

Validación de un método cromatográfico para la determinación de vitamina A en muestras de leche

**Karelen Araujo, Gisela Páez, Zulay Mármol, Elsy Arenas,
Ana Cáceres y Cateryna Aiello Mazzarri**

Universidad del Zulia, Facultad de Ingeniería, Laboratorios de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales. Dirección postal: Av. 16 Guajira. Facultad de Ingeniería
karelenaraujo@gmail.com

Recibido: 17-05-2013 Aceptado: 22-11-2013

Resumen

El objetivo de este trabajo fue validar un método para la determinación de vitamina A en leche en polvo. Se utilizaron tres marcas de leche en polvo de distribución masiva en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia. Se realizaron ensayos para determinar las condiciones de extracción y del sistema cromatográfico. En el proceso de extracción se fijó el tiempo de calentamiento de la muestra en 40 min. El contenido de vitamina A, se determinó utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con una columna C18 y un detector de UV-visible. La longitud de onda se fijó en 300 nm y el flujo de la fase móvil en 1,2 mL/min. Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 20.0. La selectividad del método se verificó empleando pruebas de degradación artificial (termólisis, oxidación y fotólisis) que permitieron observar los productos de degradación de la vitamina A en los cromatogramas. Se prepararon ocho estándares de vitamina A, para elaborar una curva de calibración que arrojó un coeficiente de correlación de 0,991. Para la repetibilidad del método se obtuvo una Desviación Estándar Relativa (RSD) de 1,37% y para la reproducibilidad una RSD de 1,33%. Se obtuvo un límite de detección (LOD) de 2,12 ppm y un límite de cuantificación (LOQ) de 5,54 ppm. El tiempo de retención de la vitamina A fue de $2,4 \pm 0,15$ min. El método estudiado resultó ser preciso, selectivo y exacto. Se encontró que el contenido de vitamina A de las tres marcas de leche estudiadas está por debajo del valor establecido por la Norma Venezolana COVENIN 1481:2001.

Palabras clave: Vitamina A, leche en polvo, HPLC, validación.

Validation of a chromatographic method for the determination of vitamin A in milk samples

Abstract

The present study aimed to determine vitamin A in three brands of powder milk of high consumption in Maracaibo city, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a C₁₈ column and UV-visible detector. It was necessary to change extraction method in order to improve the chromatograms obtained (heating time, wavelength, mobile phase flow rate, among others). For statistical analysis were used STATGRAPHICS Plus 3.1. The selectivity was verified using artificial degradation tests (thermolysis, oxidation and photolysis) that allowed us to observe the degradation products of vitamin A in the chromatograms. Eight standards were prepared to develop the calibration curve, which correlation coefficient was 0.991. The repeatability of the method indicated

a RSD of 1,37% and a reproducibility of 1,33%. The detection limit and the quantification limit and the results were 2,12ppm and 5,54ppm respectively. The studied method is precise, selective and accurate. The retention time of Vitamin A was $2,4 \pm 0,15$. The Vitamin A among determined in the three brands of power milk is lower than the established by the Venezuelan norm COVENIN 1481:2001.

Key words: Vitamin A, milk powder, HPLC, validation

Introducción

El retinol o vitamina A pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles y es esencial para el organismo, ya que ayuda a la formación y mantenimiento de la piel, tejidos blandos y óseos, dientes, membranas mucosas de nariz, garganta y pulmones. Desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue, además se puede requerir para la reproducción y la lactancia [1].

La dosis de vitamina A recomendada por el CODEX es de 2500 UI/750 μg para adultos, 3750 UI/1125 μg para madres lactantes y para niños 1667 UI/ 500 μg [1, 2]. La carencia de vitamina A trae diversas consecuencias, entre las que se destacan, inmunidad reducida, ceguera nocturna, xeroftalmia, daños en el tracto respiratorio y aparato digestivo, detención del crecimiento y desmejora en los procesos de reproducción y lactancia [3].

Entre las principales fuentes de la vitamina A se encuentra la leche, la cual se caracteriza por ser uno de los alimentos más nutritivos, debido a que tiene un alto contenido de proteínas de alta calidad, por lo que es indispensable en la dieta de los seres humanos. En Venezuela, la mayoría de la población, consume leche en polvo en su dieta diaria. Para obtener leche en polvo, la leche fresca se trata primero con calor y luego se deshidrata a través de procesos de secado. Estos procesos industriales destruyen algunas vitaminas, especialmente las A y D. Sin embargo, estos micronutrientes destruidos durante el procesamiento se pueden reemplazar mediante la fortificación. En Venezuela, la fortificación de la leche en polvo con vitamina A es obligatoria [4] y su análisis rutinario es necesario para el control de calidad de la misma.

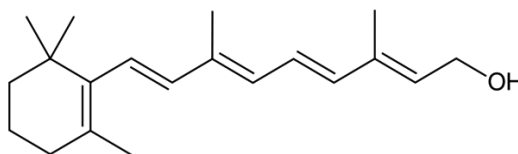
Gracias al avance de la tecnología y al desarrollo de nuevos métodos analíticos es posible conseguir resultados exactos y reproducibles en la determinación de vitaminas en leche. Una de las técnicas que arroja buenos resultados para la determinación de Vitamina A, es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa [5].

El principal objetivo de este trabajo es validar un método para la determinación del contenido de vitamina A leche en polvo, empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección UV-Visible. Se utilizaron tres marcas de leche en polvo que se distribuyen en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, por lo cual se compararon los resultados encontrados con los estándares establecidos por las Normas COVENIN para el parámetro estudiado.

Fundamentos teóricos

Las formas activas de la vitamina A son el retinol, el retinal y el ácido retinoico [1]. La vitamina A se encuentra tan sólo en productos animales; las principales fuentes son el hígado, la yema de huevo, la mantequilla y la leche. Entre las funciones fisiológicas de esta vitamina se destacan: desarrollo placentario y crecimiento del embrión y el feto, potenciar el desarrollo de los huesos y desarrollo de la visión nocturna y la percepción del color. El β -caroteno es un precursor de la vitamina A y tiene propiedades antioxidantes. Este se encuentra en muchos productos vegetales como en las hojas de color verde oscuro (espinacas), varias frutas pigmentadas y hortalizas, como mangos, tomates y zanahorias. [3].

Figura 1. Estructura molecular del retinol [6]



Determinación de vitamina A por cromatografía de alta resolución

Los sistemas cromatográficos han sido muy utilizados para la determinación de vitamina A en los alimentos. Gross *et al.*, [7] estudiaron las deficiencias de vitamina A y zinc en leche materna. Determinaron la vitamina A utilizando HPLC en fase reversa y encontraron que el 70% de las mujeres presentaron una baja concentración de vitamina A en su leche materna. Pérez [5] validó una metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos mediante HPLC en fase reversa utilizando una columna C18. El tiempo de corrida por muestra fue de siete minutos. Para establecer la precisión del sistema evaluaron tres parámetros, tiempo de retención, área y altura de pico, obteniendo una desviación estándar relativa (RSD) máxima de 1,78%. En la linealidad obtuvieron un coeficiente de correlación $r^2 = 0,99$ y una precisión con un RSD de 2,70%. Evaluaron la exactitud del método en términos de recuperación mediante la adición de vitamina A al alimento, alcanzando una recuperación de 97,98%. Establecieron la sensibilidad del método con un límite de detección (LOD) de $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ y un límite de cuantificación (LOQ) de $0,58 \mu\text{g g}^{-1}$.

López *et al.*, [8] desarrollaron y validaron una metodología para la cuantificación de vitamina A en leche humana. Para la separación y cuantificación de vitamina A, utilizaron la técnica de HPLC, con una columna C18, fase móvil metanol/agua (91:9 v/v) y detector de fluorescencia. De los parámetros analíticos de linealidad obtuvieron un coeficiente de correlación $r^2 = 0,9995$, límites de detección $0,010 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de cuantificación $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$, precisión del método (RSD 9,0% en el día y RSD 8,9% entre días) y la exactitud determinada a través de los porcentajes de recuperación fue 83,8.

Chavez-Servin *et al.*, [9] determinaron el contenido de vitamina A y vitamina E en leche en polvo infantil a base de fórmulas y cómo fue su degradación en el tiempo, mediante la técnica de HPLC en fase normal. Para el análisis estadístico, emplearon el análisis de la varianza (ANOVA), así como comparaciones múltiples, mediante la prueba de Tukey para cada caso y tiempo de almacenamiento (0, 30 y 70 días). Encontraron que inmediatamente después de abrir los paquetes, la vitamina A varió de 0,55 a $0,94 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ y la vitamina E de 6,58 a $27,8 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. Indicaron que todas las fórmulas cubrieron los límites mínimos para las vitaminas A y E establecidos por la actual legislación española y europea, incluso después de 70 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Parte Experimental

Equipos, estándares y reactivos y materiales

Se utilizó un sistema HPLC (Agilent Technologies) equipado con inyector manual, bomba con sistema de gasificación, detector de arreglo de diodos (longitud de onda variable), integrador y software para el procesamiento de datos cromatográficos. La separación cromatográfica se realizó en una columna cromatográfica de acero inoxidable C18 para fase reversa, de 25cm x 4,6 mm de diámetro interno y $5 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula, con guarda columna con cartucho C18. Se empleó un sonicador o baño ultrasónico (ELMA), un rotavapor (Buchi Rotavapor R-114), un baño de maría (Buchi Water bath B-48), un enfriador (Haake), un equipo de filtración al vacío y una centrifuga (Dupont, GLC-2B). Los estándares y reactivos utilizados fueron vitamina A, palmitato ($1\text{g} = 1800000\text{UI}$) (Merck), metanol y etanol grado HPLC (Sigma Aldrich), hidróxido de sodio al 98%, ácido ascórbico (Sigma Aldrich), hexano grado

HPLC (Burdick & Jackson) y 2-Propanol (Fischer). Se utilizó material de vidrio Pyrex®. Todos los materiales utilizados se lavaron con agua y jabón, se curaron con agua destilada, luego con agua desionizada y finalmente se colocaron en un secador a 60°C.

Preparación de la curva patrón

Para la realización de la curva de calibración se pesó 0,1g de vitamina A de concentración 1.800.000UI g⁻¹, se colocó en un matraz de 500 mL y se agregó metanol grado HPLC hasta el aforo para obtener una concentración de 200mg L⁻¹. Luego se calculó el volumen necesario para la preparación de los patrones.

Muestras

Se analizaron tres marcas de leche en polvo comercial y de cada una se analizaron dos lotes. Por cada lote se analizaron tres muestras por triplicado, obteniendo un total de 18 muestras.

Tratamiento de los estándares y de las muestras

Todos los materiales de vidrio que contenían al analito se cubrieron con papel aluminio a lo largo de todo el procedimiento de extracción, así como también los empleados para la inyección de las muestras y de los estándares al sistema cromatográfico. Los estándares, muestras y solventes se filtraron empleando el papel filtro de nylon. Luego se trataron con ultrasonido durante 30 minutos con el propósito de remover los gases presentes.

Extracción de la vitamina A en la leche

Para la extracción de la Vitamina A presente en la leche, se pesó 20 g de leche en un balón de base plana de 1000 mL, se colocó un magneto y se adicionó 70 mL de etanol absoluto, se burbujeó nitrógeno por cinco segundos, se tapó y se calentó a 40°C durante 40 minutos. Luego, se agregó 20 mL de solución de KOH al 50% y se saponificó la mezcla por 40 minutos con una agitación de 200 rpm en la centrifuga. Se agregaron tres porciones de agua (20 mL, 20 mL y 10 mL) con reposo de 10 minutos entre cada adición. Luego la solución se agitó, enfrió a temperatura ambiente y se filtró al vacío. El filtrado se colocó inmediatamente en una pera de separación de 250 mL cubierta con papel aluminio y se adicionó 50 mL de hexano para proceder a la extracción. La mezcla se agitó durante 20 segundos y se esperó la separación de las fases.

La fase superior (fase orgánica) se colocó en un balón de 250 mL de base redonda, que contenía aproximadamente 0,5 g de ácido ascórbico. La extracción se repitió dos veces más y los extractos se juntaron en el balón de 250mL. Se evaporó a sequedad el solvente, haciendo uso de un rotavapor con baño de agua a 40°C. El residuo se diluyó inmediatamente con metanol grado HPLC y se llevó a volumen en un matraz volumétrico de 10 mL. Finalmente, la solución se pasó por un filtro de 0,2 µm y se inyectó manualmente al cromatógrafo [5].

Adecuación del procedimiento de extracción

El método de extracción propuesto por Pérez [5] no especifica el tiempo de calentamiento de la muestra con etanol, por lo que fue necesario ensayar con diferentes tiempos (20, 25, 30, 35, 40 y 60 minutos). La selección del tiempo de calentamiento se hizo en función de los cromatogramas obtenidos luego de inyectar las muestras en el sistema cromatográfico. Al inyectar las muestras calentadas a tiempos menores de 40 minutos se obtuvieron cromatogramas con baja resolución, en cambio las muestras que fueron calentadas por 40 minutos ó más arrojaron picos bien definidos, es por ello que se seleccionó un tiempo de calentamiento de 40min.

De igual forma se estandarizó la cantidad de agua añadida y el tiempo de adición en el proceso de saponificación con KOH, así como también se fijó la velocidad de agitación. Todas las muestras fueron saponificadas con una solución de KOH al 50% por 40min con una velocidad de agitación de 200rpm.

Adecuación del sistema cromatográfico.

Con el propósito de obtener los mejores espectros de absorción de la vitamina A, se realizaron diferentes ensayos variando las condiciones cromatográficas propuestas por Pérez [5]. Se contemplaron principalmente aspectos relacionados con la influencia de la longitud de onda de detección (242, 250, 280 y 300 nm) y flujo de la fase móvil (1,0; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mL min⁻¹). De acuerdo a los cromatogramas obtenidos se fijó la longitud de onda en 300 nm y el flujo de la fase móvil en 1,2 mLmin⁻¹. La selección de estos parámetros se realizó en función de la selectividad, simetría de las señales y tiempos de corrida. Las condiciones de operación empleadas fueron: sistema isocrático, flujo 1,2 mL min⁻¹, volumen de inyección 20µL, detector Absorbancia (UV) 300nm, temperatura 28 °C, con metanol como fase móvil.

Análisis estadístico

Para evaluar los parámetros de validación del método cromatográfico se realizaron pruebas t-Student. Los datos obtenidos en relación al contenido de vitamina A se analizaron utilizando el programa SPSS 20.0. Se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre las muestras. Se fijó el nivel de significancia a $P \leq 0,05$.

Resultados y Discusión de Resultados

Validación del método

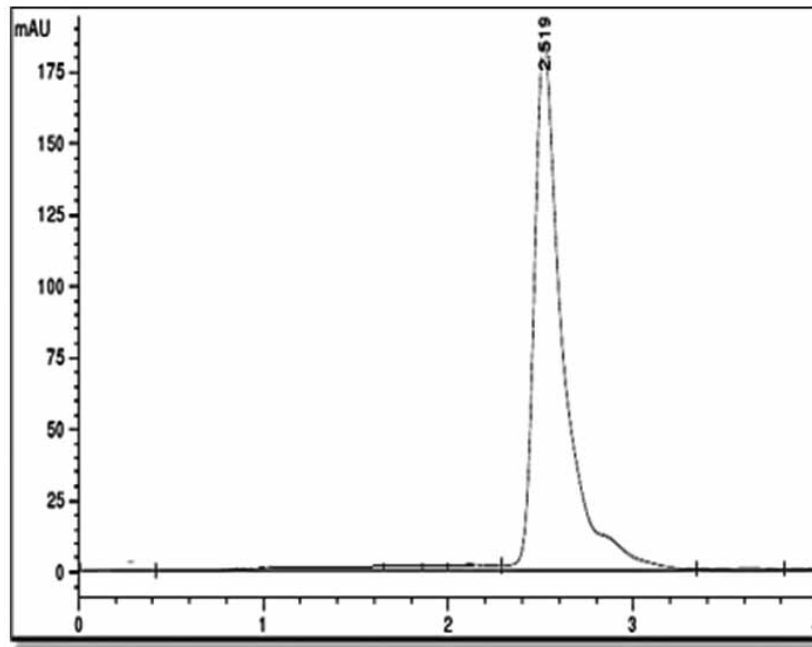
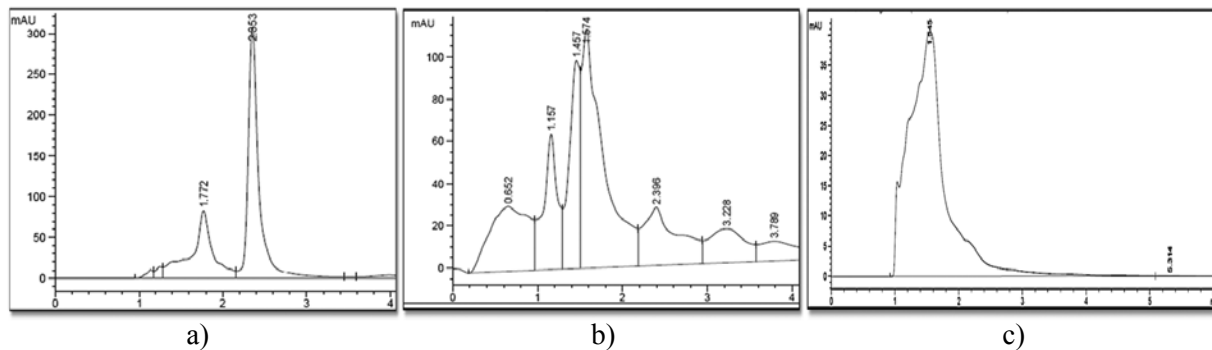
Los parámetros evaluados para la validación del método fueron selectividad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad.

Selectividad

La selectividad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes, en la matriz de la muestra [10]. Para determinar la selectividad del método cromatográfico desarrollado se ensayaron diferentes degradaciones artificiales, calentamiento a 80°C, oxidación con agua oxigenada y exposición a la luz solar indirecta por 60 días. En la Figura 1 se presenta el cromatograma de una muestra sin someterla a ningún tipo de degradación. En la Figura 2 se presentan los cromatogramas obtenidos luego de aplicar las degradaciones mencionadas anteriormente. Al comparar las Figuras 1 y 2 se observa que el método es selectivo debido a que se pueden diferenciar los productos de degradación del analito.

Linealidad

Considerando los resultados mostrados en la Tabla 3, se puede ratificar que el método estudiado resultó lineal en el rango de concentraciones de 5mg L⁻¹ a 40mg L⁻¹, ya que el valor del coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación son iguales a 0,99 y 0,98 respectivamente. Así como también al aplicar la prueba t de Student se obtiene que el valor de t experimental (tr) es mayor que el t tabulado, esto indica que existe una correlación lineal significativa entre los valores de "x" y "y". Se observa que el valor cero se encuentra entre los límites calculados para el intercepto, el valor de la pendiente es significativamente distinta de cero y el resultado obtenido para el coeficiente de variación de los factores de respuesta es menor que el valor máximo establecido, para una nivel de confianza del 95%.

Figura 1. Cromatograma de la muestra sin alteración**Figura 2. Degradaciones artificiales, (a) calentamiento a 80°C, (b) oxidación con agua oxigenada y (c) exposición a la luz solar indirecta por 60 días**

Precisión

En el estudio de precisión, el coeficiente de variación para la repetibilidad fue de 1,37% y el coeficiente de variación para la reproducibilidad fue de 1,83%, los valores obtenidos son inferiores a los criterios establecidos para la repetibilidad (1,5%) y reproducibilidad (2%) de un método analítico. El análisis de los coeficientes de variación permite concluir que no hay diferencias significativas de los resultados obtenidos el mismo día ni para los resultados obtenidos en diferentes días. El límite de confianza de la media para la reproducibilidad resultó $\pm 0,99$ siendo este menor que el criterio establecido (± 3) para un $p=0,05$.

Tabla 3. Resultados de la validación del método

	Parámetro	Resultado	Criterio
Linealidad	Curva de regresión	61,66x+50,659	
	Rango lineal (mg L ⁻¹)	5-40	
	Coefficiente de correlación	0,99	R ≥ 0,99
	Coefficiente de determinación	0,98	R ² ≥ 0,98
	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	2,7%	5%
	T de Student (<i>tr</i>) (95%)	2,57 > 2,45	<i>tr</i> > Ttabulado
	Intervalo de confianza del intercepto	-49,60 - 150,92	Debe incluir el cero
Repetibilidad	Media	22,36 mg L ⁻¹	
	RSD (%)	1,37	< 1,5%
	Límite de confianza	22,36± 0,99	(x±3) (95%)
Reproducibilidad	Media	22,48 mg L ⁻¹	
	RSD %	1,83	< 2%
Exactitud (% de recuperación)	Bajo nivel de analito agregado (20%)	90,0%	
	Prueba T de Student	0,29 < 4,3	Tob* < Ttabulado
	Alto nivel de analito agregado (100%)	98,6%	
	Prueba T de Student	0,11 < 4,3	Tob* < Ttabulado
Sensibilidad	Límite de detección	2,12 mg L ⁻¹	
	Límite de cuantificación	5,54 mg L ⁻¹	

Tob*= Tobtenidos

Exactitud

Al realizar las pruebas estadísticas, se encontró que tanto para un bajo nivel como para un alto nivel de analito agregado los T obtenidos fueron menores a los T tabulados, indicando que no existen diferencias significativas con el 100% de recuperación por lo que el método propuesto es exacto.

Sensibilidad

Debido a que las concentraciones de vitamina A encontradas en las leches en polvo son mucho mayores, se obtuvo un límite de detección de 2,12 mg L⁻¹ y un límite de cuantificación de 5,54 mg L⁻¹, por lo que se puede concluir que el método es efectivo para detectar y cuantificar esta vitamina.

Comparación del contenido de vitamina A de las marcas de leche en polvo estudiadas

Para cada marca de leche se analizaron dos lotes distintos, con la finalidad de evaluar si existía diferencia significativa entre ellos. De cada lote se analizaron tres muestras, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 4. Se observa que se encontraron diferencias significativas entre los lotes de la Marca A, indicando que posiblemente durante la fortificación del producto no se realizan los controles pertinentes para mantener estable la concentración de la vitamina. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de concentración de las muestras de los Lotes de las Marcas B y C.

Tabla 4. Valores promedios del contenido de vitamina A

	Contenido de Vitamina A (mg L ⁻¹)		
	MARCA A	MARCA B	MARCA C
Lote 1	27,57 ±3,88 ^a	21,05 ±2,68 ^a	20,05 ±1,18 ^a
Lote 2	21,47 ±1,15 ^b	21,28 ±1,49 ^a	19,69±2,04 ^a

Con el propósito de comparar los valores promedio obtenidos de vitamina A para cada Marca en estudio con la Norma COVENIN [4], las concentraciones se expresaron en términos de Unidades Internacionales (UI), tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de las marcas con la norma

Norma COVENIN	3200UI
Leche Marca A	1980 UI
Leche Marca B	1976UI
Leche Marca C	1922UI

Al comparar las tres marcas de leches estudiadas con lo establecido en la norma COVENIN 1481:2001 [4] se observa que ninguna de las marcas alcanza el límite establecido por la norma, ya que todas presentan un menor contenido de vitamina A. Es importante mencionar que según los requerimientos diarios de vitamina A establecidos por el CODEX, una persona adulta debe consumir 750µg (2500UI) de vitamina A y las madres lactantes un 50% más [2]. Los resultados obtenidos deben ser tomados en cuenta por los nutricionistas al momento de calcular la ingesta diaria de leche y otros productos ricos en vitamina A.

Conclusiones

Las condiciones del sistema cromatográfico que producen señales más intensas y que proporcionan mejores resultados para la cuantificación de la vitamina A son: flujo 1,2 mL/min, longitud de onda de 300 nm y fase móvil 100% de metanol. La validación de los resultados demostró que el método cromatográfico utilizado fue sencillo, selectivo, preciso, y exacto. El contenido de Vitamina A de las tres marcas de leche estudiadas está por debajo del valor establecido por la Norma Venezolana COVENIN.

Referencias bibliográficas

1. Walji H. Vitamins, Minerals and Dietary Supplements. Editorial DAF, S. L. 3° Edición, España (2007).
2. Latham M. Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. CAPÍTULO 11. Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York [Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2009] www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0f.html, (2002).
3. Herrera E. Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. Editorial McGraw Hill, España. (1996)
4. COVENIN Norma Venezolana, 7ma revisión. Leche en polvo. (2001), 2318:85.
5. Perez R., Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), Medicina Experimental, Vol. 17, (2000), 1:4.

6. Fennema O., Damodaran S. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia (2010).
7. Gross R., HaÉnsel H., Schultink W., Shrimpton R., Matulesi P., Gross G., Tagliaferri E y Sastrodijojo S., Moderate zinc and vitamin A deficiency in breast milk of mothers from East-Jakarta, *European Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 52, No.12, (1998), 884:890.
8. López L., Baroni A., Rodríguez V., Greco C., Macias S., Rodríguez S. y Ronayne P., Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de niveles de Vitamina A en leche materna, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 55, No. 2, (2005), 140:143.
9. Chávez J., Castellote A. y López C., Vitamins A and E content in infant milk-based powdered formulae after opening the packet, *Food Chemistry*, Vol. 106, No. 1, (2008), 299:309.
10. Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R. *Introducción a la HPLC Aplicación y Practica*. Editorial Artes Graficas Farro, Buenos Aires (1992).