

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2318-85**

**ALIMENTOS.
DETERMINACION DE VITAMINA A**



TRAMITE

COMITE: CT10 ALIMENTOS

PRESIDENTE: Dr. Gustavo Toro Alayón

SECRETARIA: Ing. Milagros Díaz

SUBCOMITE: CT10/SC14 Métodos de ensayo

COORDINADORAS: Lic. Omaira Guaita

Lic. Norma Arias

PARTICIPANTES

ENTIDAD

REPRESENTANTES

MINISTERIO DE SANIDAD
Y ASISTENCIA SOCIAL

Gustavo Toro Alayón

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

Erika de Uzcátegui
Gladys V. de Anderson
María Luisa Novoa

UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

José Cegarra
Trina Vargas

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

José Luis Vidaurreta

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES (U.L.A)

Antonio Van Grieken

FUNDACION CIEPE

Reinaldo Lagonell

CAMARA VENEZOLANA DE LA INDUSTRIA
DE ALIMENTOS (CAVIDEA)

Manuel Cols Pérez

INDUSTRIA LACTEA VENEZOLANA
(INDULAC)

Gladys Méndez

LABORATORIOS CEIFA

Nelly Salas

TECNI-ALIMENTOS

Carín Soulavy

DISCUSION PUBLICA:

Fecha de envío: 9-11-85

Duración: 45 días

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 04-07-85

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 10-12-85

REPRESENTANTES

INSTITUCIONES

Comité de Asesoría
Instituto de Investigaciones
Gloria V. de Rodríguez
María Luisa Novoa

MINISTERIO DE SALUD
Y ASISTENCIA SOCIAL

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA

FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

Esta norma es completa.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta norma contempla el método de ensayo para la determinación de vitamina A, en leches, alimentos a base de cereales, suplementos alimenticios, margarina, mantequilla, queso crema y alimentos colados y picados.

3 PRINCIPIO

Este método se basa en la lectura espectrofotométrica a 3 longitudes de onda de los trans-retinol, los cuales han sido obtenidos por saponificación, extracción y purificación por cromatografía de partición en columna.

4 EQUIPO

- 4.1 Matracas de saponificación de 500 y 1000 cm³.
- 4.2 Matracas de evaporación de 250 cm³ y 500 cm³.
- 4.3 Matracas aforados de 10, 25, 100 cm³ y otros según las diluciones.
- 4.4 Embudos de separación de 1000 cm³.
- 4.5 Cilindros graduados, de 100, 200 y 250 cm³.
- 4.6 Pipetas graduadas.
- 4.7 Balanza analítica, con precisión de 0,1 mg.

- 4.8 Baño-maría con termómetro.
- 4.9 Evaporador rotatorio, al vacío.
- 4.10 Espectrofotómetro UV-visible.
- 4.11 Lámpara de luz ultravioleta.
- 4.12 Condensador.
- 4.13 Columna para cromatografía.
- 4.13.1 Debe ser una columna cilíndrica de vidrio con un diámetro de 2,2 cm y un largo de 30 cm con una placa de vidrio poroso o lana de vidrio en su parte inferior y llave de teflón.

5 REACTIVOS

Todos los reactivos deberán ser de grado analítico y el agua destilada y desmineralizada.

- 5.1 n-hexano.
- 5.2 Eter de petróleo 40-60°C.
- 5.3 Eter dietílico.
- 5.4 Alcohol isopropílico, mínimo 99,8%.
- 5.5 Etanol absoluto, mínimo 99,8%.
- 5.6 Polietilenglicol 600.
- 5.7 Iso-octano.
- 5.8 Sulfato de sodio anhidro.
- 5.9 Sulfato de sodio decahidratado.
- 5.10 Tierra de sílice para cromatografía (celita).
- 5.11 E.D.T.A. (Etilen diamino tetra-acetato sódico).
- 5.12 Papaina 1:350 (sustrato de albúmina de huevo).
- 5.13 Diastasa 300 u/g (sustrato de almidón).
- 5.14 Bombona de nitrógeno de alta pureza con certificado de análisis.

5.15 Solución de hidroquinona al 10% en etanol absoluto.

5.16 Solución de hidróxido de potasio (90 g en 100 cm³).

5.17 Fenolftaleína al 1% en etanol absoluto.

5.18 Patrón de vitamina A USP (1 g contiene 33,6 mg de los trans-retinol) y 0,3 μ g de los trans-retinol equivale a 1 U.I.

5.19 Solución patrón de referencia. Se pesa exactamente el contenido de una (1) cápsula del patrón en un matraz aforado de 25 ml y se lleva a volumen con etanol absoluto. Se toman 500 U.I para el ensayo (si es necesario se hacen diluciones).

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del producto que contenga 500 U.I de vitamina A. Tomando en cuenta que 1 U.I de vitamina A es igual a: 0,3 g de vitamina A alcohol; 0,344 g de vitamina A acetato y 0,55 g de vitamina A palmitato.

7 CONDICIONES DE ENSAYO

7.1 Debido a que la vitamina A es muy sensible a la luz, se debe trabajar con material de vidrio color ámbar o en su defecto envuelto en papel adecuado y trabajar protegido de la luz.

7.2 Todas las evaporaciones se deben hacer mediante un evaporador rotatorio al vacío a una temperatura que no exceda los 40°C.

7.3 La saponificación se debe llevar a cabo en presencia de una corriente de nitrógeno.

8 PROCEDIMIENTO

El procedimiento se lleva a cabo conjuntamente, muestras y patrón.

8.1 HIDROLISIS ENZIMATICA

8.1.1 En un vaso de precipitado de capacidad adecuada se pesa exactamente una cantidad de muestra que contenga 500 U.I de vitamina A y se transvasa a un matraz de saponificación de 500 ó 1000 cm³, según sea la cantidad de muestra pesada.

8.1.2 Se forma una pasta con agua, recientemente hervida y que se encuentre a una temperatura de 50 °C.

8.1.3 Se añaden, mezclando muy bien, 3 g de papaína, 3 g de diastasa y 0,3 g de E.D.T.A.

8.1.4 Se incuba la pasta en un baño de agua a una temperatura de 45 °C por una hora.

8.2 SAPONIFICACION

8.2.1 A la pasta obtenida en el punto 8.1.4, se le añade 30 cm³ de etanol, solución de hidróxido de potasio al 90% en la proporción de 3 cm³ por 1 g de grasa, pero no menos de 12 cm³ y 5 cm³ de solución de hidroquinona al 10%. Se mezcla bien y se saponifica por 40 minutos bajo reflujo en un baño de vapor con una ligera corriente de nitrógeno.

NOTA 1: Los mililitros de alcohol se pueden aumentar de acuerdo a los mililitros de KOH añadidos, pero que no exceda los mismos.

NOTA 2: De no obtenerse una solución de KOH a la concentración indicada se hacen los ajustes de volúmenes adecuados.

8.3 EXTRACCION

8.3.1 Cuando la saponificación esté terminada, se enfría el matraz y se transvasa su contenido, cuantitativamente, a un embudo de separación de 1000 cm³ con ayuda de agua.

8.3.2 Se extrae la fracción insaponificable con aproximadamente 5 porciones de éter de petróleo, éter dietílico o una mezcla de partes iguales de ambos o n-hexano. A la primera extracción de 150 cm³ se le añade 4 g de sulfato de sodio decahidratado y se agita vigorosamente por 2 minutos (Se dejan escapar los gases antes de agitar vigorosamente). La siguiente extracción de 100 cm³ y las restantes con 80 cm³.

NOTA: El solvente de extracción usado, así como el número de extracciones va a depender de la naturaleza de la muestra a ensayar. En el caso de leches modificadas para niños es recomendable n-hexano, en el caso de margarina, mantequilla, queso crema, es recomendable extraer con la mezcla de éter de petróleo-éter dietílico, haciendo la última extracción con éter de petróleo.

8.3.3 Se reúnen los extractos etéreos obtenidos en 8.3.2 y se lavan con porciones de aproximadamente 100 cm³ de agua hasta que los lavados den

reacción neutra a la fenolftaleína. haciendo el primer lavado con agitación suave para evitar la formación de emulsiones.

NOTA: Se observa a la luz ultravioleta el lavado acuoso y si presenta fluorescencia verde-amarillenta se lava con el solvente de extracción usado y se repite la operación si es necesario.

8.3.4 Se secan los extractos etéreos con sulfato de sodio anhidro y se transvasa a un matraz de evaporación de capacidad adecuada, lavando con éter previamente secado, el sulfato de sodio anhidro.

8.3.5 Se evapora a sequedad en el evaporador rotatorio al vacío sin exceder los 40 °C, removiendo el matraz de evaporación inmediatamente que se haya evaporado el éter.

8.4 PURIFICACION (Cromatografía de partición en columna)

8.4.1 Preparación de la columna

8.4.1.1 Se colocan 125 cm³ de iso-octano en un recipiente con tapa y se añaden 25 g de tierra de sílice para cromatografía, se agita hasta homogeneización. Se añade gota a gota y con agitación fuerte, 10 ml de polietilenglicol 600. Se tapa el recipiente y se agita vigorosamente por 2 minutos.

8.4.1.2 Se vierte aproximadamente la mitad de la mezcla obtenida en la columna y se permite que descienda por gravedad. Se aplica una pequeña succión. Se añade el remanente de la mezcla en pequeñas porciones, empacando cada vez con un émbolo redondo de 20 mm de diámetro. Una vez empacada toda la columna y que se haya formado una superficie sólida se añaden 2 cm³ de iso-octano.

8.4 PURIFICACION DE LA MUESTRA

8.4.1 Se retoma la muestra evaporada (punto 8.3.5) con una cantidad no mayor de 3 cm³ de n-hexano y se agrega en la columna, una vez que haya desaparecido los 2 ml de iso-octano dentro de la columna. El flujo debe ser aproximadamente 30 gotas/min, para permitir que se separen las sustancias interferentes. En el caso de extractos muy coloreados, el número de gotas se debe disminuir hasta aproximadamente 20 gotas/min.

8.4.2 Se lava el matraz de evaporación con porciones de 2 cm³ de n-hexano, por vez, agregando cada porción a la columna, una vez que el menisco de la porción anterior ha alcanzado la superficie sólida de la columna.

NOTA: Se debe lavar el matraz hasta que no presente fluorescencia verde-amarillenta a la luz ultravioleta (366 nm).

8.4.3 Se agrega aproximadamente 100 cm³ de n-hexano en porciones de alrededor de 15 cm³, se descarta el eluato.

8.4.4 Cuando la banda fluorescente de la vitamina A, detectada por la lámpara de luz ultravioleta (onda larga), esté a pocos milímetros de la lana de vidrio de la columna, se comienza a recoger el eluato en un matraz de evaporación.

8.4.5 Se evapora a sequedad, removiendo el matraz inmediatamente que se ha evaporado el n-hexano.

NOTA GENERAL: La exposición de la vitamina A, a la luz ultravioleta debe ser por períodos cortos y no seguidos, pues puede producirse la descomposición de la vitamina A.

8.4.6 Alternativamente se puede emplear el método indicado en el anexo.

8.5 LECTURA ESPECTROFOTOMETRICA

8.5.1 Se retoma la vitamina A (los trans-retinol) con alcohol isopropílico para obtener una concentración de 500 UI/50 cm³.

NOTA: La solución debe ser transparente.

8.5.2 Se hacen las lecturas espectrofotométricas con registro a las siguientes longitudes de onda: 334, 325 y 310 nm en una celda de 1 cm de espesor, usando alcohol isopropílico como blanco para ajustar el aparato.

NOTA: El registro obtenido con la muestra debe corresponder al registro del patrón.

8.5.3 Se realiza una curva de calibración con patrón de vitamina A usando 5 concentraciones que cumplan con la Ley de Lambert-Beer.

8.5.4 Se corrigen las absorbancias con la siguiente fórmula:

$$A \text{ corregida} = 6,815 A_{325} - (2,555 A_{310} + 4,260 A_{334})$$

NOTA: La absorbancia corregida del patrón, al cual se le hizo todo el procedimiento, no debe ser significativamente diferente a aquella de la curva de calibración que corresponda a las unidades ensayadas.

9 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El contenido de vitamina A en la muestra se expresa en unidades internacionales de vitamina A por 100 g de muestra y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$U.I = \frac{AcM \times C \times 100}{AcP \times E}$$

Donde:

U.I = Unidades internacionales de vitamina A por 100 gramos de muestra.

C = Concentración del patrón en Unidades Internacionales por 50 cm³.

AcM = Absorbancia corregida de la muestra.

AcP = Absorbancia corregida del patrón.

E = Masa de la muestra.

10 INFORME

El informe del ensayo deberá contener lo siguiente:

- a) Número y título de esta norma.
- b) Fecha de realización
- c) Identificación de la muestra.
- d) Resultados.
- e) Observaciones.

BIBLIOGRAFIA

United States Pharmacopeia, USP XX (1980).

Strohecker, R. Henning, H.M: Vitamin Assay Tested Methods. Verlag Chemil, GMBH. Weinheim/Bergstr, 1965.

Manzur Ul. - Haque Hashmi: Assay of Vitamins in Pharmaceutical. Preparations. John Wiley Sons, 1972.

Información suministrada por el Instituto Nacional de Higiene.

ANEXO

METODO ALTERNO DE PURIFICACION

En algunos alimentos, se consigue una mejor purificación usando una columna de óxido de aluminio la cual se describe a continuación:

100 g de óxido de aluminio 90, normalizado para análisis cromatográfico según Brockman, se calcinan en un horno eléctrico durante cuatro horas a una temperatura de 600 °C (aproximadamente). Se deja enfriar el absorbente en un desecador, agitando vigorosamente a continuación con 6 cm³ de agua en un frasco bien cerrado, hasta que desaparezcan completamente todos los grumos. El material obtenido se debe conservar durante veinticuatro horas y agitarse de nuevo vigorosamente antes de su uso. La columna cromatográfica se prepara vertiendo lentamente la alúmina en un tubo para cromatografía de un diámetro interno de 8 a 12 mm, lleno de éter de petróleo. Cuando la alúmina ha sedimentado, debe formar una columna de 15 a 20 cm de longitud (de acuerdo con la cantidad de sustancias interferentes que deban eliminarse).

El procedimiento es el mismo, con la diferencia de que el eluyente usado es éter de petróleo, hasta que queda limpia la columna de sustancias interferentes y el eluato de la columna analítica es transparente. Posteriormente se agrega una mezcla de éter etílico y éter de petróleo comenzando con una proporción de 5% aumentando el éter dietílico hasta 20% si es necesario, para eluir la vitamina A de la columna. El tiempo de permanencia de la vitamina A en la columna debe ser el menor posible, de lo contrario puede haber descomposición de la referida vitamina. Una vez recogida la vitamina A, se procede igual a partir del punto 8.4.2.5.

COVENIN
2318-85

CATEGORIA
C

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12

Tel. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12

CARACAS

publicación de:



CDU 641:577.164:576.
808

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

ISBN: 980-6019-36-9
