

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2381-86**

**ALIMENTOS.
DETERMINACION DE VITAMINA B₁
(TIAMINA)**



TRAMITE

COMITE: CT10 PRODUCTOS ALIMENTICIOS
PRESIDENTE: DR. GUSTAVO TORO
SECRETARIA: LIC. NORMA ARIAS

SUBCOMITE: CT10/SC14 METODOS DE ENSAYO
COORDINADORAS: LIC. OMAIRA GUAITA
LIC. NORMA ARIAS

PARTICIPANTES

ENTIDAD

REPRESENTANTE

ASOCIACION AMERICANA DE SOYA	JOSE FELIX CHAVEZ
ASOCIACION VENEZOLANA DE FRIGORIFICOS (ASOFRIGO)	EDUARDO BIANCO
CAMARA VENEZOLANA DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS (CAVIDEA)	MANUEL COLS PAEZ
FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (FONAIAP)	PILAR FLORES
FUNDACION CIEPE	LEONOR DE CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE	GLADYS DE ANDERSON ERIKA DE UZCATEGUI
LABORATORIO CEIFA	NELLY SALAS
INDUSTRIA LACTEA VENEZOLANA (INDULAC)	GLADYS MENDEZ
MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL	GUSTAVO TORO
TECNI-ALIMENTOS	CARIN SOULAVY
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA	
- FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS	TRINA VARGAS
- FACULTAD DE FARMACIA	PANNY CARRILLO

DISCUSION PUBLICA

Fecha de envío: 03-06-85

Duración: 45 días

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 08-05-86

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 12-08-86

NORMA VENEZOLANA
ALIMENTOS
DETERMINACION DE VITAMINA B1
(TIAMINA)

COVENIN
2381-86

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 B1 (mononitrato de tiamina y clorhidrato de tiamina) en leches infantiles, suplementos alimenticios (cereales, avenas, etc), harinas de trigo, compotas, galletas, pastas.

3 PRINCIPIO

El método se basa en la lectura fluorométrica del tiocromo formado por la oxidación en medio alcalino de la tiamina, la cual previamente se ha extraído y purificado por cromatografía de intercambio iónico, asegurándose así la especificidad del método fluorométrico.

4 EQUIPO

- 4.1 Embudo de separación de 125 cm³.
- 4.2 Matraces aforados de 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 cm³.
- 4.3 Vasos de precipitado de 150 y 250 cm³.
- 4.4 Pipetas graduadas y volumétricas.
- 4.5 Fluorómetro con juego de filtros o espectrofotofluorómetro.
- 4.6 Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.
- 4.7 Columna para cromatografía.
 - 4.7.1 Debe ser una columna cilíndrica de vidrio con diámetro de 1 cm, con una placa de vidrio poroso o lana de vidrio en su parte inferior y llave de teflón preferiblemente.

5 REACTIVOS

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

5.1 SOLUCION DE CLORURO DE POTASIO ACIDULADO

Se disuelven 250 g de cloruro de potasio en unos 900 cm³ de agua, se le agregan 8,5 cm³ de ácido clorhídrico fumante (37% y d = 1,19) y se completa hasta 1 litro con agua destilada.

5.2 SOLUCION OXIDANTE

Se mezcla 1 cm³ de solución acuosa al 1% de ferricianuro de potasio con 24 cm³ de una solución acuosa de hidróxido sódico al 15%. Esta solución deberá ser preparada inmediatamente antes de su uso.

5.3 ISOBUTANOL

Libre de impurezas fluorescentes.

5.4 SULFATO DE SODIO ANHIDRO

5.5 CLORHIDRATO DE TIAMINA (SOLUCION DE REFERENCIA)

Desecado previamente al vacío sobre pentóxido de fósforo. Se disuelven exactamente 100 mg de clorhidrato de tiamina en ácido clorhídrico 0,1 N hasta un volumen de 100 cm³ (solución madre).

5.6 SOLUCION DE TRABAJO DE CLORHIDRATO DE TIAMINA

A partir de la solución madre (5.5) se hacen diluciones cuantitativas con solución de cloruro de potasio acidulado (5.1) hasta obtener una concentración final de 0,5 a 1 µg/cm³.

5.7 SOLUCION ACUOSA DE ACIDO CLORHIDRICO (32% d = 1,19) 0,1 N.

5.8 SOLUCION ACUOSA DE ACIDO CLORHIDRICO (32% d = 1,19) 0,2 N.

5.9 PERMUTITA T (Decalso activado).

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del "producto" que contenga de 50 a 100 µg de vitamina B1.

7 PROCEDIMIENTO

Se procede conjuntamente con muestra y patrón a la misma concentración y en las mismas condiciones.

7.1 EXTRACCION

7.1.1 Se pesa o mide en un vaso de precipitado de capacidad adecuada una cantidad de muestra que contenga de 50 a 100 μg de vitamina B1. Si la muestra es sólida debe pulverizarse previamente.

7.1.2 Se añaden aproximadamente 80 cm^3 de la solución ácida (ácido clorhídrico 0,1 N ó ácido clorhídrico 0,2 N).

7.1.3 Se calienta en baño de maría por un tiempo comprendido entre 1 y 2 horas de acuerdo a la naturaleza del alimento (para alimentos ricos en proteínas se calienta por 2 horas), con agitación continua.

7.1.4 Se enfría el extracto a temperatura ambiente, se mezcla y se centrifuga por aproximadamente 10 minutos a 2000 r.p.m.

7.1.5 Se trasvasa cuantitativamente el sobrenadante a un vaso de precipitado de 100 cm^3 , se lava el precipitado y se reúne el sobrenadante; se ajusta el pH de 3 a 4 con hidróxido de sodio 0,1 N y se enrasa con agua en un matraz aforado, de 100 cm^3 .

7.2 PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA

7.2.1 Preparación de la columna

7.2.1.1 Permutita T o Decalco Activado.

En una columna de 1 cm de diámetro, se añade agua hasta 15 cm de altura, se le agrega entre 3 y 5 g de la resina catiónica, de acuerdo con la cantidad de interferencias (cationes intercambiables). Se deja sedimentar y se vacía el agua, lavando la columna 2 veces con porciones de 10 cm^3 de agua (no se debe dejar secar).

7.2.2 Cromatografía

7.2.2.1 Se toma una alícuota de la solución obtenida en el punto 7.1.5 que contenga de 5 a 10 μg de tiamina y se pasa por la columna de Decalco Activado, ya preparada.

7.2.2.2 Se hacen varios lavados con agua hirviendo con porciones menores de 5 cm^3 hasta que el eluato salga incoloro. Descartar dichos lavados.

7.2.2.3 Para eluir la vitamina B1 se agrega cloruro de potasio acidulado hirviendo en porciones de 3 cm^3 por vez recogiendo en un matraz aforado de 50 cm^3 . Las gotas de la columna deben regularse, de manera que se recoja a una velocidad de 1 cm^3/min .

NOTA: Se debe tener cuidado que la solución de cloruro de potasio acidulado no se enfríe, de lo contrario precipita y tapa la columna.

7.3 DESARROLLO DE LA FLUORESCENCIA

7.3.1 Se coloca en un embudo de separación de 125 cm^3 , 5 cm^3 de la solución de la muestra obtenida en el punto 7.2.2.3, la cual contiene de 0,5 a 1 μg de

vitamina B1.

7.3.2 Se añaden 3 cm³ de solución oxidante, se mezclan suavemente por rotación y se deja reposar por 1 minuto.

7.3.3 Se añaden 15 cm³ (exactamente medidos) de isobutanol, se agita vigorosamente por 2 minutos, se dejan separar las dos capas, se decanta la capa acuosa y se seca la capa isobutanólica con sulfato de sodio anhidro. Si es necesario, se centrifuga.

7.4 LECTURA FLUOROMETRICA

7.4.1 Se lee el extracto isobutanólico en el fluorómetro con un filtro primario (Longitud de Onda Excitadora) = 360, y un filtro secundario (Longitud de Onda Analizadora) = 430 usando isobutanol para ajustar el aparato.

7.4.2 Se hace un blanco siguiendo el procedimiento descrito en desarrollo de fluorescencia pero en lugar de los 3 cm³ de solución oxidante (7.3.2) se añaden 3 cm³ de hidróxido de sodio al 15%.

7.5 CURVA PATRON

7.5.1 Se preparan 5 diluciones de la solución madre que contenga entre 0,5 µg/5 cm³ y 2 µg/5 cm³ y se prosigue como se indica en los puntos: 7.3.1, 7.3.2, 7.3.3, 7.4.1 y 7.4.2.

NOTA 1: La lectura 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 la misma concentración.

NOTA 2: La concentración de la solución de trabajo del patrón y la concentración de la muestra a ensayar pueden variar de acuerdo a los resultados obtenidos en la curva patrón y en todo caso debe cumplirse la nota 1.

8 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El contenido de vitamina B1 en la muestra se expresa en miligramos de vitamina B1 por 100 g de muestra y se calcula como sigue:

$$B = \frac{C \times (M-b) \times 100 \times Fd}{(P-b) \times m \times 1000} = \text{mg de vitamina B1/100 g de muestra}$$

Donde:

B = contenido de vitamina B1 en la muestra, en mg/100 g.

C = concentración del patrón de referencia, en µg/5 cm³.

M = lectura fluorométrica de la muestra.

b = lectura fluorométrica del blanco correspondiente a la muestra.

- P = lectura fluorométrica del patrón.
b₁ = lectura fluorométrica del blanco correspondiente al patrón.
Fd = factor de dilución.
m = cantidad de muestra pesada, en gramos.

9 INFORME

En el informe se debe indicar:

- a) Realizado según la norma Venezolana COVENIN No. 2381-86.
- b) Fecha en la cual se realizó el ensayo.
- c) Identificación de la muestra.
- d) Resultado del ensayo.
- e) Observaciones.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Strohecker, R H, M Henning 1965. "Vitamin Assay" Published by Verlag Chemie Gm bh. Weinheim/Bergstr and Academic Press. New York and London Pág. 289.
- 2) Laboratorios de la Sección de Bioquímica-Vitaminas del I.N.H. "RR".

COVENIN
2381-86

CATEGORIA
B

**COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO**

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

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

CARACAS

publicación de:



CDU 641:577.164:576.808

ISBN 980-06-0039-6

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.
