

Determinación Cuantitativa de Vitamina A en Productos Cárnicos, por cromatografía de líquidos de alta eficacia

TH, REUVERS

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Majadahonda. Madrid. España.

La importancia de la vitamina A en la nutrición humana es bien conocida siendo necesaria para el desarrollo, reproducción y conservación de la salud. La falta de vitamina A en la dieta causa inhibición del crecimiento y ceguera nocturna. Los alimentos que contribuyen al aporte necesario de vitamina A son principalmente el hígado, la leche y sus derivados y los alimentos ricos en carotenos, precursores de la vitamina A. Sin embargo, en la elaboración de los productos alimenticios, frecuentemente tiene lugar una degradación de las vitaminas. Por esta razón, ha constituido motivo de interés, el estudio sobre el contenido de la vitamina A en pasta de hígado ("foie-gras"), especialmente en su forma, todo-trans-retinol.

Existen varios métodos clásicos para la determinación cuantitativa de la vitamina A basados en su absorción en UV, su reacción colorimétrica con tricloruro de antimonio ó con diclorohidrina de glicerol (1,2). En muestras complejas como son los alimentos, existen interferencias que previamente deben ser eliminadas por cromatografía de columna, lo cual puede llevar a importantes pérdidas de la vitamina, como consecuencia de su sensibilidad a la luz y su inestabilidad en contacto con oxígeno.

La aplicación de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (CLAE) a los análisis farmacéuticos, clínicos y bromatológicos es relativamente reciente. La determinación de retinol por esta técnica en margarina (5), leche (7), aceite comestible (3), sangre (6) y productos farmacéuticos (8) ha sido objeto de publicaciones en revistas de la especialidad.

En el presente trabajo se ha empleado la cromatografía de líquidos para la determinación de todo-trans-retinol en pasta de hígado. El método aquí descrito se lleva a cabo en tres pasos: saponificación, extracción y cromatografía.

Método

Aparatos y material

- Equipo de cromatografía de líquidos de Waters: Bomba (Modelo 6.000); Inyector (Modelo U6K); Detector (Modelo 440) de λ fija 313 nm. Columna RadPack C₁₈, 10 μ m, en compresión radial Registro (Data Module 720) con integración de área de pico.
 - Baño de ultrasonido para la desgasificación de los eluyentes.
 - Material de vidrio topacio.
 - Espectrofotometro con posibilidad de medida a 620 nm.
- Reactivos.
- Acetato de todo-trans-retinol (Serva Feinbiochemica, Heidelberg).
 - Pirogalol (Merck)
 - Disolventes de grado CLAE: n-hexano, etanol, metanol, cloroformo.
 - Agua destilada, tratada por Mili Q y filtrada por filtros de 0,45 μ m.
 - Solución Carr-Price: 250 g/l de tricloruro de antimonio en cloroformo (2).

Cromatografía de líquidos.

- Preparación de la curva patrón: Se prepara una solución patrón de 50 U.I./ml. en isopropanol, (1 Unidad Internacional corresponde a 0,344 μ g. de acetato de todo-trans-retinol) partiendo de una solución madre. Dicha solución madre se valora previamente por U.V. a 325 nm., teniendo en cuenta que $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1.900$ para acetato de retinol en isopropanol. A seis matraces topacio de 250 ml. con boca esmerilada, se añaden respectivamente 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 ml. de la solución patrón correspondientes a contenidos de 0,25, 50, 100, 150 y 200 U.I. de retinol. Se completan con agua destilada hasta 10 ml. sometiendo seguidamente estas soluciones al proceso de saponificación, extracción e inyección en el sistema cromatográfico, tal y como se describe a continuación.
- Preparación de la muestra: Se pesan 1,0 g. de la muestra, previamente homogeneizada, en un matraz topacio de 250 ml. con boca esmerilada, evitando la luz directa. Se añade 5-10 ml. de agua dest., agitando energicamente hasta la obtención de una suspensión exacta de grumos.
- Saponificación y extracción: A patrones y muestra se añaden 50 mg. de pirogalol, 25 ml. de etanol y 8 ml. de una solución de KOH en etanol (0,25 g/ml.) preparada inmediatamente antes de su uso. Después de mezclar bien se lleva a reflujo a baño María y en atmosfera de nitrógeno durante 30 min.. Después de enfriar rápidamente con agua corriente, se añaden 20 ml. de agua dest. y se extrae con 2 porciones de 50 ml. n-hexano. Los extractos reunidos se lavan con 5 porciones de 25 ml. de agua dest. y se hacen pasar seguidamente por un filtro que contiene sulfato sódico anhidro, lavando el filtro a continuación con 10 ml. de hexano. El extracto se evapora al vacío hasta sequedad, aplicando corriente de nitrógeno para los últimos ml. y se trata el residuo con 4 ml. de hexano.
- Cromatografía de alta eficacia: La cromatografía se realizó en las siguientes condiciones:

	Volúmen inyectado : 20 μ l
	Fase móvil : metanol/agua (96+4)
Tabla 1	Columna : Columna Rad Pak C ₁₈ , 10 μ m, en compresión radial
	Flujo : 1 ml/min.
	Detector: U.V. 313 nm.
	Tiempo de retención : 6,90 - 6,95

La cuantificación de la vitamina A en la muestra se efectuó comparando las áreas de pico de la muestra y las áreas de pico del patrón y teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

Método colorimétrico (Carr-Price)

- Preparación de la muestra y de la curva patrón: Partiendo de 1-3 g. de la muestra homogeneizada ó en el caso de la curva patrón entre 10 y 100 UI de vitamina A, se sigue el método de saponificación y posterior

extracción con eter etílico, evaporando una alicuota del extracto etereo anhidro y disolviendolo en cloroformo (1,2)

Reacción colorimétrica: Se toma 1 ml de la solución clorofórmica de la muestra y se pasa a un tubo del colorímetro. Se añade una gota de anhídrido acético y 4 ml del reactivo Carr-Price y se mide inmediatamente a 620 nm. ya que esta reacción produce una coloración tan inestable que las lecturas deben realizarse en un intervalo de 5-10 segundos después de la adición del reactivo. La cuantificación de la vitamina A en la muestra se realiza, hallando el factor de conversión mediante la curva y aplicándolo a la lectura de la muestra, teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

Resultados y discusión

El método que se propone y aplica a la determinación de vitamina A en pasta de hígado resulta del estudio exhaustivo del problema concreto y de la selección y fijación de las condiciones más idóneas, el paso de la saponificación era necesario para convertir los esterios de retinol en su forma libre y también para eliminar grasas y otras sustancias que pueden causar interferencias en la cromatografía. La elección de la fase móvil está fundamentada en un compromiso entre la velocidad de la cromatografía y la obtención de picos de correcta integración.

Para establecer la sensibilidad y precisión del método se procedió a la saponificación y extracción de distintas cantidades de retinol y siguiendo el método descrito se inyectaron en el sistema cromatográfico alicuotas de 20 µl del extracto en hexano (4 ml), repitiendo las inyecciones para comprobar las áreas obtenidas a distintas escalas de sensibilidad del detector. Los resultados se incluyen en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores medios (\bar{x}) y desviación estándar (DE) obtenido de las áreas de pico después de 4 inyecciones a distintas sensibilidades del detector. Las restantes condiciones cromatográficas según Tabla 1.

Vit. A (U. I.)/ml	Unidades de area	
	\bar{x} (n=4)	+ DE
3,13	515	+ 30 (5,8%)
6,25	1038	+ 28 (2,7%)
12,5	2097	+ 46 (2,2%)
25	4202	+ 49 (1,2%)
50	8305	+ 41 (0,5%)

La curva de calibración obtenida aplicando este método se refleja en la fig. 1, mediante la cual puede calcularse el factor de respuesta, en estas condiciones, para el todo-trans-retinol en un margen de 0,25 - 50 UI/ml. Esto correspondería a 1-200 UI de vitamina A por gramo de pasta de hígado. Los valores inducidos como puntos de la curva, se repitieron en días sucesivos obteniendo total concordancia.

Comprobada así la validez de la técnica en cuanto a reproducibilidad aplicada a la solución patrón, se procedió a la obtención de un cromatograma partiendo de una preparación en hexano de pasta de hígado, previamente tratada siguiendo el método descrito. Un cromatograma típico de pasta de hígado se presenta en la fig.2. La comparación con el cromatograma de retinol patrón (fig.3) condujo a la identificación de vitamina A en el extracto de pasta de hígado. En las condiciones fijadas no se detectaron interferencias de otras sustancias, lo cual indujo a no modificar dichas condiciones, y a ensayar la reproductibilidad del método aplicado a la muestra de pasta de hígado.

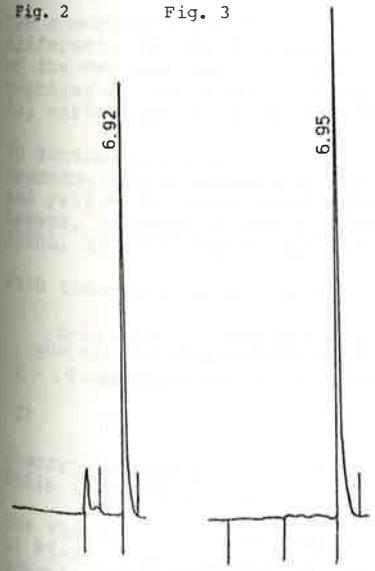


Fig 2 y 3. Cromatogramas de pasta de hígado (Fig 2) y de todo-trans-retinol (Fig 3)

Basándose en los resultados obtenidos en el ensayo de la reproductibilidad se prosiguió con un estudio de la recuperación de retinol añadido, aplicando el método propuesto a muestras en duplicado y comparando los resultados obtenidos con los correspondientes a los del método colorimétrico (Carr-Price), y se determinaron las cantidades de UI de vitamina A por g. también en las muestras que contenían el retinol añadido. Como puede observarse en la Tabla 4, los valores obtenidos por el método colorimétrico son superiores a los resultados de la cromatografía de líquidos tal

Unidades de area de pico

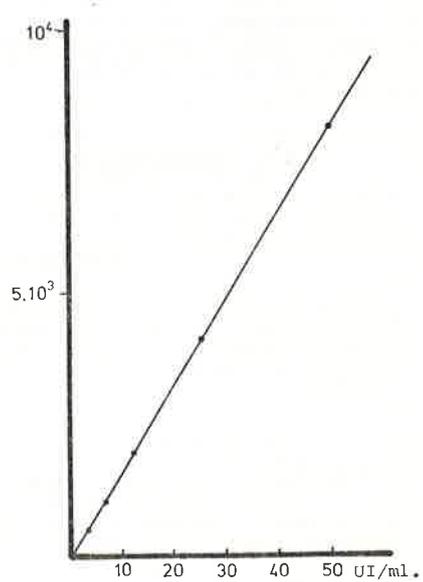


Fig 1. Curva de calibración, relacionando unidades de area y retinol/ml hexano

Tabla 3. Ensayo de reproductibilidad de una muestra de pasta de hígado en cuatro días sucesivos, según condiciones de la Tabla 1. Valores expresados en UI de vitamina A/g de pasta de hígado.

UI de vit. A/g pasta de hígado	\bar{x} (n=4)	+ DE
1º día: 99,4-100,0 - 104,2-89,0	98,2	+ 5,6
2º día: 102,8-108,3 - 116,1-111,1	109,6	+ 4,8
3º día: 109,9-114,0 - 115,4-115,7	113,8	+ 2,3
4º día: 101,3-113,8 - 101,0-105,0	105,0	+ 5,2
Media y DE sobre los 4 días:	106,7	+ 7,4 (6,9%)

Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de recuperación de retinol añadido, tanto por el método CLAE, como por el Carr-Price.

	Vitamina A en UI/g. de muestra:			
	CLAE		Carr-Price	
	Encontrado	Recuperado	Encontrado	Recuperado
Pasta de hígado	125,0	-	137,6	-
Pasta de hígado + 33,4 UI/g	157,9	98,5%	170,9	99,7%
Pasta de hígado + 50,1 UI/g	175,4	100,6%	189,6	104,0%

Finalmente se realizaron las determinaciones de vitamina A en una serie de pastas de hígado comerciales, aplicando la cromatografía de líquidos en las condiciones fijadas en la Tabla 1 paralelamente con el método colorimétrico Carr-Price, tal y como se ha descrito.

Los datos obtenidos están reflejados en la Tabla 5, (Medias de valores en duplicados). Como puede observarse los valores obtenidos con el método Carr-Price, son sistemáticamente superiores a los resultados cromatográficos lo cual coincide con las conclusiones de recuperación del retinol añadido (Tabla 4). Las muestras 4 y 6 fueron elegidas por la ausencia de hígado declarado en la composición del producto, lo cual fue confirmado por los valores mínimos de retinol encontrados.

CONCLUSIONES

Se ha propuesto un método de determinación de vitamina A en pasta de hígado, por CLAE, concretando las condiciones en las distintas fases del método.

El método es preciso y su sensibilidad mayor que la del colorimétrico para este tipo de muestra, no habiéndose detectado interferencias de ninguna clase.

Se han comparado los datos obtenidos en unos ensayos de recuperación de vitamina A añadida, tanto por el método CLAE, como por el Carr-Price, encontrando resultados satisfactorios en los porcentajes de recuperación, aunque la colorimetría aporte sistemáticamente valores superiores.

El método es rápido y fiable y en una jornada de trabajo normal puede realizarse el análisis de 6-8 muestras.

Tabla 5. Comparación de resultados de retinol (UI/g) en pasta de hígado, según el método de CLAE y el Carr-Price, respectivamente.

Muestra nº	UI de vitamina A/g. de muestra:	
	Método	
	CLAE	Carr-Price
1	135	145
2	145	151
3	138	151
4	0,5	2
5	61	99
6	0,3	3
7	55	63
8	83	86

AGRADECIMIENTO

Quiero hacer constar mi reconocimiento a la labor de todo el personal de Bromatología I, cuya colaboración ha sido esencial en la realización de este trabajo, y en especial al Auxiliar de Investigación, D. Eduardo Perogordo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Strohecker, R.; Henning, H.M. Análisis de Vitaminas. Ed. Montalvo. Madrid. (1967)
- 2.- Métodos de Análisis de Vitaminas. La Asociación de Químicos de Vitaminas. Inc. Ed. Academia. Leon España. pág. 68-76. (1969)
- 3.- Foppa, G.F. Riv. Ital. Sostanze grasse. 58 (6), 296-8. (1981).
- 4.- Bui-Nguyen, M.H.; Blanco, B. Experientia. 36 (3). 374-375. (1980)
- 5.- Thompson, J.N.; Maxwell, W.B.; J. A.O.A.C. 60(4), 766-771. (1977)
- 6.- Bieri, J.G.; Tolliver, T.J.; Catignani, G. L: The Am. J. of Clin. Nutrition. 32, 2143-2149 (1979).
- 7.- Thompson, J.N.; Hatine, G.; Maxwell, W.B. J. A.O.A.C. 63 (4), 894-898. (1980)
- 8.- Abdou, H.M.; Russo, F.M.; Fernandez, V: Pharm. Technology. 5 (3), 40-50. (1981)