

Concentraciones de ascorbato en plasma y células sanguíneas usando cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica

M^a A. Ortiz de Apodaca y Ruiz

Resumen

El propósito de este trabajo es investigar la utilidad de la cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica para analizar las concentraciones de ascorbato en plasma, neutrófilos, plaquetas y eritrocitos, así como determinar sus respectivas concentraciones en un grupo de 40 personas presuntamente sanas (20 hombres y 20 mujeres).

La determinación de ascorbato se basa en su oxidación enzimática a ácido deshidroascórbico y su posterior condensación con *o*-fenilendiamina para formar 3-(1,2-dihidroxietil)furo (3,4-*b*)-quinoxalina-1-ona.

Este derivado se analiza por cromatografía líquida de alta resolución y se detecta fluorimétricamente.

Las concentraciones encontradas en el grupo de individuos presuntamente sanos han sido ($\bar{x} \pm s$):

Hombres: plasma $51,7 \pm 12,5 \mu\text{mol/L}$; eritrocitos $91,4 \pm 39 \mu\text{mol/g}$ hemoglobina; neutrófilos $5,3 \pm 1,4 \mu\text{mol/mg}$ proteína; plaquetas $5,7 \pm 0,9 \mu\text{mol/mg}$ proteína.

Mujeres: plasma $50 \pm 14,2 \mu\text{mol/L}$; eritrocitos $92,5 \pm 38,6 \mu\text{mol/g}$ hemoglobina; neutrófilos $3,7 \pm 1,9 \mu\text{mol/mg}$ proteína; plaquetas $7,5 \pm 1,9 \mu\text{mol/mg}$ proteína.

Sólo en los neutrófilos se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres y únicamente la concentración de ascorbato en plasma y eritrocitos está correlacionada significativamente ($r=0,725$; $P<0,05$).

Introducción

La cantidad de literatura sobre el ácido ascórbico y su influencia en una gran variedad de procesos está aumentando progresivamente. El establecimiento del estado nutricional de ácido ascórbico está siendo cada vez más importante debido a sus acciones ampliamente reconocidas en la síntesis de hormonas, neurotransmisores (1), carnitina, metabolismo del colesterol y acciones de detoxificación de diversos productos (2-4). Sin embargo, sus propiedades más conocidas son las de antioxidante con resultados protectores frente al cáncer (4,5), riesgo coronario (6-9), artritis y envejecimiento (10). En este sentido, ya que es una vitamina hidrosoluble, actúa neutralizando el radical hidroxilo (OH \cdot) y el anión superóxido (O $_2\cdot^-$) en la fase

Summary

The purpose of this study is to investigate the usefulness of HPLC procedure with fluorimetric detection to analyze plasma, platelet, polymorphonuclear leucocyte and erythrocyte ascorbate concentrations and to establish reference values from 40 healthy subjects (20 men and 20 women).

Ascorbate measurement is based on its enzymatic oxidation to dehydroascorbic acid and the condensation of the latter with *o*-phenyldiamine to form 3-(1,2-dihydroxyethyl)furo (3,4-*b*)-quinoxaline-1-one. This quinoxaline derivative is then chromatographed by HPLC and detected fluorimetrically.

Reference values found are ($\bar{x} \pm s$):

Men: plasma: $51,7 \pm 12,5 \mu\text{mol/L}$; erythrocytes: $91,4 \pm 39,2 \mu\text{mol/g}$ haemoglobin; polymorphonuclear leucocytes: $5,3 \pm 1,4 \mu\text{mol/mg}$ protein; platelets: $5,7 \pm 0,9 \mu\text{mol/mg}$ protein.

Women: plasma: $50,0 \pm 14,2 \mu\text{mol/L}$; erythrocytes: $92,5 \pm 38,5 \mu\text{mol/g}$ haemoglobin; polymorphonuclear leucocytes: $3,8 \pm 1,9 \mu\text{mol/mg}$ protein; platelets: $7,5 \pm 1,9 \mu\text{mol/mg}$ protein.

A significant sex-related difference in polymorphonuclear leucocytes is found. Only plasma and erythrocytes ascorbate concentrations are significantly correlated ($r=0,725$; $P<0,05$).

acuosa del organismo, es decir en plasma, fluido extracelular e intracelular. También protege las membranas celulares de la lipoperoxidación, pues regenera la vitamina E de las membranas celulares (11).

Se han publicado varios métodos desde el descubrimiento de ácido ascórbico, en relación a su determinación: la condensación con 2,4 dinitrofenilhidracina (12); la reducción con 2,6 dicloroindofenol (13); la reducción con el ion férrico (14), pero estos métodos son bastantes inespecíficos. El uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite su medida de un modo más exacto y específico. La HPLC con detección electroquímica permite la medida de ácido ascórbico y la HPLC con detección fluorimétrica permite medir la concentración de ácido ascórbico «total» (ácido ascórbico + ácido deshidroascórbico). Dado que la vitamina C existe en dos formas, principalmente en la forma reducida como ácido ascórbico y en menor concentración en la forma oxidada como ácido deshidroascórbico, se ha elegido el último método para su determinación, además el uso de la enzima ascorbato oxidasa aumenta la especificidad del procedimiento (15).

Laboratorio de Bioquímica,
Hospital Virgen de la Salud,
Toledo.
Recibido: 1-4-98
Aceptado: 9-3-99

Abreviatura no estandarizada:
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

El propósito de este estudio es investigar la utilidad de este procedimiento para analizar la concentración de ascorbato, estudiando el límite de detección, linealidad, imprecisión intra e interserial, estabilidad de la muestra y las concentraciones en plasma, neutrófilos, plaquetas y eritrocitos que presentan un grupo de individuos presuntamente sanos y estudiar si existe alguna relación entre dichas concentraciones.

Material y método

Reactivos

Ascorbato y ascorbato oxidasa (Sigma Chemicals Co, St. Louis, EE.UU.). Los otros reactivos fueron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Individuos y especímenes

La muestra consistió en 40 individuos presuntamente sanos (20 hombres y 20 mujeres, de edad comprendida entre 25-50 años), no fumadores, pertenecientes al personal de nuestro hospital. Ninguno seguía dieta especial ni estaban consumiendo suplementos vitamínicos. Se obtuvo el consentimiento informado de todos ellos.

Se obtuvieron dos tubos heparinizados (10 mL de sangre), uno se usó para separar plasma, plaquetas y eritrocitos y el otro se utilizó para separar los neutrófilos.

Los neutrófilos se obtuvieron siguiendo un procedimiento anteriormente descrito (16). El otro tubo se centrifugó a 50 g durante 15 min y se recogió la capa superior conteniendo plasma, leucocitos y plaquetas. Los eritrocitos sedimentados en el fondo del tubo se lavaron tres veces con solución salina y se centrifugaron a 1100 g. Finalmente se resuspendieron en 4 mL de solución salina. La capa superior (leucocitos, plaquetas y plasma) se centrifugó a 180 g durante 15 min. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 1600 g para obtener el precipitado de plaquetas y el plasma. El precipitado de plaquetas se lavó con solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) dos veces y se resuspendió en la misma solución amortiguadora. Las plaquetas y neutrófilos se congelaron y descongelaron tres veces y se centrifugaron a 10000 g durante 10 min. Los sobrenadantes se recogieron para su análisis.

Extracción del ácido ascórbico

El ácido ascórbico del plasma, eritrocitos, neutrófilos y plaquetas se extrajo por precipitación con ácido tricloroacético 0,3 mol/L. Tras 20 min de reposo, agitando una vez a los 10 min, los tubos se centrifugaron a 1600 g durante 5 min. 100 µL del sobrenadante, en el caso de los eritrocitos, y 50 µL en los otros casos se transfirió a un tubo que contenía 100 µL de solución amortiguadora de acetato 4,5 mol/L, pH=6,2 y 0,033 µkat de ascorbato oxidasa. Tras 5 min de incubación a 37°C, se añadieron 100 µL de una solución de *o*-fenilendiamina al 0,1% recién preparada. La solución se incubó a 37°C en oscuridad durante 30 min y se inyectaron 40 µL para su análisis por HPLC en el caso de plasma y eritrocitos y 80 µL en los otros casos y se analizaron el mismo día.

La viabilidad de las células se determinó mediante la prueba de exclusión del azul de trypano. Los resultados indican que más del 95% de las células son viables antes de la extracción del ácido ascórbico.

Instrumentación

El sistema está formado por una bomba 510, un inyector automático Wisp, un módulo data 746, un horno con control de temperatura y un detector fluorimétrico (420-AC) (Waters Chromatography Division, Millipore Co., EE.UU.). La columna, una ODS Hypersil (8 cm x 4,6 mm, 3 µm) (Tecnochrome); la fase móvil, metanol: solución amortiguadora de fosfato 0,08 mol/L pH= 7,8 (20:80); el flujo 0,9 mL/min; y el detector fluorimétrico con una longitud de onda de excitación de 325 nm y

una longitud de onda de emisión de 410 nm. El ácido isoascórbico se usó como estándar interno.

La concentración de ascorbato se expresó en µmol/L para el plasma, en µmol/g hemoglobina para los eritrocitos, y en µmol/mg proteína para los neutrófilos y plaquetas. La hemoglobina se midió en un contador de células automatizado y la concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (17).

Cada preparación celular se analizó en el contador de células para ver el grado de contaminación entre las distintas células separadas, en todos los casos fue menor del 1%. Los monocitos aparecieron contaminados con plaquetas y, al no ser posible separarlos, no se incluyeron en este estudio.

Imprecisión

La imprecisión intraserial se estimó analizando una muestra recién preparada de plasma, eritrocitos, neutrófilos y plaquetas y estándar 10 veces en la misma serie. La imprecisión interserial se estudió utilizando estándares recién preparados a dos concentraciones diferentes, en 10 días diferentes. Los estándares se prepararon por pesada en ácido tricloroacético 0,3 mol/L.

Límite de detección

Se estableció con una solución estándar de concentración entre 0 y 65 µmol/inyección y se definió como el correspondiente a una señal doble del ruido.

Estabilidad

La estabilidad de la muestra se estudió extrayendo el ácido ascórbico de las distintas muestras con ácido metafosfórico al 5%, con una mezcla de homocisteína y ácido tricloroacético 0,3 mol/L, preparando una serie de muestras y analizándolas en días sucesivos.

Análisis estadístico

Los valores correspondientes a los individuos presuntamente sanos se expresan como media \pm desviación típica. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba *t* de Student y la asociación entre las variables estudiadas se examinaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

El tiempo de retención del ácido ascórbico fue de 3,41 min y el del ácido isoascórbico fue de 3,93 min. En los extractos de eritrocitos se observa un pico a 6,45 min.

El límite de detección encontrado fue 1,5 µmol/L para 20 µL inyección.

La imprecisión intra e interserial se muestran en la tabla I.

Se ha conseguido una mayor estabilidad de las muestra mediante la extracción con ácido tricloroacético, tal como se especificó en material y métodos, transfiriendo el sobrenadante a tubos de cristal (no de plástico) y guardándolos congelados a -80°C. De todas formas a partir de una semana ya se detectan pérdidas, del orden de un 10%, en el contenido de ascorbato de los extractos.

Las concentraciones correspondientes al grupo de individuos presuntamente sanos estudiados se muestran en la tabla II. Una diferencia estadísticamente significativa en relación al sexo se detecta sólo en el caso de los neutrófilos. Se ha observado una correlación significativa entre las concentraciones de ascorbato en plasma y eritrocitos [($r=0,725$), $P<0,05$].

Discusión

En la práctica clínica, la concentración de ascorbato se analiza en

Tabla I. Imprecisión intra e interserial

Imprecisión (n=10)	Intraserial CV (%)	Interserial CV (%)
Global	8,7 ¹ - 2,0 ²	9,4 ¹ - 5,2 ²
Plasma	8,8	
Eritrocitos	12,8	
Neutrófilos	14,3	
Plaquetas	12,5	

¹ Concentración de ascorbato: 35,7 µmol/L

² Concentración de ascorbato: 362,0 µmol/L

Tabla II. Concentración de ascorbato en plasma, eritrocitos, plaquetas y neutrófilos

	Hombres		Mujeres		P
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
Plasma (µmol/L)	51,7	12,5	50,0	14,2	NS
Eritrocitos (µmol/g hemoglobina)	91,4	39,2	92,5	38,6	NS
Neutrófilos (µmol/mg proteína)	5,3	1,4	3,7	1,9	<0,05
Plaquetas (µmol/mg proteína)	5,7	1,9	7,5	1,9	NS

NS: no significativo

suero o plasma. Algunos autores (18,19) han enfatizado sobre el interés del ácido ascórbico celular en un intento de proporcionar un mejor entendimiento de su estatus en el organismo. Las células sanguíneas son de fácil obtención y mientras que la concentración en suero o plasma refleja la ingesta reciente de ácido ascórbico, la concentración en leucocitos refleja las reservas tisulares. Por ello los leucocitos han sido los más estudiados y existen trabajos que demuestran que pacientes con enfermedad cardiovascular demostrada angiográficamente, presentan concentraciones bajas de ascorbato (20). Sin embargo, las plaquetas y eritrocitos también pueden proporcionar información interesante.

Los resultados relativos a la concentración de ascorbato en plasma están de acuerdo con los valores publicados por Hoefel y Norkus (21, 22) en personas no fumadoras y son algo más bajos que los encontrados por Omaye (19).

El método usado por Omaye (19), no puede detectar ascorbato en eritrocitos. Omaye utiliza detección electroquímica y el hecho de que el método aquí descrito pueda detectarlo sugiere que los eritrocitos contienen principalmente ácido deshidroascórbico.

No existe general acuerdo en cuanto al contenido de ascorbato en neutrófilos y plaquetas, ni tampoco en su expresión, ya que muchos autores lo expresan como µmol/10⁹ células o µmol/10⁶ células y unos pocos como µmol/L. En este trabajo se ha elegido expresar la concentración en el caso de plaquetas y neutrófilos como µmol/mg proteína en un intento de estandarizar los resultados, ya que el número de células recogidas en un volumen puede variar según los casos y además es posible que en algunos laboratorios no exista un contador de células. Para comparar nuestros resultados con los ya existentes en la bibliografía, hemos usado los siguientes datos: 10¹⁰ neutrófilos = 0,6 g proteína y 10¹⁰ plaquetas = 180 mg proteína (23) y el volumen intracelular del neutrófilo es aproximadamente 0,31 µL/10⁶ células (24).

La concentración de ascorbato encontrado en plaquetas es muy similar al encontrado por Omaye (19) y un 50 % más bajo que el que publican Evans (18) y McCulloch (25).

La concentración de ascorbato encontrada en los neutrófilos es algo más bajo que la observada por Evans (18), Wasko (24) y McCulloch (25) y sustancialmente mayor que la obtenida por Omaye (19).

La relación entre el contenido de ascorbato entre el plasma y las células sanguíneas también se ha estudiado, habiéndose encontrado una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones en plasma y eritrocitos ($r=0,725$, $P<0,05$). Tampoco a este respecto existen resultados concordantes: Evans (18) encuentra una correlación positiva entre las concentraciones de ascorbato en plasma y en neutrófilos y entre las concentraciones en plasma y en plaquetas. Omaye (19) sólo encuentra correlación entre las concentraciones de ascorbato en neutrófilos y en plaquetas. Blanchard (26) y Pecoraro (27) no encuentran ningún tipo de correlación entre las concentraciones en neutrófilos y en plaquetas.

El ácido ascórbico está implicado en multitud de procesos metabólicos y son necesarios estudios con el fin de definir su papel en las distintas funciones celulares, en particular sobre la facilidad de los eritrocitos para concentrarlo. El procedimiento aquí presentado es útil, ya que posee buenas características para la medida de esta magnitud.

Correspondencia:
M^a.A. Ortiz de Apodaca y Ruiz
Hospital Virgen de la Salud
Laboratorio de Bioquímica
Avda. Barber 30.
45004 Toledo

Bibliografía

- Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* 1986; 314: 892-902.
- Tannenbaum SR, Wisnok J S, Leaf C D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 247S-250S.
- Mirvish SS. Blocking the formation of N-nitroso compounds with ascorbic acid in vitro. In *Second Conference of vitamin C*. CG King and JJ Burns (dirs). NY Acad Sci New York 1975; 29: 175-80.
- Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1989; 86: 6377-81.
- Kodama M, Kodama T, et al. Vitamin C, steroids and environmental carcinogenesis. *Int J Onc* 1995; 6: 797-815.
- Crawford RD. Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* 1995; 40: 146-9.
- Bendich A, Langseth L. The health effects of vitamin C supplementation: a review. *J Am Coll Nutr* 1995; 14: 124-36.
- Defeudis FV. Excess EDRF/NO a potential deleterious condition that may be involved in accelerated atherogenesis and other chronic disease states. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 667-80.
- Gey KF. Ten years retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: Threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J Nutr Biochem* 1995; 6: 206-36.
- Bates CJ, Cowen TD. Effects of age and dietary vitamin C on the contents of ascorbic acid and acid-soluble thiol in lens and aqueous humor of guinea pigs. *Exp Eye Res* 1988; 46: 937-45.
- Niki E. Interaction of ascorbate and tocopherol. *Ann NY Acad Sci* 1987; 498: 186-99.
- Gary PJ, Owen GM, Lashley DW, Ford PC. Automated analysis of plasma and whole blood ascorbic acid. *Clin Biochem* 1974; 7: 131-4.
- Aesthbachter HU, Brown RC. Automated vitamin C analysis. *Clin Chem* 1972; 18: 956-7.
- Butts WC, Mulvihill HJ. Centrifugal analyzer determination of ascorbate in serum of urine with FE+3/Ferrocene. *Clin Chem* 1975; 21: 1493-7.
- Moser U, Bendich A. *Handbook of vitamins*, 2nd edn. Lawrence J Machlin: New Jersey; 1991. p. 201-2.
- Ortiz-Apodaca MA, Fernandez E, De la Fuente G. Tris discriminates between the different -glucosidase activities from extracts of human neutrophils. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 213-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1975; 193: 265-75.
- Evans RM, Curri L, Campbell A. The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals and its relation to the plasma concentration. *Br J Nutr* 1982; 47: 473-82.
- Omaye ST, Schaus EE, Kutnick MA, Hawkes WC. Measurement of vitamin C in blood components by high-performance liquid chromatography. *Ann NY Academic of Sciences* 1987; 498: 389-401.
- Ramirez J, Flowers NC. Leucocyte ascorbic acid and its relationship to coronary heart disease in man. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 2079-87.
- Hoefel OS. Plasma vitamin C levels in smokers. *Int J Vitam Nutr Res* 1977; suppl 16: 127-37.
- Norkus EP, Hsu U, Celesky MR. Effect of cigarette smoking on the vitamin C status of pregnant women and their offspring. *Ann NY Acad Sci* 1987; 498: 500-1.
- Holmsen H. *En Hematology*, 4ta edn. Williams et al. Mac Graw Hill Co: New York; 1990. p. 1182-3.
- Washko P, Rotrosen D, Levine M. Ascorbic acid in human neutrophils. *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (6 suppl): 1221S-7S.
- McCulloch RK, Vandongen R. Measurement of ascorbic acid in platelets and its relationship to polymorphonuclear leukocyte levels. *Clin Chim Acta* 1992; 213: 15-22.
- Blanchard J, Conrad KA, Watson RR, Garry PJ, Crawley JD. Comparison of plasma, mononuclear and polymorphonuclear leukocyte vitamin C levels in young and elderly women during depletion and supplementation. *Eur J Nutr* 1989; 43: 97-106.
- Pecoraro RE, Chen MS. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 1987; 498: 248-58.