

NORMA VENEZOLANA

COVENIN
3483:1999

PRÓLOGO

La presente norma fue elaborada de acuerdo a las directrices del Comité Técnico de Normas Técnicas CT18 Productos Alimentarios por el Subcomité Técnico SCT3 Aceites y grasas, a través del convenio para la elaboración de normas suscritos entre ASOGRASAS y FONDONORMA, siendo aprobada por FONDONORMA en la reunión del Consejo Superior N° 1999-09 de fecha 18/08/1999.

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes entidades:
Ministerio de Sanidad y Asistencia Social; Instituto Nacional de Higiene y
Fundación CEPE; Asociación de Industrias de Alimentos Vegetales ASOINDIA;
Vegetales Comestibles ASOGRASAS; COFOGA; Grasa Vegetal y
Foods; MAVESA; OLEOGRASAS; REMAVENCA; y
FACEGRA.

ACEITES Y GRASAS VEGETALES. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE VITAMINA A AÑADIDA



PRÓLOGO

La presente norma fue elaborada de acuerdo a las directrices del Comité Técnico de Normalización **CT10 Productos Alimenticios** por el Subcomité Técnico **SC13 Aceites y grasas**, a través del convenio para la elaboración de normas suscrito entre **ASOGRASAS** y **FONDONORMA**, siendo aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior N° 1999-09 de fecha 18/08/1999.

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes entidades: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social; Instituto Nacional de Higiene; Fundación CIEPE; Asociación de Industriales de Aceites y Grasas Vegetales Comestibles **ASOGRASA**; **COPOSA**; **Grasas Valencia**; **Kraft Foods**; **MAVESA**; **OLEOGRASAS**; **REMAVENCA** y **UNILEVER-FACEGRA**.



NORMA VENEZOLANA
ACEITES Y GRASAS VEGETALES.
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA
DE VITAMINA A AÑADIDA

COVENIN
3483:1999

1 OBJETO

Esta Norma Venezolana establece los métodos para la determinación de vitamina A añadida por cromatografía en aceites y grasas vegetales y margarinas.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Esta norma es completa.

3 MÉTODOS DE ENSAYO

3.1 Método A

3.1.1 Aparatos y Materiales

- 3.1.1.1 Balanza analítica.
 - 3.1.1.2 Vortex (mezclador).
 - 3.1.1.3 Equipo de filtración de solventes HPLC.
 - 3.1.1.4 Bomba de vacío.
 - 3.1.1.5 Propipeta.
 - 3.1.1.6 Cromatógrafo líquido de alta presión con válvula que controla la cantidad de muestra, equipada con loop de 5 microlitros.
 - 3.1.1.7 Procolumna de fase normal
 - 3.1.1.8 Columna de fase normal silica 3U longitud 100 mm I.D. 4,6 mm.
 - 3.1.1.9 Detector, que permite medir la absorbancia en 325 nm.
 - 3.1.1.10 Bomba que permite obtener flujo constante de fase móvil por el sistema
 - 3.1.1.11 Beakers de 50 ml.
 - 3.1.1.12 Balones volumétricos de 10 ml y 100 ml.
 - 3.1.1.13 Fiolas de 250 ml y 500 ml
 - 3.1.1.14 Pipeta 5 ml.
 - 3.1.1.15 Jeringa de 25 μ l para inyectar al cromatógrafo líquido de alta presión.
 - 3.1.1.16 Tubos de centrifuga de 25 ml.
- #### **3.1.2 Reactivos**
- 3.1.2.1 N-Heptano HPLC
 - 3.1.2.2 Isopropanol HPLC.
 - 3.1.2.3 Agua grado HPLC.
 - 3.1.2.4 Etanol pa.

3.1.2.5 Éter de petróleo pa.

3.1.3 Preparación de soluciones y patrones

3.1.3.1 Patrones

3.1.3.1.1 Partiendo de Vitamina A palmitato de 1.000.000 UI / g; pesar 0,1 g de éste y agregar 9.900 g de aceite puro de ajonjolí en un beacker de 50 ml y mezclar bien. Esta solución final es un patrón de 10.000 UI / g, a su vez partiendo de este último preparar patrones de 10 UI / ml y 5 UI / ml, de la siguiente manera:

3.1.3.1.2 Patrón 10 UI/ml. Pesar 0,100 g de patrón de 10.000 UI/g en el balón volumétrico de 100 ml y llevar hasta el aforo con hexano grado HPLC.

3.1.3.1.2.1 Patrón de 5 UI/ml. Tomar 5 ml de patrón de 10 UI / ml en un balón volumétrico de 10 ml y aforar con hexano.

3.1.3.2 Fase móvil

Preparar medio litro de fase móvil mezclando 500 ml de hexano grado HPLC y 0,25 ml de Isopropanol grado HPLC (99,5 hexano : 0,5 isopropanol) agitar bien y filtrar la solución antes de ser utilizada.

3.1.3.3 Curva de calibración

Preparar la curva de calibración inyectando los patrones de vitamina A palmitato en concentraciones desde 5 hasta 10 UI/ml y utilizando área de picos versus la concentración inyectada.

Se puede utilizar el sistema de procesamiento de datos para almacenar la curva de calibración.

3.1.4 Preparación de la muestra

Pesar 1 g de margarina en un tubo de centrifuga, agregar 5 ml de éter de petróleo, agitar con vortex por un minuto; luego agregar 5 ml de la solución al 60 % etanol - agua, agitar y dejar separar las fases. Centrifugar la muestra si es necesario. Inyectar la capa superior al cromatógrafo líquido de alta presión.

3.1.5 Condiciones de trabajo

Detector de longitud de onda 325 nm, flujo del solvente 1 ml/min.

3.1.6 Cálculos

$$C = \frac{R}{P} \times 5 \times 1000 \text{ [UI / kg]}$$

Donde:

R = Resultado de análisis cromatográfico en UI/ml

C = Concentración de Vitamina A palmitato en margarina [UI/Kg]

P = Peso de la muestra en gramos (g).

3.1.7 Informe

En el informe debe contener lo siguiente:

3.1.7.1 Fecha de realización del ensayo

3.1.7.2 Identificación completa de la muestra

3.1.7.3 Resultado del análisis realizado

3.1.7.4 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada

3.1.7.5 Nombre del analista

3.1.7.6 Observaciones.

3.2 Método B. Determinación cuantitativa de vitamina A en margarinas

3.2.1 Principio

Este método se basa en la determinación del área de la vitamina A (todo-trans-retinol) a un tiempo de retención específico; en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), previa saponificación y extracción

3.2.2 Materiales y Aparatos

3.2.2.1 Matraz de ebullición fondo redondo de 500 ml.

3.2.2.2 Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.

3.2.2.3 Cilindros graduados de 5 y 10 ml.

3.2.2.4 Embudos de separación de 1.000 ml.

3.2.2.5 Agitadores magnéticos y mecánicos.

3.2.2.6 Refrigerantes.

3.2.2.7 Baño de vapor.

3.2.2.8 Campana de extracción.

3.2.2.9 Rotavapor.

3.2.2.10 Balón aforado de 25 ml.

3.2.2.11 Ultrasonido.

3.2.2.12 Balanza analítica.

3.2.2.13 Cromatógrafo líquido de alta presión.

3.2.3 Reactivos

Todos los reactivos indicados a continuación son de grado analítico y el agua debe ser destilada y desmineralizada.

3.2.3.1 Vitamina A, patrón USP (1 g contiene 33,6 mg de todo-trans-retinol y 0,3 mg del mismo, equivalente a una unidad internacional de vitamina A).

3.2.3.2 Vitamina A, solución trabajo de 100 UI / 10 ml..

3.2.3.3 h-Hexano HPLC.

3.2.3.4 Éter de petróleo HPLC.

3.2.3.5 Ester dietílico HPLC.

3.2.3.6 Etanol absoluto mínimo 99,8 %.

3.2.3.7 Alcohol isopropílico mínimo 99,8 %.

3.2.3.8 Sulfato de sodio anhidro.

3.2.3.9 Bombona de nitrógeno con certificado de análisis.

3.2.3.10 Solución de hidroquinona al 10 % en etanol absoluto.

3.2.3.11 Solución de hidróxido de potasio al 90 %.

3.2.3.12 Solución de feoftaleína al 1 % en etanol absoluto.

3.2.4 Procedimiento

Debe procederse conjuntamente con muestra y patrón.

3.2.4.1 Saponificación: A la cantidad pesada o medida que contenga las 100 U.I de vitamina A, bien sea que se haya hidrolizado o no, se le añaden 15 ml de alcohol isopropílico, solución de hidróxido de potasio al 90 % 40 ml, el cual puede modificarse de acuerdo a la pesada y de 5 ml de solución de hidroquinona al 10 %. Mezclar bien y saponificar por 40 minutos, bajo reflujo, en un baño de vapor con una ligera corriente de nitrógeno.

NOTA 1: los mililitros de alcohol pueden aumentarse de acuerdo con los mililitros KOH añadidos, pero que no excedan los mismos.

NOTA 2: Debe fundirse previamente la margarina aplicando calor sin exceder de los 40 ° C.

3.2.4.2 Extracción: Cuando la saponificación este terminada, se enfría el balón y se trasvasa su contenido cuantitativamente a un embudo de separación de 1000 ml, con ayuda de agua.

3.2.4.3 Se extrae la fracción insaponificable con un máximo de 3 porciones de éter de petróleo o éter dietílico o una mezcla de partes iguales de éstos dos últimos. La primera de 150 ml, se agita vigorosamente por 2 minutos (dejar escapar los gases antes de agitar vigorosamente).

Las siguientes extracciones se hacen con 100 ml.

3.2.4.4 Se reúnen los extractos del solvente usado y se lavan con porciones de aproximadamente de 100 ml de agua hasta que los lavados den reacción neutra a la fenoltaleína. Secar los extractos del solvente con 5 g sulfato de sodio anhidro y trasvasarlos a un balón de evaporación de capacidad adecuada, lavar el sulfato de sodio anhidro con 30 ml del solvente de extracción utilizado.

3.2.4.5 Evaporar a sequedad en el rotaevaporador al vacío, removiendo el balón de evaporación inmediatamente que se ha evaporado el solvente.

3.2.4.6 Inyectar 10 µl tanto de patrón como de muestra en un cromatógrafo líquido de alta presión, fijando las siguientes condiciones de trabajo:

Velocidad de reflujo: 1 ml/min.

Detector U.V.

Longitud de onda 313 nm.

Atenuación 0,02.

3.2.5 Cálculos

Determinar la concentración de la vitamina A, en U.I./ml presente en la última dilución de la muestra, aplicando la siguiente fórmula:

$$C_m = C_p \times \frac{A_m}{A_p}$$

Donde:

C_m = Concentración de la muestra en UI/ml

A_m = Área de la muestra

A_p = Área del patrón

C_p = Concentración del patrón en U.I./ml presente en la última dilución de la muestra, calibrando el mismo con la solución del patrón.

3.2.6 Informe

Véase el punto 3.1.7

BIBLIOGRAFÍA

Man and K. Philipp. Determination of vitamin A in complete feeds, premixes and vitamin concentrates with HPLC.

Libro de Técnicas del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Participaron en la revisión de esta norma: Benavente, Hector; Chacín, Yulay; Dávila Saskia; Dramiński, Wojciech; Gil, Wilma; González, Mario; Noguera, Deinny; Rosa, Yadira; Useche, Morelia.



COVENIN
3483:1999

CATEGORÍA
B

FONDONORMA
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12
CARACAS

publicación de:



I.C.S: 67.200.10

ISBN: 980-6019-44-X

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

Descriptores: Aceite y grasas, vitamina A, cromatografía.