna es capaz de resolver los picos de β -criptoxantina, luteína y zeaxantina, pero no tenía suficiente selectividad para separar α - y β -caroteno. El uso de una columna de sílice, Spherisorb (250 mm I.D. x 4.6 mm, 5 μ m) y un gradiente de éter de petróleo y acetona como fase móvil (Almela *et al.*, 1991) separa el contenido carotenoide en extractos saponificados obtenidos de diferentes cultivares de pimiento. Una columna de sílice con hexano y grupo nitrilo, con diclorometano y metanol (75:25:0.3) que contiene 0.1% de N, N-diisopropiletilamina como fase móvil se utilizó para la separación de luteína, zeaxantina y sus isómeros geométricos y sus productos metabólicos en frutas, verduras y productos de cereales. El orden de elución fue: 13,13'-di-*cis*-luteína, todo-*trans* luteína, zeaxantina todo-*trans*, 9-*cis*-luteína, 9'-*cis*-luteína, epóxido de luteína, 13-*cis* + 13'-*cis*-luteína, 9-*cis*-zeaxantina, 13-*cis*-violaxantina (Humphries y Khachik, 2003). Estos autores

también encontraron dificultades en la separación de los carotenos debido a la baja selectividad de la columna. Por otra parte, Schmitz, Emenhiser y Schwartz (1995) fueron capaces de separar fitoflueno, ζ -, γ -, α - y β -caroteno utilizando una columna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como fase estacionaria.

Separación por cromatografía de fase reversa

A diferencia de la fase normal, la cromatografía de fase reversa utiliza fases estacionarias no polares, como octilsilano (C_8), octadecilsilano (C_{18}) y algunos polímeros (poliestireno, divinilbenceno y polimetacrilato). El mecanismo de separación cromatográfica se basa en el grado de hidrofobicidad de los carotenoides siendo los carotenoides polares (xantofilas) los que muestran menor retención y posteriormente eluyen los carotenos y los ésteres de xantofilas. Una de las ventajas de la fase reversa a la fase normal es la posibilidad del uso de agua en la composición de la fase móvil (Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002).

Las características y algunos ejemplos de análisis de carotenoides en fase reversa (C_{18} y C_{30}) están en el apartado “Ejemplos de aplicaciones” de este capítulo.

Columnas C_{18}

La cromatografía en columna de fase reversa C_{18} se utiliza con frecuencia en la separación de los carotenoides, debido a su carácter hidrófobo. En esta columna, los grupos silanol de sílice están unidos a cadenas de alquilo de 18 átomos de carbono. En función de la disposición de las cadenas de alquilo en la sílice se consideran dos tipos de columnas: columnas monoméricas, donde las cadenas de alquilo son paralelas una respecto de la siguiente y las poliméricas, en las que el polímero orgánico cubre la estructura de sílice de manera

entrelazada. Las columnas de conformación monomérica tienen mayor reproducibilidad, mientras que las columnas poliméricas presentan mayor selectividad, principalmente en la separación de xantofilas (Epler *et al.*, 1992).

Las columnas C_{18} también se pueden clasificar de acuerdo con el porcentaje de grupos silanol recubiertos: ODS-1 tiene 5% de recubrimiento; ODS-2 con 10% de superposición y ODS-3 con 15% de recubrimiento. Considerando que los restantes grupos silanol libres pueden afectar la separación y disminuir la reproducibilidad de la columna, la sustitución se realiza a menudo con grupos de menor longitud de cadena de carbonos. Sin embargo la presencia de grupos no protegidos terminalmente puede ser beneficiosa en la separación de xantofilas (Gilmore y Yamamoto, 1991; Khachik, 2009).

Columnas C_{30}

La introducción de las columnas C_{30} (Sander *et al.*, 1994) significó un avance considerable en la capacidad de resolución cromatográfica para la separación de carotenoides. Este tipo de fase estacionaria tiene una mayor selectividad para la separación de carotenoides y sus isómeros geométricos en comparación con las columnas C_{18} (Albert, 1998; Figura 3). El aumento de la selectividad es debido al tamaño de los grupos enlazados con la fase de sílice que aumenta la hidrofobicidad de la fase estacionaria, lo que permite una mayor interacción con los carotenoides (Sander *et al.*, 1994). La desventaja de la columna C_{30} en relación con la columna C_{18} es el tiempo de análisis, en general más largo. En algunos casos puede extenderse hasta 60-100 minutos (Khachik, 2009), si bien las nuevas columnas con menor longitud y tamaño de partícula permiten reducir considerablemente el tiempo de los análisis sin afectar negativamente la resolución de los picos.

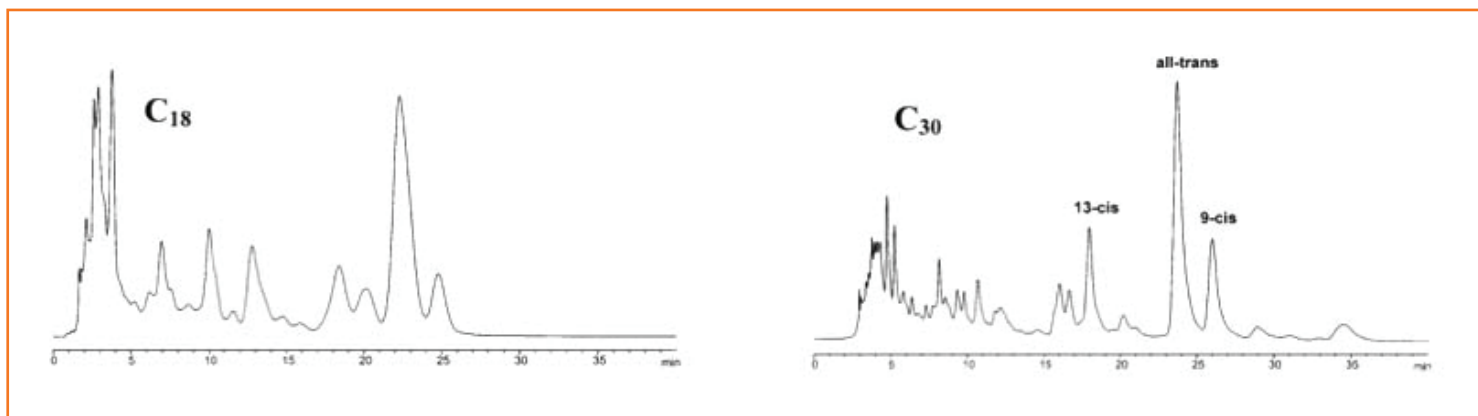


FIGURA 3. Separación por HPLC de isómeros de β -caroteno a 21,8 °C utilizando una columna C_{18} como fase estacionaria y acetona/agua (83:17, v/v), flujo 1 mL/min y detección a 450 nm; una columna C_{30} como fase estacionaria y acetona/agua (93:7, v/v), flujo 1 mL/min.

La separación cromatográfica en las columnas C_{30} depende mucho de la temperatura, que modifica la organización de los grupos C_{30} presentes en la superficie de la sílice. A bajas temperaturas, las cadenas de alquilo están dispuestas preferentemente en la conformación *trans* (más ordenada y rígida), lo que proporciona mayor selectividad. Con el aumento de la temperatura, la interconversión se produce entre las conformaciones *trans* y *cis*, resultando en una pérdida de la resolución de los picos (Albert, 1998; Lee, Hamaguchi y Shigeto, 2008).

Detectores UV-visible

Los detectores de espectrofotometría UV-visible son, sin duda, los más utilizados en el análisis por HPLC de carotenoides, debido sobre todo a las características de absorción de luz de estos pigmentos. Actualmente, el detector UV-visible más popular es el detector de diodos en línea (DAD), que puede

recoger datos de forma continua durante todo el análisis, facilitando así la determinación de la pureza y la identificación de compuestos desconocidos (Kopec *et al.*, 2012). En un detector DAD, la radiación pasa a través de la muestra en la celda de flujo, se dispersa por una rejilla y penetra en la matriz de diodos. Cada diodo mide un rango estrecho de longitudes de onda del espectro, por lo que es posible adquirir una amplia banda de datos espectroscópicos simultáneamente (Pfander y Riesen, 1995). Los detectores UV-visible son altamente sensibles, tienen una amplia gama lineal, presentan una buena estabilidad frente a los cambios de temperatura y admiten gradientes de elución de muy diferente composición (Pfander y Riesen, 1995). Más información sobre espectrofotometría UV-visible aplicada al análisis de carotenoides se proporciona en los capítulos 4 y 6.

Electroquímico

Los detectores electroquímicos se utilizan entre la amplia gama de detectores acoplados a la técnica de HPLC después de

los detectores de UV-visible y de fluorescencia. Su principio de funcionamiento se basa en las propiedades de oxidación y reducción de analitos en un potencial fijo (Santos *et al.*, 2009). Este tipo de interacción permite eliminar compuestos no deseados a través de la oxidación selectiva de interferentes antes de la detección del compuesto de interés mediante la selección del potencial electroquímico adecuado. Esta característica confiere una alta sensibilidad y selectividad a los detectores electroquímicos, que son muy útiles en el análisis de compuestos orgánicos, como tocoferoles, carotenoides y retinoides en bajas concentraciones y hasta niveles de trazas, particularmente en muestras complejas (Ferruzzi *et al.*, 1998). El número de publicaciones sobre el análisis de carotenoides mediante detectores electroquímicos es escaso y en la mayoría de ellos este detector aparece acoplado a sistemas cromatográficos de fase reversa y para el análisis de carotenoides en alimentos, como aceites vegetales (Puspitasari-Nienaber, Ferruzzi y Schwartz, 2002), frutas y verduras (Brown *et al.*, 2004), o para muestras biológicas, como plasma humano y tejidos de las mucosas (Ferruzzi *et al.*, 2001), plasma humano (Finckh *et al.*, 1995; Ferruzzi *et al.*, 1998) y de otras especies (Hermans *et al.*, 2005).

Espectrometría de lente térmica

La técnica de espectrometría de lente térmica (TLS) se basa en la absorbancia medida por el efecto de lente térmica indirecta (Luterotti, Sikovec y Bicanic, 2000). En la práctica, un haz de láser (fuente de luz) se concentra en la muestra y la energía absorbida por ella conduce a un aumento en la temperatura, lo que resulta en cambios en las propiedades físicas, como el índice de refracción, el parámetro que se mide en la técnica TLS (Franko, 2001). El calor liberado por la muestra es proporcional a la potencia de excitación láser,

lo que proporciona una alta sensibilidad a la técnica TLS en comparación con otras técnicas espectrofotométricas convencionales. Debido a su alta sensibilidad, los detectores de TLS se emplean en el análisis de muestras con concentraciones muy bajas de carotenoides. Algunos estudios que utilizan esta técnica de detección se han aplicado con muestras de plasma (Franko, Van Bovenkamp y Bicanic, 1998) y suplementos a base de aceites de pescado (Luterotti, Franko y Bicanic, 1999), hígado (Luterotti, Sikovec y Bicanic 2000) y aceites de verduras (Luterotti, Franko y Bicanic, 2002).

Espectrometría de masas

Aunque el detector UV-visible es el de uso más común en HPLC para el análisis de carotenoides, muchos autores han optado por el uso de detectores de espectrometría de masas (MS) para la confirmación de la masa y, en algunos casos, de características estructurales de estos pigmentos (Breithaupt y Bamedi, 2002; De Rosso y Mercadante, 2007; Inbaraj *et al.*, 2008; Mandelli *et al.*, 2012; Rodrigues, Mariutti y Mercadante, 2013; Delgado-Pelayo, Gallardo-Guerrero y Hornero-Méndez, 2014). La MS tiene una mayor sensibilidad que la detección por UV-visible y proporciona información sobre la composición elemental y la masa del compuesto, junto con el patrón característico de fragmentación originado por su estructura. Además, la cantidad de muestra requerida para el análisis es inferior (Su, Rowley y Balazs, 2002). La detección mediante MS requiere la ionización de los analitos en la fuente de ionización, que después se separan en función de su masa en relación con la carga (m/z) en el analizador de masas, para finalmente detectarse por niveles de abundancia en el detector (Mercadante, 2008).

Crterios mnimos para la identificacin de carotenoides

Segn Schiedt y Liaaen-Jensen (1995), hay tres criterios mnimos que deben cumplirse para que la asignacin de un pico cromatogrfico a un pigmento carotenode sea razonable:

a) el espectro de absorcin del compuesto (λ_{\max} y su estructura fina en al menos dos disolventes) debe estar en conformidad con el cromforo sugerido; b) las propiedades cromatogrficas deben ser idnticas en dos sistemas diferentes, de preferencia TLC (R_f) y HPLC (t_R). Los datos deben complementarse con la co-cromatografa del pigmento de inters con su correspondiente estandar; c) el espectro de masas se debe obtener a fin de permitir al menos la identificacin del peso molecular.

Si alguno de estos criterios no se cumple, la identificacin debe considerarse como tentativa.

Obtencin de patrones

Los patrones de carotenoides se aislan en general de fuentes naturales documentadas para cada carotenode individual, mediante un procedimiento de extraccin adecuado con disolventes orgnicos seguido de su cristalizacin para obtener altos niveles de pureza. Hay casos en los que es necesario el empleo de cromatografa (TLC y OCC) para purificar el patrón a obtener. Como fuentes naturales ms comnmente utilizadas se pueden citar: para la extraccin de violaxantina y luteína, hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*); patata o papa (*Solanum tuberosum*) para la obtencin de anteraxantina; β -criptoxantina se puede aislar del fruto de papaya (*Carica papaya*) o de la mandarina (*Citrus reticulata*); capsantina y capsorrubina

del pimiento rojo (*Capsicum annuum*); α - y β -caroteno de la zanahoria (*Daucus carota*); licopeno del tomate (*Solanum lycopersicum*) y bixina y norbixina de semillas de bija (*Bixa orellana*) (Mercadante, 2008). Para la extraccin y purificacin de stos y otros carotenoides se recomienda consultar los procedimientos descritos en Britton (1995) y Rodrguez-Amaya (2001). Algunos carotenoides se obtienen con frecuencia por sntesis parcial de carotenoides parecidos estructuralmente mediante reacciones de derivatizacin de grupos funcionales (seccin 2.1.2), como es el caso de auroxantina y luteoxantina, que se obtienen de violaxantina por acidificacin. Se pueden obtener distintos ismeros geomtricos por calentamiento de un carotenode determinado (Mnguez-Mosquera, Hornero-Mndez y Pérez-Gálvez, 2002).

Crterios para la cuantificacin de carotenoides. Muestras con contenido carotenode certificado

La cuantificacin de carotenoides en los extractos de diversa procedencia se realiza mediante calibracin interna o externa. En ambos casos es necesario usar estndares de referencia y determinar la concentracin exacta que se utiliza para construir la recta de calibracin, tanto para cada pigmento de inters respecto del estandar utilizado de referencia interna, en el primer caso, como para cada pigmento que aparezca en el extracto cuando se utiliza el procedimiento de calibracin externa para la cuantificacin. Khachik *et al.* (1992) indican varios criterios para evaluar la validez del procedimiento de calibracin: coeficiente de correlacin de la recta o rectas de calibrado superior a 0.9, intercepcin de la recta lo ms prxima a cero y desviacin estandar relativa inferior a 5%. La recta de calibrado debe representar el margen de concentracin de los carotenoides en la muestra a analizar

y la obtención de los valores de área/respuesta se revisarán minuciosamente para evitar errores en la cuantificación procedentes de solapamiento de picos o por una escasa resolución de la señal en el detector. Cuando se escoge como procedimiento de cuantificación la calibración interna, se utiliza un estándar de referencia que no esté presente en el perfil carotenoide de la muestra (en el caso de que se utilice un pigmento carotenoide) determinando previamente sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas. Este compuesto se añade, de preferencia, al inicio del proceso de extracción de forma que experimentará pérdidas equivalentes al resto del perfil carotenoide de la muestra, por lo que este efecto del proceso se compensará ya que la cantidad de estándar interno que se añade será conocida y a ésta se referirán todos los cálculos de cuantificación posteriores. Los materiales de referencia certificados (CRM) son muestras que contienen una concentración certificada de una o varias sustancias. Estos materiales son proporcionados por organismos reconocidos y se utilizan para determinar la exactitud de un procedimiento de análisis cuantitativo durante su validación. El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) es el único organismo que proporciona CRM para la cuantificación de carotenoides, y en la actualidad cuenta con tres muestras CRM diferentes, de origen alimentario y biológico, que contienen estos pigmentos: puré de espinaca procesada (SRM 2385, NIST 2012a), metabolitos en el plasma humano (SRM 1950, NIST 2012b), y suero humano que contiene una mezcla de vitaminas liposolubles, carotenoides y colesterol (SEM 968e, NIST 2012b). El puré de espinacas procesado proporciona concentraciones certificadas de luteína y β -caroteno, con valores de incertidumbre de 20% y 15% para estos carotenoides, respectivamente. Con la muestra CRM de metabolitos en el plasma humano se proporcionan valores para un mayor número de carotenoides: luteína, zeaxantina,

β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno y licopeno. En este caso los valores de incertidumbre para los carotenoides van desde 5.2% de β -caroteno hasta 33% de luteína. El CRM de suero humano tiene las concentraciones de referencia de 8 de acuerdo con la densidad del suero de carotenoides (tres densidades diferentes): luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, licopeno, α -caroteno. El alto costo de los CRM y los altos niveles de incertidumbre de los carotenoides en CRM disponibles son la razón del poco uso de este tipo de material en el análisis cuantitativo de carotenoides.

EJEMPLOS DE APLICACIONES

Métodos HPLC en frutas y verduras

La tabla 1 recoge algunos ejemplos de métodos de separación por HPLC de carotenoides presentes en frutas y verduras. El perfil de carotenoides de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.), una fruta típica de Brasil, lo determinaron De Rosso y Mercadante (2005) usando una columna C_{18} Nova-Pak. Fueron separados e identificados 14 carotenoides diferentes, incluyendo carotenos, xantofilas y sus derivados epoxi. Luteína, anteraxantina, β -caroteno, violaxantina y neoxantina se encontraron como los carotenoides más representativos en tres variedades de aceituna (Arbequina, Picual y Hojiblanca; Roca y Mínguez-Mosquera, 2003). La separación y la identificación de estos pigmentos también se realizó en un sistema de HPLC-DAD con C_{18} . Breithaupt y Bamedi (2002) emplearon columnas de fase reversa C_{18} y C_{30} en dos sistemas diferentes de elución para separar e identificar los ésteres de carotenoides de patata (*Solanum tuberosum* L.). Violaxantina, luteína y zeaxantina estaban presentes tanto en forma libre como en forma de ésteres de ácidos palmítico y mirístico, y además se identificó

TABLA 1. Ejemplos de metodologías para la separación por HPLC de carotenoides en frutas y verduras.

Características de la columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Carotenoides determinados	Método de detección	Referencia
C ₁₈ Nova-pak 300 × 4,0 mm, 4 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyentes: acetonitrilo/acetato de etilo/agua. Gradiente: 88:2:10 para 85:15:0 en 15 min, manteniendo por 30 min. Flujo: 1 mL/min. Temperatura de la columna: 29 °C.	Acerola (<i>Malpighia punicifolia</i> L.)	Neocromo+neoxantina, violaxantina, luteoxantina, luteína, zeaxantina, 5,6,5',6'-diepoxi-β-criptoxantina, 5,6-epoxi-β-criptoxantina, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, zeinoxantina, β-criptoxantina, 5,6,5',6'-diepoxi-β-caroteno, 5,8-epoxi-β-caroteno, α- e β-caroteno.	DAD	De Rosso y Mercadante (2005).
C ₁₈ Spherisorb ODS-2 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: agua/reactivo ion par/metanol (1:1:8). Reactivo ion par: 0,05 mmol/L acetato tetrabutilamonio y 1 mol/L acetato de amonio en agua. Eluyente B: acetona/metanol (1:1). Gradiente: De 75% de A y 25% de B para 25% de A y 75% de B en 8 min, manteniendo por 2 min, 10% de A y 90% de B a los 18 min, 100% de B en 23 min, volviendo a 75% de A y 25% de B a los 30 min. Flujo 2 mL/min.	Aceitunas (<i>Olea europea</i> L.) var. Hojiblanca, Arbequina e Picual	Luteína, anteraxantina, β-caroteno, neoxantina e violaxantina	DAD	Roca y Mínguez-Mosquera (2003).
C ₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: C ₁₈ Nucleosil 10 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: gradiente. SISTEMA I Eluyente A: metanol/agua/trietilamina (90:10:0,1). Eluyente B: metanol/MTBE/agua/trietilamina (6:90:4:0,1). Gradiente: 99% de A de 0 a 8 min, 0% de A a los 45 min y 99% de A a los 50 min, manteniendo por 5 min. Flujo 1 mL/min Temperatura de la columna: 35 °C SISTEMA II Eluyente A: metanol/MTBE/agua/trietilamina (81:15:4:0,1) Eluyente B: metanol/MTBE/agua/trietilamina (6:90:4:0,1)	Patatas (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, todo <i>trans</i> -β-caroteno, violaxantina dimiristato, violaxantina miristato-palmitato, luteína dimiristato, zeaxantina dimiristato, luteína miristato-palmitato.	DAD-MS (APCI modo positivo, cuadrupolo)	Breithaupt y Bamedi (2002)

	<p>Gradiente: 99% de A en 0 min, 44% de A en 39 min, 0% de A en 45 min y 99% de A a los 50 min, manteniendo por 5 min. Flujo 1 mL/min Temperatura de la columna: 35 °C</p>				
<p>C₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 µm Pre-columna: no se aplica</p>	<p>Modo de elución: gradiente. Eluyentes: metanol/MTBE/agua (0,1% BHT y 0,05% TEA en los disolventes orgánicos) Gradiente: 90:5:5 en 0 min, 95:5:0 en 12 min, 89:11:0 en 25 min, 75:25:0 en 40 min, 50:50:0 en 60 min, 90:5:5 en 62 min. Flujo 1 mL/min.</p>	<p>Zumo de naranja concentrado</p>	<p>Luteoxantina, <i>cis</i>-auroxantina, auroxantina A, auroxantina B, anteraxantina, <i>cis</i>-luteoxantina, auroxantina C, <i>cis</i>-luteoxantina, mutatoxantina epímero A, luteína, mutatoxantina epímero B, zeaxantina, 9-<i>cis</i>-o 9'-<i>cis</i>-anteraxantina, 13-<i>cis</i>-o 13'-<i>cis</i>-β-criptoxantina, zeinoxantina, 9-<i>cis</i>-zeaxantina, β-criptoxantina, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, <i>cis</i>-ζ-caroteno, α-caroteno, β-caroteno, ζ-caroteno.</p>	<p>DAD</p>	<p>Meléndez-Martínez <i>et al.</i> (2008)</p>
<p>C₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 µm Pre-columna: no se aplica</p>	<p>Modo de elución: gradiente. Eluyente: metanol/MTBE/agua. Gradiente: De 81:15:4 en 0 min hacia 6:90:4 en 90 min Flujo 1 mL/min Temperatura de la columna: 25 °C</p>	<p>Pimientas: ají (<i>Capsicum baccatum</i> L.) y rocoto (<i>C. pubescens</i> R. & P.)</p>	<p>Violaxantina, neoxantina, <i>cis</i>-violaxantina, luteoxantina, 5,6-epoxi-capsantina, anteraxantina, <i>cis</i>-capsantina, capsorubina, mutatoxantina, luteína, capsantina, zeaxantina, α-criptoxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno.</p>	<p>DAD-MS (APCI modo positivo, cuadrupolo)</p>	<p>Rodríguez-Burruezo <i>et al.</i> (2010)</p>
<p>C₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 µm Pre-columna: no se aplica.</p>	<p>Modo de elución: gradiente. Eluyentes: metanol/éter terc-metilbutilico. Gradiente: De 95:5 para 70:30 en 30 min, 50:50 por 20 min y manteniendo esa proporción durante 15 min. Flujo 0,9 mL/min. Temperatura de la columna: 29 °C.</p>	<p>Mana-cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i>)</p>	<p>9'-<i>cis</i>-neoxantina, todo-<i>trans</i>-violaxantina, todo-<i>trans</i>-luteoxantina, 9-<i>cis</i>-violaxantina, 9-<i>cis</i>-luteoxantina, todo-<i>trans</i>-luteína, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, todo-<i>trans</i>-zeinoxantina, todo-<i>trans</i>-β-criptoxantina, 15-<i>cis</i>-β-caroteno, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, todo-<i>trans</i>-α-caroteno, todo-<i>trans</i>-β-caroteno, 9-<i>cis</i>-β-caroteno.</p>	<p>DAD-MS (APCI modo positivo, <i>ion trap</i>)</p>	<p>Rodrigues <i>et al.</i> (2013)</p>

C ₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: metanol/MTBE/agua (81:17:2). Eluyente B: metanol/MTBE/agua (10:88:2). Gradiente: 0% de B de 0 a 24 min, 100% de B a los 140 min, 0% de B a los 141 min. Flujo 0,8 mL/min.	Frutas tropicales: Corozo (<i>Aiphane- saculeate</i>), Sastra (<i>Garcinia intermedia</i>), Sapote (<i>Quararibea cordata</i>), Frutita (<i>Allophylus- psilospermus</i>), Maracuya chino (<i>Cionosicyos- macranthus</i>), y Mamey rojo (<i>Pouteria- sapota</i>)	Luteína, zeaxantina, 13- <i>cis</i> - 13'- <i>cis</i> -β-criptoxantina, β-criptoxantina, 13- <i>cis</i> - β-caroteno, ζ-caroteno, α-caroteno, zeaxantina monocaprato, 13- <i>cis</i> - 13'- <i>cis</i> -β-criptoxantina monolaurato, β-caroteno, zeaxantina monolaurato, β- criptoxantina monocaprilato, β-criptoxantina monocaprato, zeaxantina monopalmitato, zeaxantina dicaprato, β-criptoxantina monolaurato, zeaxantina caprato- laurato, β-criptoxantina monomiristato, zeaxantina dilaurato, β-criptoxantina monopalmitato, zeaxantina laurato-miristato, zeaxantina caprato-palmitato, zeaxantina dimiristato, zeaxantina laurato-palmitato, zeaxantina miristato- palmitato, zeaxantina dipalmitato, licopeno	DAD-MS (APCI modo positivo y negativo, cuadrupolo)	Murillo <i>et al.</i> (2013)
--	--	--	--	--	------------------------------------

la presencia de anteraxantina y β-criptoxantina. Meléndez-Martínez *et al.* (2008) separaron, entre otros carotenoides, isómeros geométricos de auroxantina, luteoxantina, anteraxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, β-caroteno, ζ-caroteno mediante el empleo de elución en fase reversa C₃₀. El perfil de carotenoides de frutos de *Capsicum* se evaluó mediante una columna C₃₀ (Rodríguez-Burruezo, González-Mas y Nuez, 2010) y se constató la presencia de los pigmentos característicos de este género, capsantina y capsorrubina.

Rodríguez, Mariutti y Mercadante (2013) determinaron un gran número de carotenoides de maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum*) como 9'-*cis*-neoxantina, violaxantina e isómeros, luteoxantina e isómeros, luteína, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, zeinoxantina, β-criptoxantina, 15-*cis*-β-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno, α-caroteno, β-caroteno y 9-*cis*-β caroteno. En la contribución de Murillo *et al.* (2013) se identificaron y separaron con éxito más de 30 carotenoides en forma libre, mono- y diesterificada en frutas tropicales mediante HPLC-DAD-MS en fase reversa.

TABLA 2. Ejemplos de metodologías para la separación por HPLC de carotenoides en muestras de tejidos biológicos

Características de la columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Carotenoides determinados	Método de detección	Referencia
<p>SISTEMA 1</p> <p>Fase reversa</p> <p>C₁₈</p> <p>Microsorb</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>Spheri-5-C₁₈,</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Fase normal</p> <p>Silica-based nitrile-bonded</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>nitrile-bonded</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>SISTEMA 2</p> <p>Fase reversa</p> <p>C₁₈</p> <p>Microsorb</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>Spheri-5-C₁₈,</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p>	<p>SISTEMA 1</p> <p>Fase reversa</p> <p>Modo de elución: gradiente</p> <p>Eluyente: acetonitrilo/metanol/diclorometano/hexano.</p> <p>85:10:2,5,2,5 de 0 a 10 min, alcanzando la proporción 45:22,5:22,5:10 en los 40 min.</p> <p>Flujo 0,7 mL/min.</p> <p>Fase normal</p> <p>Modo de elución: isocrático.</p> <p>Eluyente: hexano/diclorometano/metanol/N,N'-diisopropiletilamina</p> <p>74,65:25:0,25:0,10</p> <p>Flujo 0,7 mL/min.</p> <p>SISTEMA 2</p> <p>Fase reversa</p> <p>Modo de elución: gradiente</p> <p>Eluyente A: acetonitrilo/acetato (9:1)</p> <p>Eluyente B: hexano/diclorometano/metanol/N,N'-diisopropiletilamina 95% de A y 5% de B en 0 min, mantenimiento hasta 10 min, gradiente linear alcanzando 45% de A y 55% de B en 30 min.</p> <p>Flujo 0,7 mL/min</p> <p>Temperatura de la columna 25 °C</p>	<p>Suero humano y leche materna</p>	<p>ε,ε-caroteno-3,3'-diona, 3'-hidroxi-ε,ε-caroten-3-ona, 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, 3-hidroxi-β-ε-caroten-3'-ona, <i>cis</i>-3-hidroxi-β-ε-caroten-3'-ona, lactucaxantina, 13-<i>cis</i>-13'-<i>cis</i>-3<i>R</i>, 3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, todo-<i>trans</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, todo-<i>trans</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>-zeaxantina, todo-<i>trans</i>-3'-epiluteína, 9-<i>cis</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 9'-<i>cis</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 13-<i>cis</i>-luteína + 13'-<i>cis</i>-luteína, 9-<i>cis</i>-zeaxantina, 13-<i>cis</i>-zeaxantina, 15-<i>cis</i>-zeaxantina, 3<i>R</i>,6'<i>R</i>-3-hidroxi-3',4'-didehidro-β-γ-caroteno, 2',3'-anhidroluteína, α-criptoxantina, β-criptoxantina, <i>cis</i>-β-criptoxantina, licopeno, <i>cis</i>-licopeno, neurosporeno, γ-caroteno, ζ-caroteno, α-caroteno, todo-<i>trans</i>-β-caroteno, 9-<i>cis</i>-β-caroteno, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, todo-<i>trans</i>-fitoflueno, <i>cis</i>-fitoflueno, fitoeno</p>	<p>DAD-MS (ECNI)</p>	<p>Khachik <i>et al.</i>, 1997</p>

Microsorb-MV silica based nitrile-bond 250 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: isocrático Eluyente: hexano/ diclorometano/metanol/ N,N'-diisopropilamina 80:19,4:0.5:0,1 Flujo 1 mL/min	Mácula humana y retina periférica	Luteína, zeaxantina	DAD	Yemelyanov <i>et al.</i> , 2001
C ₁₈ Nucleosil 150 × 4,6 mm, 3 μm Precolumna: C ₁₈ , Vydac 250 × 4,6 mm, 5 μm y C ₁₈ , Hypersil 20 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: isocrático. Eluyente: acetonitrilo/metanol (50 mM acetato de amonio)/ agua/diclorometano 70:15:5:10 Flujo 2 mL/min	Plasma humano	Astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, equinona, todo- <i>trans</i> -licopeno, cis-licopeno, α-caroteno, todo- <i>trans</i> -β-caroteno, 9- <i>cis</i> -β-caroteno, 13- <i>cis</i> -β-caroteno	DAD	Lyan <i>et al.</i> , 2001
C ₃₀ YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Precolumna: C ₃₀ YMC, 10 × 4,6 mm Sumichiral OA-2000 YMC con grupo 3,5-dinitrobenzoil ligado 250 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: gradiente. Eluyente: MTBE/metanol/agua Gradiente: De 15:81:4 en 0 min hacia 74,9:21,1:4 en 70 min Flujo 1 mL/min Modo de elución: isocrático Eluyente: <i>n</i> -heptano/ diclorometano/2-propanol (70:25:5) Flujo 1 mL/min	Salmon salvaje (<i>Oncorhynchus</i> spp.) y salmon de piscicultura (<i>Salmo salar</i>), plasma humano	3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> -astaxantina, 3 <i>R</i> ,3' <i>S</i> -astaxantina, 3 <i>S</i> ,3' <i>S</i> -astaxantina	DAD	Rüfer <i>et al.</i> , 2008
C ₃₀ YMC 150 × 4,6 mm, 3 μm	Modo de elución: gradiente Eluyente: metanol (0.1% acetato de amonio)/MTBE Gradiente: 100% de metanol en 0 min, 85% de metanol en 45 min, 40% de metanol en 55 min, 30% de metanol en 60 min, manteniendo por 5 min, luego volviendo a 100% de metanol en 70 min	Plasma humano, pulmón de hurones	<i>Cis</i> -fitoeno, 15- <i>cis</i> -fitoeno, todo- <i>trans</i> -fitoeno, fitoflueno e isómeros, todo- <i>trans</i> -fitoflueno, di- <i>cis</i> -luteína, 15- <i>cis</i> -luteína, di- <i>cis</i> -zeaxantina, 13- <i>cis</i> -luteína, 13- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> -luteína, 15- <i>cis</i> -zeaxantina, 9- <i>cis</i> -luteína, di- <i>cis</i> -β-criptoxantina, 15- <i>cis</i> -β-criptoxantina, 9- <i>cis</i> -luteína, 13- <i>cis</i> -β-criptoxantina,	DAD	Meléndez-Martínez <i>et al.</i> , 2013

			13'- <i>cis</i> - β -criptoxantina, 9- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> - β -criptoxantina, 13- <i>cis</i> - α -caroteno, 9- <i>cis</i> - β -criptoxantina, 13'- <i>cis</i> - α -caroteno, 9'- <i>cis</i> - β -criptoxantina, 15- <i>cis</i> - β -caroteno, 13- <i>cis</i> - β -caroteno, todo- <i>trans</i> - α -caroteno, 9- <i>cis</i> - α -caroteno, 9'- <i>cis</i> - α -caroteno, todo- <i>trans</i> - β -caroteno, 9- <i>cis</i> - β -caroteno, isómeros di- <i>cis</i> de licopeno, 15- <i>cis</i> -licopeno, 9- <i>cis</i> -licopeno, todo- <i>trans</i> -licopeno, 5- <i>cis</i> -licopeno		
C ₃₀ YMC 150 x 2,0 mm, 5 μ m	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: metanol acetato de amonio 1M (98:2) Eluyente B: Acetato de etilo Gradiente: 100% de A en 0 min, 80% de A en 6 min, manteniendo esta proporción hasta 8 min, volviendo a 100% de A en 11 min Flujo 0.37 mL/min.	Leche materna, formula infantil y células Caco-2	13- <i>cis</i> -luteína, 13'- <i>cis</i> -luteína, todo- <i>trans</i> -luteína, 13- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> -zeaxantina, 9- <i>cis</i> -luteína, 9'- <i>cis</i> -luteína, α -criptoxantina, 9- <i>cis</i> -zeaxantina, β -criptoxantina, 15- <i>cis</i> - β -caroteno, 13- <i>cis</i> - β -caroteno, 13- <i>cis</i> - β -caroteno, α -caroteno, todo- <i>trans</i> - β -caroteno, 9- <i>cis</i> - β -caroteno, γ -caroteno, <i>cis</i> -licopeno, todo- <i>trans</i> -licopeno, 5- <i>cis</i> -licopeno	DAD	Lipkie <i>et al.</i> , 2014

Métodos HPLC en plasma y tejidos de origen animal

La tabla 2 incluye diferentes métodos para la determinación de carotenoides en plasma y tejidos de animales por HPLC. Khachik *et al.* (1997) identificaron 34 carotenoides, incluyendo trece isómeros geométricos y ocho metabolitos en muestras de leche y suero de madres lactantes: Para ello utilizaron HPLC (un sistema en fase normal y otro en fase reversa) y detección por MS y DAD. Luteína y zeaxantina se determinaron en muestras de retina utilizando un sistema de HPLC-DAD con la columna de sílice de fase normal (Yemelyanov, Katz

y Bernstein, 2001). Se han identificado trece carotenoides en muestras de plasma humano mediante separación en columna C₁₈. Entre los pigmentos carotenoides identificados se separaron los isómeros *cis* y *trans* de β -caroteno (Lyan *et al.*, 2001). Rüfer *et al.* (2008) emplearon un procedimiento de separación en fase reversa y columna quiral para separar los isómeros ópticos de astaxantina en la carne de salmón y plasma humano y pulmón de hurones. Un método para la determinación de carotenoides en hurones, plasma y pulmón humano fue desarrollado por Meléndez-Martínez *et al.* (2013), utilizando diferentes gradientes de elución con metanol/ MTBE y una columna C₃₀ para llegar a separar hasta 39

carotenoides. En un estudio sobre bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides presentes en la leche materna y fórmulas infantiles, los extractos se analizaron por HPLC en fase reversa mediante una columna C₃₀ (Lipkie *et al.*, 2014).

Métodos de UPLC

El desarrollo de columnas cromatográficas con tamaños de partícula menores a los tradicionales (3 o 5 micras) ha posibilitado la aparición de técnicas cromatográficas muy rápidas, como la cromatografía líquida de rápida resolución (*rapid resolution liquid chromatography*, RRLC) o la cromatografía líquida de ultra-resolución (*ultraperformance liquid chromatography*, UPLC). A veces se habla de cromatografía líquida de resolución ultra alta (*ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). Una de las mayores diferencias entre UPLC y HPLC es el tamaño de partícula de las columnas, que en el caso de la primera es inferior a 2 µm. En UPLC se opera a presiones considerablemente mayores, si bien se pueden conseguir análisis más rápidos (al ser posible disminuir los tiempos de retención), picos más estrechos (con lo que se mejora la relación señal-ruido) y mayor sensibilidad (Rivera y Canela-Garayoa, 2012)

Granado-Lorencio *et al.* (2010) compararon HPLC vs. UPLC para la determinación simultánea de biomarcadores del estado nutricional (vitaminas A, E, D y carotenoides individuales) y analizaron algunas de las diferencias significativas entre ambas técnicas (tabla 3). Así, el volumen de inyección puede ser del orden de diez veces menor en UPLC. Además el tiempo del análisis cromatográfico es menor, lo que se traduce a su vez en una reducción de la cantidad de disolvente empleada en cada muestra. Este ahorro es asimismo importante en términos

TABLA 3. Comparación UPLC vs HPLC

Características	UPLC	HPLC
Volumen de inyección	1 µL	10 µL
Flujo	0,5 mL/min	1,8 mL/min
Tiempo de análisis	4,5 min	30 min
Volumen fase móvil/análisis	< 2,5 mL	55 mL
Rendimiento (análisis/7,5 h)	Hasta 90 /día	Hasta 15/día
Volumen fase móvil	2,5 L	56 L

Fuente: Elaboración propia con base en Granado *et al.* (2010).

económicos, medioambientales y de productividad, ya que el número de muestras que se pueden analizar en una jornada de trabajo aumenta considerablemente.

A pesar de estas evidentes ventajas, hay que considerar que el análisis de carotenoides es particularmente complejo. Por ejemplo, en muchos casos se requieren columnas C₃₀ para conseguir una separación óptima de los carotenoides de interés, en especial de isómeros geométricos y ópticos. En este sentido, en un trabajo reciente se ha puesto de manifiesto que, dado que aún no existen columnas C₃₀ para UPLC, el uso de esta técnica para carotenoides está en muchos casos limitado (Bijttebier *et al.*, 2014).

Es necesario por lo tanto conocer los pros y los contras de estas técnicas rápidas de cromatografía líquida para decidir si son o no apropiadas para el objetivo del análisis. En la tabla 7 se resumen las características de algunos métodos de RRLC y UPLC usados para el análisis de carotenoides, algunos de los cuales se comentan con más detalle a continuación.

Stinco *et al.* (2014) desarrollaron un método de extracción (con y sin saponificación) y posterior separación mediante UPLC para el *screening* de isoprenoides (carotenoides, clorofilas y tocoferoles) en frutas y verduras. Mediante este método se pueden determinar de manera simultánea carotenoides típicos de la dieta (como violaxantina, luteína, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, licopeno, fitoeno y fitoflueno), cuatro tocoferoles y algunos pigmentos clorofílicos (clorofilas y feofitinas); la duración del análisis cromatográfico es de tan

sólo doce minutos. Para los análisis se usó una columna C₁₈ Poroshell 120 (2,7 μ m, 5 cm x 4,6 mm; Agilent, Palo Alto) cuya temperatura se mantuvo a 28 °C. El volumen de inyección de muestra osciló entre 10-20 μ L y el flujo fue de 1 mL/min. En la fase móvil se usaron tres disolventes, concretamente acetonitrilo (A), metanol (B) y acetato de etilo (C), de acuerdo con el siguiente gradiente: 0 min: 85% A+15% B; 5 min: 60% A+20% B+20% C; 7 min: 60% A+20% B+20% C; 9 min: 85% A+15% B; 12 min: 85% A+ 15% B.

TABLA 4. Características de algunos métodos de RRLC y UPLC aplicados al análisis de carotenoides

Referencia	Método	V.I. (μ L) ^a	Flujo (mL/min)	T.A. (min) ^b	Columna	T.C. (°C) ^c
Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2010	UPLC	1	0,5	4,5	HSS T3 column (2,1 x 100 mm; 1,8 μ m)	35
Hongyan Li <i>et al.</i> , 2011	UPLC	3	0,3	18	Phenomenex® Kinetex C ₁₈ (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m)	30
Bohoyo-Gil <i>et al.</i> , 2012	UPLC	1,4	0,3	10	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (2,1 x 50 mm; 1,8 μ m)	28
Rivera <i>et al.</i> , 2011	UPLC		0,4	15	ACQUITY UPLC®BEH 130 Å C ₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,7 μ m)	32
Stinco <i>et al.</i> , 2014	RRLC	10 a 20	1	12	C ₁₈ Poroshel 120 (5 cm x 4,6 mm; 2,7 μ m)	28
Delpino-Rius <i>et al.</i> , 2014	UPLC	5	0-6,5 min: 0,5	17	ACQUITY UPLC®BEH C ₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,7 μ m)	32
			6,5-13,6 min: 0,7 13,6-16,6 min: 0,5			
Bijttebier <i>et al.</i> , 2014	UPLC	1,25	0,5	23	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2,1 x 100; 1,7 μ m)	35
Bijttebier <i>et al.</i> , 2014	UPLC	1,25	0,5	23	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ SB (2,1 x 100; 1,7 μ m)	35

^a Volumen de inyección. ^b Tiempo de análisis cromatográfico. ^c Temperatura de la columna.

Li *et al.* (2012) usaron para el análisis de carotenoides de tomates una columna C₁₈ Phenomenex Kinetex (1.7 μm, 100 x 2,1 mm) y una fase móvil consistente en metanol:MTBE:agua (85:14:5, disolvente A) y metanol:MTBE:agua (90:5:5, disolvente B), de acuerdo con el siguiente gradiente: 0% A a 20% en 3 min. 20% A a 100% desde el minuto seis hasta el minuto quince. El flujo fue de 300 μL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de inyección fue de 3 μL.

Delpino-Rius *et al.* (2014) desarrollaron un método rápido para determinar el perfil de carotenoides de productos a base de frutas. Para la separación de los analitos se usó una columna ACQUITY UPLC TM BEH C₁₈ (1,7 μm; 2,1 mm x 100 mm) y una fase móvil con dos disolventes: ACN-MeOH (7:3) y H₂O (100%). El volumen de inyección fue 5 μL y la columna se mantuvo a 32 °C. Con esta metodología se detectaron un total de 27 carotenoides, entre los que se encontraban neoxantina, neocromo A y B, violaxantina, luteoxantina A y B anteraxantina, auroxantina A, B y C, zeaxantina, isómeros de luteína, α- y β-criptoxantina, β-caroteno, ζ-caroteno, fitoeno y fitoflueno.

Bohoyo-Gil *et al.* (2012) optimizaron un método UPLC para el análisis de carotenoides en alimentos. En concreto, describieron la separación de siete carotenoides en menos de 8.5 minutos, realizando una comparación en términos de resolución, selectividad, sensibilidad, tiempo y ahorro de solventes con un método HPLC. Para el análisis por HPLC usaron una columna C₁₈ Lichrosorb RP-18 (10 μm, 4.6 x 200 mm) y una fase móvil con acetonitrilo:metanol (85:25) (disolvente A) y acetonitrilo:metanol:acetato de etilo (60:20:20) (disolvente B) con 0.1% de BHT y 0.05% de TEA. El flujo fue de 1 mL/min. Para el análisis por UPLC se usó una columna C₁₈ Zorbax Eclipse Plus (1.8 μm, 2.1 x 50 mm) y una fase móvil con los mismos disolventes usados para el método de HPLC. El flujo 0.3 mL/min.

Con ambas metodologías se obtuvo una correcta resolución de los picos de capsantina, luteína, zeaxantina, criptoxantina y licopeno. No obstante, α- y β-caroteno no se separaron bien por HPLC pero sí por UPLC. Asimismo, observaron cambios en el orden de elución de algunos carotenoides como zeaxantina y luteína entre ambos métodos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (Gobierno de España) mediante el proyecto AGL-2013-42757-R.

REFERENCIAS

- Albert, K. 1998. *Trends in Analytical Chemistry* 17(10): 648-658.
- Almela, L., López-Roca, J.M. Candela, M.E. y Alcázar, M.D. 1991. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1606-1609.
- Bijttebier, S., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S. y Voorspoels, S. 2014. *Journal of Chromatography A* 1332: 46-56.
- Breithaupt, D.E. y Bamedi, A. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7175-7181.
- Britton, G. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. 1B: Spectroscopy*. Basilea: Birkhauser.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J. y White, W.S. 2004. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 396-403.
- Bohoyo-Gil, D., Dominguez-Valhondo, J., García-Parra, J. y González-Gómez, D. 2012. *European Food Research and Technology* 235: 1055-1061.
- Davies, B.H. 1976. En T.W. Goodwin (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, vol. 2*, Londres: Academic Press.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2005. *Food Research International* 38: 1073-1077.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5062-5072.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L. y Hornero-Méndez, D. 2014. *Food Research International* 65: 272-281.
- Delpino-Rius, A., Eras, J., Marsol-Vall, A., Vilaró, F., Balcells, M. y Canela-Garayoa, R. 2014. *Journal of Chromatography A* 1331: 90-99.
- Epler, K.S., Sander, L.C., Ziegler, R.G., Wise, S.A. y Craft, N.E. 1992. *Journal of Chromatography* 595: 89-101.
- Eugster, C.H. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Fernández, R.X.E., Shier, N.W. y Watkins, B.A. 2000. *Journal of Food Composition and Analysis* 13: 179-187.
- Ferruzzi, M.G., Sander, L.C., Rock, C.L. y Schwartz, S.J. 1998. *Analytical Biochemistry* 256: 74-81.
- Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Sander, L.C., Rock, C.L. y Schwartz, S.J. 2001. *Journal of Chromatography B* 760: 289-299.
- Fiksdahl, A., Mortensen, J.T. y Liaaen-Jensen, S. 1978. *Journal of Chromatography* 157: 111-117.
- Finckh, B., Kontush, A., Commentz, J., Hübner, C., Burdelski, M. y Kohlschütter, A. 1995. *Analytical Biochemistry* 232: 210-216.

REFERENCIAS

- Franko, M., Van Bovenkamp, P. y Bicanic, D. 1998. *Journal of Chromatography B* 718: 47-54.
- Franko, M. 2001. *Talanta* 54: 1-13.
- Gilmore, A.M. y Yamamoto, H.Y. 1991. *Journal of Chromatography A* 543: 137-145.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martínez, E. y Blanco, I. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 479-489.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I. y Pérez-Sacristán B. 2010. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1389-1393.
- Hermans, N., Cos, P., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J. y Bruyne, T. 2005. *Journal of Chromatography B* 822: 33-39.
- Hongyan, L., Deng, Z., Ronghua, L., Steven, L. y Rong, T. 2012. *Food Chemistry* 132: 508-517.
- Humphries, J.M. y Khachik, F. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1322-1327.
- Inbaraj, B.S., Lu, H., Hung, C.F., Wu, W.B., Lin, C.L. y Chen, B.H. 2008. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 812-818.
- Khachik, F., Beecher, G.R. y Whitaker, N.F. 1986. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 603-616.
- Khachik, F., Spangler, C.J., Smith Jr., J.C., Canfield, L.M., Steck, A. y Pfander, H. 1997. *Analytical Chemistry* 69: 1873-1881.
- Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 5: Nutrition and Health*, Basilea: Birkhauser.
- Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. y Godoy, H.T. 1990. *Food Chemistry* 35 (3): 187-195.
- Kopec, R.E., Cooperstone, J.L., Cichon, M.J. y Schwartz, S.J. 2012. En Z. Xu y L.R. Howard (eds.). *Analysis of Antioxidant-rich Phytochemicals*, Hobeston: John Wiley and Sons Ltd.
- Lee, I., Hamaguchi, H. y Shigeto, S. 2008. *Chemical Physics Letters* 466: 144-147.
- Lietz, G. y Henry, C.J.K. 1997. *Food Chemistry* 60: 109-117.
- Lipkie, T.E., Banavara, D., Shah, B., Morrow, A.L., McMahon, R.J., Jouni, Z.E. y Ferruzzi, M.G. 2014. *Molecular Nutrition and Food Research* 58: 2014-2022.
- Luterotti, S., Franko, M. y Bicanic, D. 1999. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21: 901-909.
- Luterotti, S., Sikovec, M. y Bicanic, D. 2000. *Talanta* 53:103-113.
- Luterotti, S., Franko, M. y Bicanic, D. 2002. *Journal of American Oil Chemists' Society* 79: 1027-1031.

REFERENCIAS

- Lyan, B., Azaïs-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Alexandre-Goubau, M.C. y Grolier, P. 2001. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 751: 297-303.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. y Mercadante, A.Z. 2012. *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 126-134.
- Mariutti, L.R.B., Pereira, D.M., Mercadante, A.Z., Valentão, P., Teixeira, N. y Andrade, P.B. 2012. *Marine Drugs* 10: 1498-1510.
- Meléndez-Martínez, A., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109: 546-553.
- Meléndez-Martínez, A., Stinco, C.M., Liu, C. y Wang, X.D. 2013. *Food Chemistry* 138: 1341-1350.
- Mercadante, A.Z. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Nueva York: CRC Press.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez, D. 1993. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1616-1620.
- Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Hornero-Méndez, D. y Pérez-Gálvez, A. 2002. En W.J. Hurst (ed.). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, Boca Raton: CRC Press.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A.J. y Mondello, L. 2013. *Food Chemistry* 140: 825-836.
- NIST, National Institute of Standards & Analysis. 2012. Slurried spinach. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 2385*.
- NIST. 2012a. Metabolites in Human Plasma. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1950*.
- NIST. 2012b. Fat Soluble Vitamins, Carotenoids, and Cholesterol in Human Serum. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 968e*.
- Oliver, J., Palou, A. y Pons, A. 1998. *Journal of Chromatography A* 829: 393-399.
- Panfili, G., Fratianni, A. e Irano, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6373-6377.
- Pfander, H. 1995. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Pfander, H. y Riesen, R. 1995. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basilea: Birkhauser.
- Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G. y Schwartz, S.J. 2002. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 633-640.

REFERENCIAS

- Rios, A.O. y Mercadante, A.Z. 2004. *Food Additives and Contaminants* 21: 125-133.
- Rivera, S. M. y Canela-Garayoa, R. 2012. *Journal of Chromatography A* 1224:1-10.
- Roca, M. y Mínguez-Mosquera, I. 2003. *Journal of Plant Physiology* 160: 451-459.
- Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B. y Mercadante, A.Z. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3022-3029.
- Rodríguez-Amaya, D. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington, D.C.: International Life Sciences Institute (ILSI) Press.
- Rodríguez-Amaya, D. y Kimura, M. 2004. *Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington, D.C. y Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI)/International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
- Rodríguez-Amaya, D. 2010. *Journal of Food Composition and analysis* 23: 726-740.
- Rodríguez-Burruezo, A., González-Mas, M.C. y Nuez, F. 2010. *Journal of Food Science* 75: S446-S453.
- Rüfer, C.E., Moeseneder, J., Briviba, K., Rechkemmer, G. y Bub, A. 2008. *British Journal of Nutrition* 99: 1048-1054.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Craft, N.E. y Wise, S.A. 1994. *Analytical Chemistry* 66: 1667-1674.
- Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M. y Albuquerque, Y.D.T. 2009. *Química Nova* 32: 2412-2416.
- Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Schmitz, H.H., Emenhiser, C. y Schwartz, S.J. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1212-1218.
- Schoefs, B. 2004. *Journal of Chromatography A* 1054:217-226.
- Scott, K.J. 1992. *Food Chemistry* 45: 357-364.
- Stewart, I. y Wheaton, T.A. 1971. *Journal of Chromatography* 55: 325-336.
- Stinco, C.M., Benítez-González, A.M., Hernanz, D., Vicario, I.M. y Meléndez-Martínez, A.J. 2014. *Journal of Chromatography A* 1370: 162-170.
- Su, Q., Rowley, K.G. y Balazs, N.D.H. 2002. *Journal of Chromatography B* 781: 393-418.
- Weston, A. y Brown, P.R. 1997. *HPLC and CE: Principles and practice*. Ámsterdam: Elsevier.
- Xavier, A.A.O., Mercadante, A.Z., Domingos, L.D. y Viotto, W.H. 2012. *Química Nova* 35: 2057-2062.

REFERENCIAS

- Yemelyanov, A.Y., Katz, N.B. y Bernstein, P.S. 2001.
Experimental Eye Research 72: 381-392.
- Yue, X., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W. y King, J.M. 2006.
Journal of Food Science 71: 239-241.