

5. METODOLOGIA

Se trabajó con jugo de zanahorias obtenidas de tres fuentes diferentes elegidas al azar (supermercado, mercado de San Pedro Cholula y tienda de verduras).

Revisando la bibliografía se encontraron tres Normas Mexicanas en las que se determina vitamina A en diferentes muestras y estas son las siguientes:

1) NMX-Y-124-SCFI-2003. Productos para uso agropecuario – ingredientes de alimentos balanceados para animales – vitamina A acetato – especificaciones y métodos de prueba.

Ésta norma contiene dos incisos para determinar vitamina A los cuales son:

- **Determinación de Vitamina A. Método HPLC.**
- **Determinación de Vitamina A por espectroscopia UV-VIS.**

2) NMX-F-234-1972. Método de prueba para la determinación de Vitamina A en leches.

3) NOM-091-SSA1-1994. Bienes servicios. Leche pasteurizada de vaca. (Determinación de la vitamina A por cromatografía líquida de alta presión (HPLC-fase normal)).

4) El cuarto método es el informado por Hart y Scott (1995) que determinan carotenoides en vegetales y frutas: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry* **54** (1995) 101-111

5.1. Preparación de la curva de calibración

Se realizó una curva de calibración a partir del estándar de provitamina A (β -caroteno) realizando una dilución 1:10 (10 mL de provitamina A en 100 mL de agua) con lo que se obtuvo una concentración de 5 mg/mL de aquí se hicieron tres diluciones consecutivas 1:2 con lo que se obtuvieron las concentraciones de 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL.

Las condiciones cromatográficas se muestran en el cuadro 2 .

5.2. Procedimientos de extracción de provitamina A

5.2.1. NMX-Y-124-SCFI-2003. Productos para uso agropecuario – ingredientes de alimentos balanceados para animales – vitamina A acetato – especificaciones y métodos de prueba.

5.2.1.1. Determinación de Vitamina A. Método HPLC.

Se pesó la cantidad suficiente de zanahoria para obtener 10ml de jugo y se procedió a hacer el análisis.

PROCEDIMIENTO

I. PPREPARACIÓN.

- 1) Se midieron 10 mL de la muestra y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 mL.
- 2) Se adicionó 1 mL de agua, se tapó y se agitó circularmente.
- 3) Se adicionaron 30 mL de solución extractante (hexano-acetona-alcohol absoluto-tolueno 10:7:6:7), se tapó y se agitó circularmente por un minuto.

II. SAPONIFICACIÓN.

- 4) Se tomó una alícuota de 1mL de la solución metanólica de KOH (Hidróxido de potasio metanólico 40%) y se adicionó al matraz de 250mL que contiene el extractante con la vitamina, se agitó por un minuto.
- 5) Se calentó la muestra por 30min en un baño de agua calibrado a 55°C. Se tapó el matraz para evitar pérdida de solventes.
- 6) Se enfrió y se dejó reposar 1 hora en la oscuridad.
- 7) Se adicionaron 30 mL de hexano y se aforo con la solución de Na₂SO₄ 10% (Disolver 10 g de Na₂SO₄ anhidro en 100 mL de agua) se agitó vigorosamente.
- 8) Se cubrió el matraz con papel aluminio y se dejó reposar por 1 hora antes de realizar la determinación.
- 9) Solución lista para cromatografía.

5.2.1.2. Determinación de Vitamina A por espectroscopia UV-VIS

Se pesó la cantidad suficiente de zanahoria para obtener 55 mL de jugo y se procedió a hacer el análisis.

PROCEDIMIENTO

- 1) Se tomaron 55 mL de la muestra y se colocaron en un matraz redondo de 125 mL.
- 2) Se adicionó con pipeta volumétrica 25 mL de etanol (grado p.a.) dejándolo resbalar por las paredes del matraz.
- 3) Se adicionar 3 mL de KOH solución 9/10 (P/P: 90mg de KOH por 100 mL de agua).
- 4) Se reflujo durante 30 min bajo un ligero flujo de nitrógeno.
- 5) Se deajo enfriar a temperatura ambiente sumergiendo los matraces en un baño de agua fría.

- 6) Se lavó a través de refrigerante con 30 mL de agua desionizada.
- * Se transfirió cuantitativamente en un embudo de separación y se hicieron 4 lavados con 50 ml de éter etílico distribuidos en estos lavados y bajo una ligera atmósfera de nitrógeno.
- 7) Se agito durante 3 min venteando esporádicamente para evitar sobrepresión.
- 8) Se Dejó reposar de 3-5 min a que se separen las fases acuosa y orgánica.
- 9) Se desechó la fase acuosa (fase inferior) sobre un vaso de precipitado. Repetir desde*.
- 10) Se hizo una segunda extracción adicionando una punta de espátula de NaCl y 50 mL de agua desionizada agitando durante 30 segundos y venteando esporádicamente. Repetir esto 3 veces.
- 11) Se dejó reposar de 3-5 min a que se separen las fases y se desecho nuevamente la fase acuosa (fase inferior).
- 12) Se transfirió cuantitativamente la fase orgánica (fase superior) a un matraz volumétrico de 200 mL, y se lavó el interior del embudo y se aforó con éter.
- 13) Se agitó el matraz y se tomó una alícuota de 5 mL se transfirió a un matraz volumétrico de 10mL y se aforó con isopropanol.
- 14) Se cubrió matraz con papel aluminio.
- 15) Este método se modificó y se determinó la vitamina por medio de HPLC.

5.2.2. NMX-F-234-1972. Método de prueba para la determinación de Vitamina A en leches.

Se peso la cantidad suficiente de zanahoria para obtener 10mL de jugo y se procedió a hacer el análisis.

PROCEDIMIENTO

I. Saponificación.

- 1) Se pesaron 10 mL de muestra y se agregaron a 20 mL de agua a 40-50 °C.
- 2) Se traspasaron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL.
- 3) Se enfrió hasta 20 °C y se aforo con agua.
- 4) Se tomaron 2 mL y se colocaron en un tubo de centrifuga (se hizo por cuadruplicado).
- 5) Se agregaron a cada tubo 2 mL de solución alcohólica de KOH (se pesaron 61.7g de KOH en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforo con agua. De esta solución se tomó 1 mL y se agregaron 10 mL de alcohol etílico. Se filtró).
- 6) Se reemplazó el aire por nitrógeno en cada tubo, se tapó y se agitó ligeramente.
- 7) Se saponificó por 35 min en baño maría a 60°C.

II. Extracción

- 8) Se agregaron a cada tubo 2 mL de éter de petróleo.
- 9) Se agitó durante 5 min con vórtex.
- 10) Se centrifugó por 2 min a 200 rpm.
- 11) Se extrajo la fase superior y se colocó en un matraz aforado de 50 mL (las de los 4 tubos).
- 12) Se repitió desde el paso 8 cuatro veces más.
- 15) Se evaporó el éter bajo corriente de nitrógeno en baño maría a 60°C.
- 16) Se recuperó el residuo con 1 mL de hexano
- 17) Solución lista para cromatografía

5.2.3. NOM-091-SSA1-1994.

Se pesó la cantidad suficiente de zanahoria para obtener 30 mL de jugo y se procedió a hacer el análisis.

PROCEDIMIENTO

1) En un matraz redondo de 250 mL con cuello esmerilado se mezcló 30 mL de muestra con 30 ml de agua destilada a 45-50°C.

II. SAPONIFICACIÓN

2) Se añadieron 7 gr de KOH en el matraz y se mezcló para disolver.

3) Se añadieron 60 mL de alcohol absoluto y 0.5 g de ácido ascórbico.

4) Se montó sobre un sistema de reflujo, y se introdujo una ligera corriente de gas nitrógeno y se calentó durante 30min.

III. EXTRACCIÓN

5) Se enfrió el matraz a temperatura ambiente y se transvasó la suspensión a un embudo de separación de 500 mL.

6) Se enjuagó el matraz con máximo 30 mL de agua fría en tres porciones de 10 mL que se añadieron al contenido del embudo de separación. Se evitó un exceso de agua ya que favorece la formación de emulsiones.

7) Se enjuagó el matraz con 50 mL de éter de petróleo en varias porciones que se añadieron al embudo de separación.

8) Se extrajo la vitamina A agitando el embudo.

9) Se dejaron separar las fases. Se vació la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 mL y se recogió la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 mL.

10) Se efectuó la extracción de la fase acuosa cinco veces en total (repetiendo desde el paso 7), haciendo las agitaciones con cuidado para evitar emulsiones.

11) Se lavó la solución orgánica con porciones de 100 mL de agua adicionándola por las paredes del embudo, se agitó, hasta que el agua de lavado ya no daba reacción coloreada con fenolftaleína.

12) Se esperó al menos 15 min después del último lavado antes de vaciar la fase acuosa.

13) Se desechó la fase acuosa y se filtró la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 gr de Na_2SO_4 y se recogió el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 mL, sin dejar secar el filtro se enjuagó éste con 50 mL de éter de petróleo.

14) Se evaporó el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40°C , y se eliminaron los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

15) Se disolvió el residuo en 3 mL de la fase móvil (1% 2-propanol en n-hexano), y se filtró la solución inmediatamente a través de un filtro de $0.45\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

16) Solución lista para cromatografía.

5.2.4. Hart v Scott, 1995.

Se pesó la cantidad suficiente de zanahoria para obtener 20 mL de jugo y se procedió a hacer el análisis.

PROCEDIMIENTO

I. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

1) Se midieron 20 mL de la muestra y se colocaron en un matraz junto con 1 gr de carbonato de magnesio sólido para neutralizar cualquier ácido orgánico.

2) Se agregaron 50 mL de una mezcla de tetrahidrofurano-metanol (1:1 v/v THF:MeOH).

3) Se mezcló por 1 min con un agitador magnético.

4) Se filtró la suspensión resultante a través de un filtro de fibra (Whatman) en un embudo buchner al vacío.

5) Se lavó matraz y homogenizador con 50 mL de THF:MeOH.

6) Se lavó el filtro con una alícuota de 50 mL de THF:MeOH.

7) Se transfirieron los filtrados combinados de THF:MeOH a un embudo de separación.

- 8) Se agregaron al embudo de separación 50 mL de éter de petróleo y 50 mL de solución acuosa de NaCl al 10%. Se mezcló agitando suavemente.
- 9) Se eliminó fase acuosa THF:MeOH y se transfirió la fase superior de éter de petróleo a un matraz evaporador de 250 mL.
- 10) Se extrajo la fase acuosa THF/MeOH 1 vez más con 50 mL de éter de petróleo.
- 11) Se combinaron en un matraz las fases de éter de petróleo y se evaporaron a 35°C en un evaporador rotatorio casi a sequedad.
- 12) Se agregaron 10-15 mL de éter de petróleo y se disolvió el residuo por agitación ultrasónica.
- 13) Se transfirió residuo a un matraz evaporador de 25 mL y se evaporó hasta secar.
- 14) Se agregaron 5 mL de diclorometano y se disolvió el residuo por agitación ultrasónica.
- 15) Solución lista para cromatografía.

5.3. Determinación de vitamina A por HPLC

Los extractos obtenidos en los procedimientos mencionados fueron analizados.

En la Tabla 1 se muestran las condiciones cromatográficas citadas de las metodologías antes mencionadas:

Tabla 1. Cuadro comparativo de las condiciones cromatográficas utilizadas en las metodologías citadas.

	NMX-Y-124-SCFI-2003	NOM-091-SSAI-1994	Hart & Scott (1995)
COLUMNA	C18 (4,5 X 250mm)	Spherisorb SI (4,6 x 250mm)	ODS2 (4,6 x 100 mm)
FASE MOVIL	MeOH - Agua (95:5)	1%2-propanol en n-hexano	MeCN:MeOH:DCM (75:20:5)
FLUJO	0.75 mL/min	2.0 mL/min	1.5 mL/min
TEMPERATURA	-----	-----	22.5° +/- 0,1 C°
DETECCION	UV (325nm)	UV (325nm)	UV (450nm)
TIEMPO DE CORRIDA	-----	-----	-----
VOL. DE MUESTRA	20 µl	20 µl	50 µl

Debido a que no se contaba con la columna sugerida (Spherisorb y ODS2) en dos de los métodos (NOM-091-SSAI-1994 y Hart & Scott), se decidió usar una columna Discovery C8 de fase reversa, ya que de acuerdo con lo revisado en la bibliografía la cromatografía de fase reversa es uno de los métodos de elección para el análisis de carotenoides debido a que la retención se ve poco afectada por variaciones en la composición de la fase móvil, y el riesgo de la formación de artefactos en el paso a través de la columna es mínimo mientras las interacciones del soporte del soluto sobre las fases no polares involucran fuerzas débiles (Leenheer *et al.* 2000).

Las condiciones cromatográficas con las cuales se llevaron a cabo todos los procedimientos de las metodologías citadas se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas utilizadas en los tres métodos seleccionados (NMX-F-234-1972, NOM-091-SSA1-1994 y Hart & Scott)

Columna	Discovery C8 (15cm x 4.6mm)
Fase móvil	ACN 75% MeOH 25%
Flujo	2.0 mL/min
Temperatura	30°C
Detección	Fluorescencia $\lambda_{ex}325nm$ $\lambda_{em}450nm$
Tiempo corrida	5min
Volumen de la muestra	20 μ l

5.4. Análisis estadísticos

Se hizo un análisis estadístico de ANOVA usando el programa SAS para ver si había diferencias significativas en cuanto al contenido de provitamina A en las diferentes metodologías. Los valores se consideraron significativos si entre ellos había una $p < 0.05$.

Con el mismo software se obtuvo la diferencia mínima significativa entre las medias realizando una prueba de Tuckey.