

Determinación de vitaminas del Complejo B en *Arthrospira maxima* por cromatografía líquida de alta resolución

The Determination of vitamin B-complex in Arthrospira maxima through high resolution liquid chromatography

FERNÁNDEZ-CÁRDENAS T, GONZÁLEZ-SAN MIGUEL H Y TRAVIESO L.

Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. San Lázaro y L.
CP 10400. Ciudad de La Habana. Cuba. E-mail: hildama@rect.uh.cu

RESUMEN

Se diseñan dos métodos para la extracción de las vitaminas del complejo B en muestras de *Arthrospira maxima* cubana. Para la determinación, se emplea un sistema HPLC formado por una columna de octadecilsilano y fases móviles de metanol - agua - ácido fosfórico 0.1 mol/L (20:79.5:0.5) para el análisis de la cianocobalamina y (30:69.5:0.5) para el resto de las vitaminas, empleando hexanosulfonato sódico 5 mM en ambos casos. Las velocidades de flujo son de 1 y 0.8 mL/min respectivamente. La determinación se realiza a 362 y 270 nm. Se observó que la *Arthrospira maxima* cultivada en Cuba constituye una rica fuente de vitaminas del grupo B presentando un contenido promedio de 3.1 mg/10g de tiamina, 4.0 mg/10g de riboflavina, 9.0 mg/10g de piridoxina, 0.29 mg/10g de cianocobalamina, 21 mg/10g de ácido nicotínico y 26 mg/10g de nicotinamida.

Palabras clave: vitaminas del complejo B. Métodos de extracción. *Arthrospira máxima*. Cromatografía líquida de alta resolución.

ABSTRACT

Two methods for the extraction and determination of B-complex vitamins in Cuban Arthrospira maxima samples are described. High performance liquid chromatography was employed using a column of octadecylsilane and mobile phase containing metanol-agua-0.1M, orthofosforic acid (20:79.5:0.5) were used in the analysis of cyanocobalamine and (30:69.5:0.5) for the remaining vitamins. 5 mM sodium hexanosulfonate was used as ion pair. Flow rates were set at 1 mL/min and 0.8 mL/min and injection volumes at 20 and 100 µL. Vitamin determinations at 362 and 270 nm using a diode array detector produced good results. High detection values for B-complex vitamins in Cuban Arthrospira maxima were obtained.

KEY WORDS: Extraction methods. B-complex vitamins. *Arthrospira maxima*. High performance liquid chromatography.

INTRODUCCION

Se conoce que en los alimentos se encuentran las fuentes tradicionales de obtención de vitaminas, sin embargo los investigadores continuamente buscan otras fuentes no convencionales para obtener estos componentes indispensables en la dieta. Las algas son una importante fuente de vitaminas, aunque en la actualidad son los países

INTRODUCTION

It is a well known fact that traditional sources for vitamins are to be encountered in foodstuffs. However, researchers are continually engaged in the search for other non-conventional sources in order to obtain these indispensable dietary components. Although algae represent a major source for vitamins, currently it is mainly the Asiatic

asiáticos los que mayormente la incorporan en la alimentación (1-3).

En el presente trabajo, se estudian las vitaminas del grupo B presentes en la *Arthrospira máxima* cultivada en Cuba con el objetivo de evaluar su potencial como fuente de suministro de estos nutrimentos. Este trabajo parte de estudios desarrollados en otros países con semejantes propósitos (4).

La *Arthrospira* es conocida por su elevado contenido intracelular de proteínas. También se han reportado importantes niveles de pigmentos y lípidos así como ácidos grasos. La pared celular de esta alga es frágil lo cual resulta favorable al evaluarla como posible fuente de vitaminas (5, 6).

La Association of Official Analytical Chemists (7) ha recomendado la determinación de vitaminas del complejo B mediante métodos microbiológicos, espectrofotométricos y fluorométricos: estas técnicas también han sido sugeridas para la cuantificación de vitaminas en la *Spirulina platensis* (1-3). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la principal vía de análisis de las mezclas de vitaminas (8-10) y más recientemente, la electroforesis capilar ha sido empleada para llevar a cabo la separación de mezclas de vitaminas (11-14).

Los detectores fluorométricos y espectrofotométricos acoplados a HPLC han sido empleados para el análisis de las vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂ y la nicotinamida tanto en preparaciones farmacéuticas como en fuentes naturales; la cromatografía de fase reversa ha sido muy utilizada en el estudio de estos compuestos (8, 10, 15). Para mejorar los resultados del análisis cromatográfico se ha incorporado la utilización de pares iónicos (16,17).

La determinación simultánea de vitaminas constituye una vía muy favorable para el análisis, aplicable en diferentes fuentes naturales. La complejidad de las matrices naturales, en particular las algas, hace necesario el empleo de procedimientos de purificación seguidos de lavados exhaustivos para garantizar una adecuada recuperación de las vitaminas (15, 18, 19). De esta forma, se encuentran reportes en los cuales se aplica el intercambio iónico, así como tratamientos químicos y enzimáticos unidos a extracción en fase sólida para llevar a cabo la preparación de las muestras.

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos al emplear procedimientos de ex-

countries that have incorporated them into their foodstuffs¹⁻³.

In the present work B-group vitamins present in *Arthrospira maxima* cultivated in Cuba are studied in order to evaluate the potential of this alga as a source of supply for these nutrients. This work represents a continuation of studies developed in other countries with similar objectives⁴.

Arthrospira maxima is well known for its high intracellular protein content. Additionally, high levels of pigments, lipids and acidic fats have been reported. The fragility of the cellular wall of this alga proves favourable in its evaluation as a possible source of vitamins^{5,6}.

The Association of Official Analytical Chemists⁷ recommends the determination of B-complex vitamins through microbiological, spectrophotometric and fluorometric methods. These techniques have also been suggested for the quantification of vitamins in *Spirulina platensis*¹⁻³. High performance liquid chromatography (HPLC) has provided the main method of analysis of vitamin mixtures⁸⁻⁹ and more recently, capillary electrophoresis has been employed to carry out the separation of vitamin mixtures¹¹⁻¹⁴.

In both pharmaceutical preparations and in natural sources, fluorometric and spectrophotometric detectors coupled to HPLC have been employed in the analysis of vitamins B₁, B₂, B₆, B₁₂ and nicotinamide. Reversed phase chromatography has been widely used in the study of these compounds^{8,10,15} and in order to improve the results of chromatographic analysis the use of ionic pairs has been introduced^{16,17}.

The simultaneous determination of vitamins constitutes a highly useful method of analysis and may be applied to different natural sources. The complexity of natural matrices, in particular algae, make the use of purification processes followed by exhaustive washing procedures necessary in order to guarantee an adequate recovery of vitamins^{15,18,19}. Such processes involve work in which ionic interchanges are applied, as well as chemical and enzymatic treatments in solid phase extractions, in order to carry out the preparation of the samples.

The current work presents the results obtained employing extraction and purification procedures for thiamine, riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin, nicotinamide and nicotinic acid in *Arthrospira maxima*. The identification and

tracción y purificación de tiamina, riboflavina, piridoxina, cianocobalamina, nicotinamida y ácido nicotínico en *Arthrospira maxima*. La identificación y cuantificación de las vitaminas mediante HPLC fue aplicada después de aislar y purificar los factores vitamínicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

En el estudio se utilizó cianocobalamina, ácido nicotínico, nicotinamida, tiamina, riboflavina y piridoxina estándares USP. Los reactivos empleados fueron: ácido ortofosfórico (Fluka, Buchs, Suiza), metanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania), hexanosulfonato de sodio y cianuro de sodio (BDH, Poole, UK). El agua fue purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USES); ácido clorhídrico (Panreac, España). Se empleó papaina y diastasa para fines bioquímicos (BDH, Poole, UK).

Sistema cromatográfico

El sistema HPLC consistió en bombas marca Pharmacia LKB, modelo 2248 (Uppsala, Sweden), inyector manual Rheodyne equipado con reguladores de volumen de 20 y 100 μ L, columna Spherisorb ODS-2 (250 X 4.6 mm I.D., 5 μ m), así como un detector diodo array marca Pharmacia LKB-Bromma, modelo 2140 (Uppsala, Suecia) programado a una longitud de onda de 362 nm para la cianocobalamina y 270 nm para el resto de las vitaminas. El sistema cromatográfico fue controlado mediante el sistema HPLC manager version 3.01 de Pharmacia LKB, Biotechnology AB (Uppsala, Suecia). La integración de los picos se realizó por la versión 5.0 del programa Nelson.

Fase móvil para el análisis de Cianocobalamina: metanol - agua - ácido fosfórico 0.1 mol/L (20:79.5:0.5). Flujo, 0.8 mL/min.

Fase móvil para tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, nicotinamida: metanol - agua - ácido fosfórico 0.1 mol/L (30:69.5:0.5) 5 mM en hexanosulfonato de sodio. Flujo, 0.8 mL/min.

quantification of the vitamins through HPLC was applied after isolating and purifying the vitamin elements.

EXPERIMENTAL EVIDENCE

Reactives

In the study, cyanocobalamine, nicotinic acid, nicotinamide thiamine, riboflavin and standard pyridoxine USP were used. The reactives used were: orthophosphoric acid (Fluka, Buchs, Switzerland), methanol HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany), sodium hexanosulphonate and sodium cyanide (BDH, Poole, UK). The water was purified in a mili-Q system (Millipore, Milford, MA, USES); hydrochloric acid (Panreac, Spain). Papain and diastase were employed for biochemical uses (BDH, Poole, UK).

Chromatographic system

The HPLC system consisted of Pharmacia LKB pumps model 2248 (Uppsala, Sweden), a Rheodyne manual injector equipped with volume regulators of 20 & 100 μ L, Spherisorb ODS-2 column (250 X 4.6 mm I.D., 5 μ m), as well as a Pharmacia LKB-Bromma diode array detector model 2140 (Uppsala, Sweden) programmed at a wave length of 362 nm for cyanocobalamine and 270 nm for the remaining vitamins. The chromatographic system was controlled by the Pharmacia LKB HPLC system manager, version 3.01, Biotechnology AB (Uppsala, Sweden). The integration of the peaks was carried out by the 5.0 version of the Nelson program.

Mobile phase in the analysis of cyanocobalamine: methanol – water- phosphoric acid 0.1 mol/L (20:79.5:0.5). Flow, 0.8 mL/min.

Mobile phase for thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinic acid, and nicotinamide: methanol – water- phosphoric acid 0.1 mol/L (30:69.5:0.5). Flow, 0.8 mL/min.

Preparación de las muestras

Los patrones de tiamina, piridoxina, cianocobalamina, ácido nicotínico y nicotinamida se emplearon a una concentración de 0.5 mg/mL y el de riboflavina a 0.05 mg/mL, todos en solución de HCl 0.1 N.

Se analizaron muestras secas de *Arthrospira máxima* proporcionadas por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba, en forma de polvo fino con un tamaño de partícula de 200 μ m y de color verde azul oscuro. Se realizaron repetidos procesos de congelación y descongelación para lograr la ruptura de la pared celular.

Procedimiento 1 – Tratamiento para el análisis de cianocobalamina

Para la determinación de la cianocobalamina se tomaron 10 g de muestra seca y se añadieron 50 mL de agua y una solución de cianuro de sodio al 1%, ajustando el pH entre 4.6-5 y colocando en baño de agua a 60° C por una hora. La purificación del extracto se hace añadiendo un exceso de acetona y centrifugando a 3000 r.p.m. durante 5 min, se recolectó el sobrenadante y se evaporó en rotavapor para eliminar la acetona remanente, filtrando y llevando a volumen con agua.

Procedimiento 2 – Tratamiento para el análisis de tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y nicotinamida

Para el análisis del resto de las vitaminas se pesaron 50 g de muestra y se adicionaron 60 mL de HCl 0.1 N. La muestra se calentó entre 80-100°C por una hora; adicionando posteriormente una solución de diastasa recientemente preparada (1 mg en 15 mL de agua) y ajustando el pH a 4.5, manteniéndolo a 37°C durante 4 horas. La muestra se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 5 min, filtrando el sobrenadante y añadiéndole un exceso de acetona. Se centrifugó nuevamente, y se evaporó en rotavapor para eliminar el exceso de acetona y llevando a volumen final con HCL 0.1 N.

Preparation of the samples

Standard of thiamine, pyridoxine, cyanocobalamine, nicotinic acid and nicotinamid were used at a concentration of 0.5 mg/mL and for riboflavin at 0.05 mg/mL, all of which were used in HCl 0.1 N solution.

Dried samples of *Arthrospira maxima*, in the form of a fine powder with a particle size of 200 μ m and dark blue-green in colour, were analysed. These samples were provided by the National Scientific Research Centre of Cuba. Repeated freezing and defrosting processes were carried out until the rupture of the cellular wall had been achieved.

Procedure 1 – Treatment for the analysis of cyanocobalamine

For the determination of cyanocobalamine, 10g of the dry sample were taken to which 50mL of water and a solution of sodium cyanide at 1% were added. After adjusting the pH to 4.6-5, the solution was placed in a water bath at 60° C for an hour. The purification of the extract was achieved by adding an excess of acetone, and centrifuging at 3000 r.p.m. for 5 min. Subsequently, the supernatant fraction was collected and was evaporated in a rotovapor system in order to eliminate residual acetone. Filtering and volume restoration with water were then carried out.

Procedure 2 – Treatment for the analysis of thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinic acid and nicotinamide

In the analysis of the remaining vitamins, 50g of the sample were weighed adding 60mL of HCl 0.1 N. The sample was heated to between 80-100°C for one hour and a solution of diastase (1 mg in 15 mL of water) prepared shortly beforehand, was then added. After adjusting the pH to 4.5, the solution was maintained at 37°C for 4 hours. The sample was centrifuged at 3000 r.p.m for 5 min, the supernatant was filtered and an excess of acetone was added. Subsequently, centrifugation was repeated and the sample was evaporated in a rotavapor to eliminate excess acetone. HCl 0.1 N was used for final volume restoration.

Determinación de las vitaminas del complejo B en las muestras de Arthrospira máxima.

Se empleó un volumen de inyección de 100 μL y la detección a 362 nm para el análisis de la cianocobalamina. En las restantes vitaminas el volumen de inyección fue de 20 μL y la detección se realizó a 270 nm.

Para el análisis cualitativo se procedió a comparar los tiempos de retención de las señales obtenidas en las muestras de *Arthrospira maxima* frente a patrones de cada una de las vitaminas ensayadas. También se realizó adición de patrones a las muestras para medir el aumento de la señal cromatográfica, empleando para ello el programa integrador del equipo. Como confirmación, se realizó el análisis espectral de cada señal cromatográfica obtenida con ayuda del detector diodo array.

Para la cuantificación de todos los factores vitamínicos se empleó el método de curva de calibrado. En la curva de la cianocobalamina se parte de una solución madre de 0.1 mg/mL mientras que para el resto de las vitaminas se emplean soluciones madres de 0.5 mg/mL a partir de las cuales se obtienen los 5 puntos de la curva realizando las determinaciones por triplicado. Los rangos de concentración oscilan entre: 30-100 $\mu\text{g/mL}$ (Tiamina), 1.25-12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Riboflavina), 5-15 $\mu\text{g/mL}$ (Piridoxina), 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ (Acido Nicotínico), 1-10 $\mu\text{g/mL}$ (Nicotinamida) y 4-40 $\mu\text{g/mL}$ (Cianocobalamina).

El límite de detección y cuantificación, la precisión y la exactitud del método se determinó a partir de la recta de calibrado para cada vitamina (20).

Los cromatogramas obtenidos fueron evaluados, determinándose en cada caso los valores de área bajo la curva correspondientes, empleando las rectas de calibrado para hallar el valor de concentración para cada una de las vitaminas. Para el cálculo del contenido de tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y nicotinamida se empleó la ecuación 1 y la ecuación 2 para la cianocobalamina.

$$A = 450 C_{iny} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$A = 3 C_{iny} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde: A son los mg de vitamina en 100 g de alga seca; C_{iny} , concentración de la muestra inyectada.

The determination of B-complex vitamins in samples of Arthrospira máxima.

An injection volume of 100 μL and detection at 362 nm were used in the analysis of cyanocobalamine. For the remaining vitamins, the injection volume was 20 μL and detection was carried out at 270 nm.

For the purposes of qualitative analysis, the retention times of the signals obtained in the samples of *Arthrospira maxima* were compared with the standards for each of the vitamins tested. Additionally, the standards of the samples were added in order to measure the increase in the chromatographic signal using the integrated program of the system. As a means of confirmation, a spectral analysis of each of the chromatographic signals obtained was carried out with the aid of a diode array detector.

In the quantification of all vitamin factors the calibration curve method was employed. The cyanocobalamine curve proceeds from a mother solution of 0.1 mg/mL while in the case of the remaining vitamins, mother solutions of 0.5 mg/mL were used from which the 5 points of the curve are obtained. The point determinations were triplicated. Concentration ranges oscillate between: 30-100 $\mu\text{g/mL}$ (Thiamine), 1.25-12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Riboflavin), 5-15 $\mu\text{g/mL}$ (Pyridoxine), 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ (Nicotinic acid), 1-10 $\mu\text{g/mL}$ (Nicotinamide) y 4-40 $\mu\text{g/mL}$ (Cyanocobalamine).

The detection limit and quantification, the precision and exactness of the method was determined from the calibrated straight for each vitamin (20).

The chromatograms obtained were evaluated. The corresponding values for the lower areas of the curves were determined, using the calibrated straights to ascertain concentration values for each vitamin. In the calculation of thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinic acid and nicotinamide contents, equation 1 was applied and for cyanocobalamine equation 2.

$$A = 450 C_{inj} \quad (\text{Equation 1})$$

$$A = 3 C_{inj} \quad (\text{Equation 2})$$

where: A represents mg of vitamin per 100g of dry alga; c_{inj} , concentration of the injected sample.

El cálculo de la recuperación se realizó mediante el análisis de patrones de cada una de las vitaminas sometidos a los procedimientos extractivos (Procedimientos 1 y 2). Después de aplicar el procedimiento correspondiente, se procedió al análisis cromatográfico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las muestras provenientes de productos naturales, utilizados para la cuantificación de vitaminas hidrosolubles, tienen que ser sometidas a un procesamiento previo indispensable para dicho análisis. Las muestras de microalgas, debido a sus características estructurales resultan relativamente fáciles de procesar debido a la fragilidad de su pared celular, la cual se rompe al ser sometida a continuos procesos de congelación - descongelación.

Para lograr una extracción satisfactoria de algunas vitaminas del complejo B, fue necesario disgregar en HCl y luego calentar ligeramente las muestras. Esto garantiza la hidrólisis de los complejos vitamina-proteína ya que en las formas naturales las vitaminas se hallan en muy pequeñas cantidades en su forma libre. Para el análisis de cianocobalamina, generalmente se convierten todas las cobalaminas por tratamiento con cianuro, lo que simultáneamente libera a las cobalaminas de sus formas combinadas con proteínas y hace innecesaria la extracción con ácido en caliente.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las vitaminas son sustancias termolábiles y fotosensibles que pudieran degradarse a través de los procedimientos extractivos aplicados, se evaluó el porcentaje de recuperación obtenido con los patrones de vitaminas tratados de forma similar que las muestras de microalgas. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos por HPLC para estos patrones. Puede apreciarse que los estándares de vitamina no sufrieron afectación y se obtuvieron altos valores de porcentaje de recuperación a partir del contenido inicial en las muestras. Este resultado permite afirmar que el proceso de extracción y purificación desarrollado es seguro para evaluar las vitaminas presentes en el alga.

The calculation of recovery was applied through the analysis of the standards of each of the vitamins subjected to extraction procedures (procedures 1 & 2). After the application of the corresponding procedure, the chromatographs were analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

The quantification of hydrosoluble vitamins originating from samples of natural products must be subjected to previous processing for such an analysis. The samples of microalgae are relatively easily processed due to their structural characteristics. The fragility of the cellular wall lends itself to breakage through freezing and defrosting processes.

In order to achieve a satisfactory extraction of some of the B-complex vitamins, it was necessary to employ a removal process in HCl and subsequently, lightly heat the samples. This procedure guarantees the hydrolysis of vitamin-protein complexes given that vitamins in a natural form are found, as a liberated substance, in very small quantities. In the analysis of cyanocobalamine, all cobalamines are generally converted through cyanide treatment which simultaneously liberates the cobalamines from their combined forms with proteins, rendering extraction with hot acid unnecessary.

Taking into account that most of the vitamins are thermolabile and photosensitive substances which can be degraded through the extraction processes applied, the percentage of recovery obtained with the treated vitamin standards that were treated in a similar way as the microalgae samples, was evaluated. In table 1 the results obtained for HPLC for these standards are shown. Vitamin standards were not seen to be affected and high recovery percentage values from the initial content in the samples were obtained. This result allows us to confirm that the extraction and purification process developed is reliable for evaluating the vitamin content present in the alga.

TABLA I.- Porcentaje de recuperación de los estándares de vitaminas sometidas al procesamiento 1 y 2.

Vitamina	Recuperación (%) \pm SD
Tiamina	97 \pm 0.4
Riboflavina	98 \pm 0.7
Piridoxina	99 \pm 0.5
Ac. Nicotínico	100 \pm 0.7
Nicotinamida	100 \pm 0.8
Cianocobalamina	100 \pm 1.0

TABLE 1.- The recovery percentage of the vitamin standards subjected to processes 1 & 2.

Vitamin	Recovery (%) \pm SD
Thiamine	97 \pm 0.4
Riboflavin	98 \pm 0.7
Pyridoxine	99 \pm 0.5
Ac. Nicotinic	100 \pm 0.7
Nicotinamide	100 \pm 0.8
Cyanocobalamine	100 \pm 1.0

Evaluación de las características de la separación cromatográfica

Considerando las características complejas de la muestra en estudio, se evaluaron los diferentes parámetros cromatográficos ya que los sistemas de fase móvil empleados son usuales en el análisis de preparados farmacéuticos, pero no por eso aplicables al tipo de matriz evaluada en nuestro caso. Se consideraron los parámetros de factor de capacidad (K), el número y altura del plato teórico (N,H), el factor de selectividad (α) y el factor de resolución (Rs), como plantea Quattrocchi y col. 1992.

Para la altura y el número del plato teórico no existe una exigencia reportada, esto indica una eficiencia conjunta de todo el sistema cromatográfico. En las condiciones de trabajo se obtuvo 2784 platos teóricos con una altura de 0.089.

El factor de capacidad es un indicador de la interacción de las vitaminas con la fase estacionaria (Tabla 2). En todos los casos los valores de

Evaluation of the characteristics of chromatographic separation

Considering the complex characteristics of the sample studied, the different chromatographic parameters were evaluated, given that the mobile phase systems, which are usually employed in the analysis of pharmaceutical preparations, may not be applied to the type of matrix evaluated in our study. As contemplated by Quattrocchi²⁰ & cols, the parameters of capacity factor (K), the number and height of the theoretical plate (N,H) the selectivity factor (α) and the factor of resolution (Rs) were considered (1992).

For the height of the theoretical plate, no existing requirements have been reported. This indicates that the overall chromatographic system is efficient. Under the conditions in which the work was carried out, 2784 theoretical plates were obtained with a height of 0.089.

The capacity factor is an indicator of the interaction of the vitamins with the stationary phase (Table 2). In all cases, k values were found to

k están entre 1-20 que es el rango establecido para muestras complejas.

be between 1-20, representing established ranges for complex samples.

TABLA 2.- Evaluación del factor de capacidad (k), factor de separación (α) y resolución (Rs) de la separación cromatográfica.

Vitamina	k	α	Rs
Tiamina	18.3	1.4	103
Riboflavina	13.5	1.2	40.6
Piridoxina	6.8	1.5	104
Ac. Nicotínico	4.18	1.12	7.6
Nicotinamida	2.54	1.2	86
Cianocobalamina	8.12	2.47	7.5

TABLE 2.- The evaluation of capacity factor (k), separation factor (α) and resolution (Rs) of the chromatographic separation.

Vitamin	k	α	Rs
Thiamine	18.3	1.4	103
Riboflavin	13.5	1.2	40.6
Pyridoxine	6.8	1.5	104
Ac. Nicotinic	4.18	1.12	7.6
Nicotinamide	2.54	1.2	86
Cyanocobalamine	8.12	2.47	7.5

En cuanto a la separación y posible superposición de bandas, fueron evaluados los valores del factor de separación y resolución. Para ello se determinó la selectividad entre cada vitamina y la señal consecutiva, obteniéndose en ambos casos valores superiores a uno por lo que puede afirmarse que no hay ningún caso de solapamiento entre las respuestas cromatográficas.

With regard to the separation and possible superimposition of bands, the values of separation factor and resolution were determined. In order to do so, the selectivity among each vitamin and the consecutive signal were determined. In both cases values greater than one were obtained, allowing us to confirm that overlapping chromatographic responses did not occur.

Determinación de las Vitaminas del Complejo B en las muestras de Arthrospira maxima

The determination of B complex vitamins in the samples of Arthrospira maxima

Los cromatogramas de *Arthrospira maxima* procesados según el Procedimiento 1 muestran una señal con tiempo de retención de 21 min similar al del patrón de cianocobalamina; para confirmar este hecho se adicionó una solución de cianocobalamina y se observó un aumento de la señal cromatográfica.

The chromatograms of the processed *Arthrospira maxima* in accordance with process 1, show a signal with a retention time of 21 min, bearing similarities with the cyanocobalamine standard.

En las muestras tratadas por el Procedimiento 2 se aprecian señales con tiempos de retención

In the samples treated in accordance with process 2, signals with retention times close to those of Nicotinamide (5.4 min.), Nicotinic acid (4.5 min), Pyridoxine (6.9 min), Riboflavin (9.1 min) and Thiamine (19.1 min), may be obser-

cercanos al de la Nicotinamida (5.4 min.), el Acido Nicotínico (4.5 min), la Piridoxina (6.9 min), la Riboflavina (9.1 min) y la Tiamina (19.1 min), lo cual fue confirmado por la adición de patrones de estas vitaminas con el consecuente aumento de las señales cromatográficas señaladas para cada caso. El análisis espectral de las señales cromatográficas mostró espectros similares al de los patrones de las correspondientes vitaminas, esto permitió confirmar la presencia de estos factores vitamínicos en las muestras de *Arthrospira máxima*.

Para la cuantificación de las vitaminas del complejo B, se empleó el método de curva de calibrado. En la evaluación de cada vitamina, se comprobó la linealidad de la respuesta analítica (Tabla 3).

ved. Confirmation of such was achieved through the addition of the standards of these vitamins, which resulted in the consequential increase in the chromatographic signals established for each case. The spectral analysis of the chromatographic signals showed similar spectra to those obtained for the corresponding vitamin standards. This allowed us to confirm the presence of these vitamin factors in samples of *Arthrospira maxima*.

In the quantification of vitamin B-complexes, the calibration curve method was employed. In the evaluation of each vitamin, the linearity of the analytical response was checked (Table 3).

TABLA 3.- Evaluación estadística del ensayo de linealidad.

Parámetro y criterios de aceptación	B ₁	B ₂	B ₆	B ₁₂	Acido Nicotínico	Nicotinamida
Coef. de correlación $r \geq 0.99$	0.9967	0.9950	0.9993	0.9991	0.9911	0.9931
Coef. de determinación $r^2 \geq 0.98$	0.9918	0.9954	0.9849	0.9983	0.9823	0.9825
Hipótesis nula (ordenada en el origen) $t_{exp} < (3.18)$	$t = 2.04$	$t = 0.07$	$t = 1.77$	$t = 1.00$	$t = 2.66$	$t = 2.95$
Hipótesis nula (pend.) $\beta \cong 1, p \ll 1$	$\beta = 0.9978$ $p = 3.10^{-4}$	$\beta = 0.9881$ $p = 4.10^{-4}$	$\beta = 0.9942$ $p = 3.10^{-4}$	$\beta = 0.9990$ $p = 1.10^{-5}$	$\beta = 0.9961$ $p = 4.10^{-4}$	$\beta = 0.9899$ $p = 8.10^{-4}$

TABLE 3.– The statistical evaluation of linearity tests.

parameter adaptation criteria	B ₁	B ₂	B ₆	B ₁₂	Nicotinic acid	Nicotinamide
Coef. of correlation $r \geq 0.99$	0.9967	0.9950	0.9993	0.9991	0.9911	0.9931
Coef. of determination $r^2 \geq 0.98$	0.9918	0.9954	0.9849	0.9983	0.9823	0.9825
Null hypothesis (ordered in origin) $t_{exp} < (3.18)$	$t = 2.04$	$t = 0.07$	$t = 1.77$	$t = 1.00$	$t = 2.66$	$t = 2.95$
Null hypothesis (pend.) $\beta \equiv 1, p \ll 1$	$\beta = 0.9978$ $p = 3.10^{-4}$	$\beta = 0.9881$ $p = 4.10^{-4}$	$\beta = 0.9942$ $p = 3.10^{-4}$	$\beta = 0.9990$ $p = 1.10^{-5}$	$\beta = 0.9961$ $p = 4.10^{-4}$	$\beta = 0.9899$ $p = 8.10^{-4}$

La precisión del sistema expresada en términos de repetibilidad y reproducibilidad muestran coeficientes de variabilidad menores del 2% (Tabla 4).

The precision of the system expressed in terms of repeatability and reproducibility present coefficients of variability lower than 2% (Table 4).

TABLA 4.– Precisión y Exactitud del método.

Vitaminas	Conc. $\mu\text{g/mL}$	Repetibilidad CV (%)	Reproducibilidad CV %	Exactitud		
				CV %	T_{exp}	% R_{medio}
B1	30	0,80	0,52	0,37	2,2	100,4
	70	0,50				
	100	0,48				
B2	1,25	1,01	1,48	0,68	0,14	99,8
	5	1,50				
	12,5	0,54				
B6	5	1,38	0,88	0,47	2,05	100,2
	8,5	1,13				
	15	0,65				
Acido Nicotínico	2,5	1,68	1,13	0,77	2,1	100,7
	7	0,78				
	10	0,98				
Nicotinamida	1	1,01	1,45	0,96	2,08	100,4
	5	1,21				
	10	0,64				
B12	4	0,9	1,0	0,7	0,46	99,8
	20	1,0				
	40	1,0				

TABLE 4.– Precision and Exactness of the method.

Vitamins	Conc. µg/mL	Repeatability CV (%)	reproducibility CV (%)	Exactness		
				CV (%)	T _{exp}	% R _{ave}
B1	30	0,80	0,52	0,37	2,2	100,4
	70	0,50				
	100	0,48				
B2	1,25	1,01	1,48	0,68	0,14	99,8
	5	1,50				
	12,5	0,54				
B6	5	1,38	0,88	0,47	2,05	100,2
	8,5	1,13				
	15	0,65				
Nicotinic acid	2,5	1,68	1,13	0,77	2,1	100,7
	7	0,78				
	10	0,98				
Nicotinamide	1	1,01	1,45	0,96	2,08	100,4
	5	1,21				
	10	0,64				
B12	4	0.9	1.0	0.7	0.46	99.8
	20	1.0				
	40	1.0				

La exactitud de un método refleja el error sistemático, el análisis de la prueba t de Student demuestra que con una probabilidad de 0.05 y 8 grados de libertad el valor de t_{exp} es menor que el de t_{teo} , por lo que el valor medido no difiere del esperado.

También se evaluaron los límites de detección y cuantificación siendo de 0.3 y 0.6 en la B1, 0.015 y 0.025 en la B2, 0.08 y 0.1 en la B6, 0.035 y 0.05 para el ácido nicotínico, 0.017 y 0.02 en la nicotinamida y 1 y 3 µg/mL para la B12. Como puede verse los valores estadísticos de evaluación de cada parámetro responden a las exigencias consideradas, por lo que podemos considerar que el método es adecuado para llevar a cabo el estudio del contenido vitamínico en la fuente natural en estudio.

The exactness of a method reflects systematic error. The analysis of the student's t test shows that with a probability of 0.05 y 8 degrees of liberty, the t_{exp} value is lower than that for t_{teo} , and for this reason the average value does not differ from that to be expected.

The limits of detection and quantification were also evaluated giving values of 0.3 & 0.6 in B1, 0.015 & 0.025 in B2, 0.08 & 0.1 in B6, 0.035 & 0.05 for nicotinic acid, 0.017 & 0.02 in nicotinamide and 1 & 3 µg/mL for B12. It can be observed that the statistical values of evaluation of every parameter respond to the requirements considered. For this reason, the method may be regarded as being reliable for carrying out the study of vitamin content in the natural source studied in this work.

Una vez evaluado el método, se determinó el contenido vitamínico de la *Arthrospira maxima* cultivada en Cuba (Tabla 5). Puede observarse que en nuestro caso los valores se encuentran dentro del rango reportado para otras especies similares (21).

After evaluating the method, the vitamin content of *Arthrospira maxima* cultivated in Cuba was determined (Table 5). It can be observed that the values obtained in this work are to be found within the range of values reported for other similar species²¹.

TABLA 5.- Cuadro comparativo del contenido de vitaminas del grupo B en *Arthrospira maxima* cubana y otras especies de microalgas (en mg/10g).

Microalga	B1	B2	B6	B12	Acido nicotínico	Nicotinamida
<i>Arthrospira max. cubana</i>	3.1	4.0	9.0	0.29	21	26
<i>Spirulina pl. americana</i> ^(a)	3.5	4.0	0.8	0.32	---	14
<i>Spirulina Pl. mexicana</i> ^(b)	5.5	4.0	0.3	0.13	---	11.8

(a) Earthrise Farms *Spirulina* grown in the USA. Typical Analysis and Specifications, 1988.

(b) Spirulina Mexicana, S.A. Certificado de Calidad. 1990.

TABLE 5.- Comparative chart of B group vitamin content. in Cuban *Arthrospira maxima* and other microalgae species (in mg/10g).

Microalga	B1	B2	B6	B12	Nicotinic acid	Nicotinamide
<i>Cuban Arthrospira max.</i>	3.1	4.0	9.0	0.29	21	26
<i>Spirulina pl. americana</i> ^(a)	3.5	4.0	0.8	0.32	---	14
<i>Spirulina pl. americana</i> ^(a)	5.5	4.0	0.3	0.13	---	11.8

(a) Earthrise Farms *Spirulina* grown in the USA. Typical Analysis and Specifications, 1988.

(b) Spirulina Mexicana, S.A. certificate of Quality 1990.

CONCLUSIONES

Los métodos extractivos planteados permiten obtener altos porcentajes de recuperación de las vitaminas presentes en el alga sin afectar la estabilidad de las mismas. La cuantificación realizada por la técnica de HPLC propuesta, es satisfactorio y confiable. Se pudo determinar el contenido de vitaminas del grupo B presentes en

CONCLUSIONS

The extraction methods considered allow high recovery percentages of the vitamins present in algae to be obtained without affecting their stability. The quantification carried out through the HPLC technique proposed, is both reliable and satisfactory. The content of B-group vitamins in *Arthrospira maxima* cultivated in Cuba, could

la *Arthrospira maxima* cultivada en Cuba, observando un alto valor en el contenido de estos metabolitos, lo cual permite considerar su posible uso en la alimentación, como fuente alternativa de estos elementos.

be determined. High content values for these metabolites were observed allowing its possible use in foodstuffs, as an alternative source for these elements, to be considered.

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Li, S. (1989). "Cultivation and application of microalgae in People's Republic of China". In *Algae Biotechnology Symposium*, London.
2. Osse, A.C. (1990). "A utilização de algas marinhas como aditivo para rascões animais". Instituto de Investigações Pesqueiras, Brasil.
3. Mc Hugh, D.J. (1991). "Worldwide distribution of commercial resources of seaweed including". *GELIDUM Hidrobiología*, 221,19-29.
4. Molloy F. J. 1990. "Utilized and potentially utilizable seaweed on the Namibian coast: Biogeography and accessibility". *Hydrobiologia*, 204/205: 293-299.
5. Cumberbatch, J., Benítez, I., Torres, J.L., Travieso, L., Rivas, E. (1995). "Secado de biomasa de *Arthrospira máxima* utilizando spray dryer". I Taller Internacional de Microalgas y Plantas Acuáticas (Cuba).
6. Guglielmi, G., Rippka, R., Tandeau, N. (1993). "Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. Among cyanobacteria". *Bulletin de l'Institut Océanographique*. Monaco. Número especial 12.
7. AOAC, Association of Official Analytical Chemist. *Official Methods of Analysis* (1990). 15th Ed. Washington D.C.
8. Kwok, P.C., Rose, W.P., Tabor, R., Pattison, T.S. (1981). "Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆, and niacinamide in multivitamin pharmaceutical preparations by paired-ion reversed-phase high pressure liquid chromatography". *J. Pharm. Sci.*, 70, 1014.
9. Vanderslice, J-T., Brownlee, S.R., Cortissoz, M.E. (1984). "Liquid Chromatographic determination of vitamin B-6 in foods". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(5), 999-1007.
10. Gennaro, M.C. (1991). "Separation of agua-soluble vitamins by reversed-phase ion-interaction-reagent high performance liquid chromatography: application to multivitamin pharmaceuticals". *J. Chromatogr.* 29(9), 410-415.
11. Fujiwara, S., Iwase, S., Honda, S. (1988) "Analysis of agua-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography". *J. Chromatogr.* 447(1), 133-140.
12. Boso, R.L., Bellini, M.S., Miksik, I., Deyl, Z. (1995) "Microemulsion electrokinetic chromatography con different organic modifiers: separation of agua- and lipid-soluble vitamins. *J. Chromatogr. A.* 709(1), 11-19.
13. Hsieh, Y., Kuo, K. (1997) "Separation of retinoids by micellar electrokinetic capillary chromatography". *J. Chromatograph. A.* 761(1-2), 307-313.
14. Buskov, S., Müller, P., Sorensen, H., Sorensen, J.C., Sorensen, S. (1998) "Determination of vitamins in food based on supercritical fluid extraction prior to micellar electrokinetic capillary chromatographic analyses of individual vitamins". *J. Chromatograph. A.* 802 (1), 233-241.
15. Rizzolo, A., Polesello, S. (1992). "Chromatographic determination of vitamins in foods". *J. Chromatograph.*, 624, 103-152.
16. Lam, F.L., Molcomb, I.J., Fusaki, S.A. (1984). "Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, piridoxina, tiamina and riboflavina in multivitamin-mineral preparations". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(5), 1007-1011.
17. González, H.M., Arques, J.M., Font, G., Mañes, J. (1987). "Determinación de vitaminas del grupo B mediante cromatografía líquida de alta resolución". *An. Real Acad. Farm.*, 53, 602-608.
18. Augustin J., Klein B. P., Becker D., Venuggopal P. B. (1985). "Methods of vitamin assay", Wiley Interscience, USA, p. 497-502.
19. Dalbacke, J., Dahlquist, J. (1991). "Determination of vitamin B12 in multivitamin-multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid phase extraction". *J.Chromatogr.*, 541, 383-392.
20. Quattrocchi, O.A., Abelaira, S., Laba, F. (1992) "Introducción a la HPLC". Merck Argentina (Buenos Aires), P. 40-63.
21. Henrikson, R. 1994. "Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro". Ed. Urano, EU, p.1-28.