

Enriquecimiento de azúcar con vitamina A. Método para la determinación cuantitativa de retinol en azúcar blanca de mesa¹

GUILLERMO ARROYAVE² y CARLOTA DE FUNES³

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala, C. A.

RESUMEN

Se describe un método para la determinación cuantitativa de retinol en muestras de azúcar blanca de mesa fortificada con palmitato de retinilo hidro-dispersable. El método tiene la ventaja de que no implica reacción de color, ya que está basado en la absorbancia directa del retinol a 328 nm.

INTRODUCCION

En una publicación reciente, Arroyave (1) dió a conocer el procedimiento propuesto por el INCAP para la fortificación del azúcar de mesa con palmitato de retinilo, como una medida de salud pública orientada a prevenir la hipovitaminosis A. Las investigaciones, incluyendo los ensayos en escala piloto a nivel industrial, han sido llevadas a término con éxito. Lo que es más, en el área centroamericana, algunos países ya están gestionando las medidas necesarias para poner en práctica esta medida a nivel nacional.

El control de este proceso requiere métodos de laboratorio, en particular, para verificar la concentración del aditivo

1. Los autores agradecen la cooperación del ingenio azucarero "El Salto, S. A.", Guatemala, C. A., y de Hoffmann-LaRoche & Co., Basilea, Suiza.

2. Jefe de la División de Química Fisiológica del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

3. Técnica de Laboratorio de la citada División.

Publicación INCAP E-712.

Recibido: 2-8-73.

en el azúcar. Con este propósito, se han desarrollado dos métodos. El primero es un procedimiento cuantitativo para la determinación precisa del nivel de fortificación. El segundo es un método de bajo costo, extremadamente simple para la inspección semi-cuantitativa del proceso, el cual puede aplicarse en forma rutinaria en laboratorios de salud pública, ingenios de azúcar y aún en el campo (mercados, expendios, etc.). En este trabajo se describe el primero de los dos métodos a que se alude.

El retinol es extraído de una solución alcalina de azúcar enriquecida, mediante agitación con una mezcla de éter etílico y éter de petróleo. El retinol se determina en el extracto por el procedimiento de Bessey y colaboradores (2), midiendo la absorbancia a 380 nm.

METODO

Equipo y Materiales

- 1) Espectrofotómetro Beckman, Modelo DU, con adaptador para microceldas.
- 2) Sistema de irradiación con luz ultravioleta, tal y como lo describen Bessey y colaboradores (2).
- 3) Tubos de vidrio Pyrex. de 60 mm de largo y 3 mm de diámetro interno. Para el caso, córtense segmentos de tubo de vidrio de 60 mm de largo, lávense con ácido nítrico a 50%, deságüense cuidadosamente en agua destilada, y séquense. Uno de los extremos se sella a la llama.

Reactivos

- 1) Hidróxido de sodio, 12.5 N
- 2) Etanol al 95%
- 3) Eter etílico
- 4) Eter de petróleo, punto de ebullición 60-80°C
- 5) Nitrógeno
- 6) Xileno, redestilado en un aparato de vidrio. Usese la fracción que destila entre 132-135°C (Fisher Scientific Co. No. X-5)
- 7) Keroseno (Fisher Scientific Co. No. K-10), incoloro e inodoro. El producto comercial se agita con carbón acti-

vado y se destila en un aparato de vidrio, recogiendo la fracción entre 197 y 204°C.

- 8) Azúcar blanca centrifugada y lavada, o refinada, de grado industrial.
- 9) Palmitato de retinilo 250 SD de Hoffmann-LaRoche, Basilea, Suiza, u otro preparado hidro-dispersable.

Procedimiento

Pésense 10 ± 0.01 g de azúcar enriquecida y disuélvase en agua destilada a una temperatura aproximada de 60°C. Enfríense a temperatura ambiente y llévense a un volumen de 100 cc en un balón volumétrico. Pásense 30 cc de esta solución a un embudo de separación de 125 cc, agréguese 30 cc de etanol al 95%, 250 μ l de hidróxido de sodio 12.5 N, y 2 gotas de solución indicadora de fenolftaleína. Déjese en reposo durante cinco minutos.

Extráigase dos veces con porciones de 20 ml y una vez con 10 ml de una mezcla 1:1 de éter etílico-éter de petróleo. Cada extracción se lleva a cabo agitando por 1½ minutos. Combinense los tres extractos y llévase hasta 50 ml con la misma mezcla. Séquese el extracto con 4 g de sulfato de sodio anhidro.

Pásense alícuotas duplicadas de 1 ml del extracto anhidro, a tubos de ensayo de 10×75 mm. Evapórese hasta sequedad en un baño de agua a temperatura ambiente soplando nitrógeno directamente en los tubos. Disuélvase el residuo en 1 ml de una mezcla 1:1 de xileno-keroseno y mídase la absorbancia de esta solución a 328 nm (Lectura A). Pásese una porción de esta solución (alrededor de 110 μ l) a un tubo de 60×3 mm y expóngase a la lámpara de irradiación por 35 minutos. Mídase la absorbancia de la solución irradiada a 328 nm (Lectura B). El cambio de absorbancia es la diferencia entre Lectura A y Lectura B.

Soluciones Estándar

Se prepararon diluciones, en azúcar, de palmitato de retinilo para obtener concentraciones de 6, 12, 24, 36 y 48 μ g de retinol por gramo de azúcar. Por supuesto, estas concentraciones pueden alterarse a modo de cubrir las muestras dentro de los límites de variación esperados.

Nuestra experiencia demuestra que no se requiere un control negativo ("blank"), ya que soluciones de azúcar no enriquecida, sometidas al mismo procedimiento, no mostraron cambios en cuanto a absorbancia después de la irradiación. Sin embargo, se recomienda que esto se determine en cada laboratorio antes de aplicar el procedimiento.

Cálculos

Usando un estándar de referencia, la concentración de la muestra puede calcularse directamente de la curva de absorbancia y concentración, ya que, tal como se ilustra en la Figura 1, ésta sigue la ley de "Beer-Lambert". También es factible derivar un factor, como sigue:

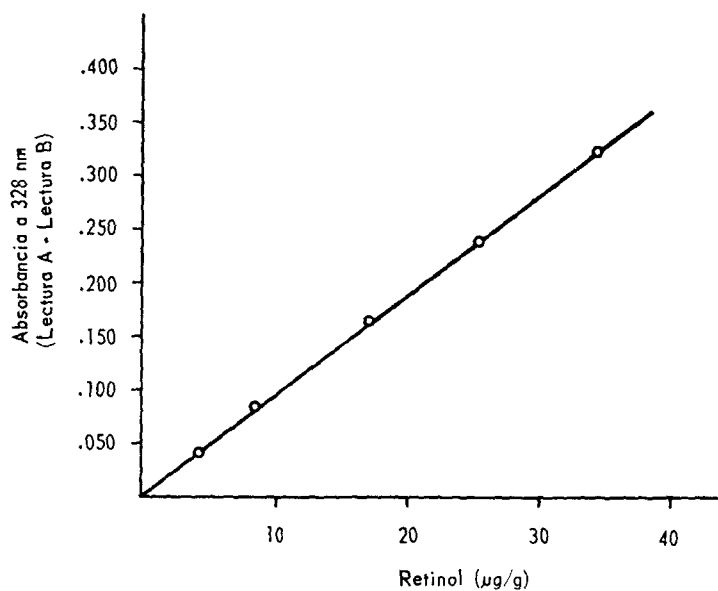
$$\text{Factor} = \frac{\mu\text{g de retinol/g de azúcar en el estándar}}{\text{cambio en absorbancia del estándar}}$$

El cambio en absorbancia de la muestra se multiplica luego por este factor, obteniendo así directamente la concentración en μg de retinol por gramo de azúcar.

La concentración puede también calcularse multiplicando el cambio en absorbancia de la muestra por el factor derivado directamente del coeficiente de extinción molecular del retinol (2), tomando en consideración las diluciones. El método es como sigue:

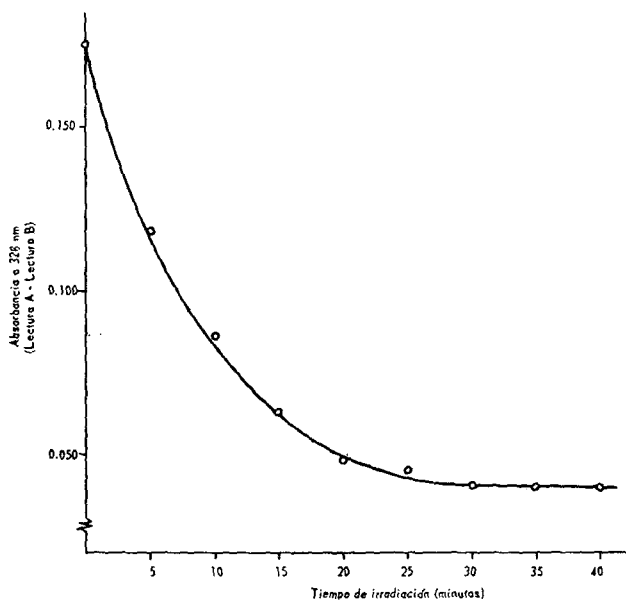
Para convertir el cambio en absorbancia a μg de retinol por 100 ml de solución xileno-keroseno, se usa un factor de 637; 100 ml de esta solución equivalen a 6 g de azúcar. Entonces:

$$\frac{\text{Cambio en absorbancia} \times 637}{6} = \mu\text{g de retinol/g de azúcar}$$



Incap 73-844

Figura 1. Curva estándar para vitamina A en azúcar.



Incap 73-845

Figura 2. Curva de destrucción del retinol bajo irradiación de luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Se llegó a una decisión sobre el volumen y número de extracciones después de someter a prueba la recuperación de retinol en diversos extractos consecutivos. Se halló que el programa de extracción descrito daba como resultado la extracción completa del retinol.
2. El tiempo necesario para la destrucción total del retinol bajo irradiación con luz ultravioleta se ensayó como sigue: Una muestra de azúcar fortificada fue sometida al procedimiento de extracción y nueve alícuotas del extracto de éter etílico-éter de petróleo se evaporaron en tubos individuales hasta sequedad bajo nitrógeno, se redisolviéron en xileno-keroseno, se leyeron a 328 nm, y se irradiaron por diversos períodos de tiempo. Los resultados obtenidos se dan a conocer en la Figura 2 y demuestran que, transcurridos 30 minutos, se llegó a la meseta de la curva, lo que indica completa destrucción.
3. Curva de absorbancia y concentración. La Figura 1 ilustra la relación entre la concentración de retinol en azúcar y el cambio de absorbancia a 328 nm. Esta curva se obtuvo preparando muestras de azúcar con la concentración conocida de palmitato de retinilo 250 SD y tratándolas como muestras independientes, tal y como se ha descrito. Ya que el nivel de fortificación que se propone para los países del Istmo Centroamericano fluctúa entre 10 y 20 μg de retinol por gramo de azúcar, la curva de concentración ilustrada fue calculada para cubrir los valores dentro de esos límites.
4. La reproducibilidad de este método en manos de un técnico laboratorista se sometió a prueba tomando de un lote de solución de azúcar fortificada, 10 alícuotas independientes, sometiéndolas luego, individualmente, a todo el proceso. El Cuadro No. 1 muestra los resultados obtenidos. El coeficiente de variación fue 1.24%.

CUADRO N° 1
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Réplica No.	$\mu\text{g/g}$
1	14.34
2	14.44
3	14.23
4	14.23
5	14.23
6	14.66
7	14.44
8	14.66
9	14.66
10	14.44
\bar{X}	14.43
D.E.	0.18
C.V.	1.24 %

SUMMARY

Fortification of Sugar with Vitamin A. Method for the Quantitative Determination of Retinol in White Table Sugar.

A method is described for the quantitative determination of retinol in white table sugar samples fortified with water-dispersable retinyl palmitate. The method has the advantage of using no color reaction since it is based instead on the direct absorbancy of retinol at 328 nm.

BIBLIOGRAFIA

1. Arroyave, G. Distribution of vitamin A to population groups. En: *Proceedings Western Hemisphere Nutrition Congress III. August 30-September 2, 1971, Miami Beach, Florida.* Philip L. White (ed.). Mount Kisko, New York, Futura Publishing Company, Inc., 1972, p. 68-79.
2. Bessey, O. A., O. H. Lowry, M. J. Brock & J. López. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem.*, 166: 177-188, 1946.