

Manual para la Fortificación de Azúcar con Vitamina A

Parte 3

Metodologías Analíticas para el Control y la Evaluación de la Fortificación de Azúcar con Vitamina A

Omar Dary, Ph.D.
Guillermo Arroyave, Ph.D.

Con la colaboración de
Hernando Flores, Ph.D.
Florisbela A.C.S. Campos
María Helena C.B. Lins



Dr. Omar Dary es un investigador bioquímico del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala.

Dr. Guillermo Arroyave es un consultor internacional experto en micronutrientes, con residencia en San Diego, California.

Esta publicación se ha realizado con el apoyo ofrecido por la Office of Health and Nutrition, Bureau for Global Programs, Field Support, and Research, United States Agency for International Development (USAID), a través del proyecto Opportunities for Micronutrient Interventions (OMNI) bajo los términos del contrato No. HRN-5122-C-00-3025-00, y el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Las opiniones expresadas en esta publicación pertenecen a los autores y no necesariamente reflejan aquellas del USAID y del INCAP.

Marzo 1996.

MANUAL PARA LA FORTIFICACION DE AZUCAR CON VITAMINA A

PARTE 3

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
PROLOGO GENERAL	vii
I. INTRODUCCION	1
II. PROPIEDADES DEL RETINOL Y DEL COMPUESTO DE VITAMINA A USADO EN LA FORTIFICACION DE AZUCAR	3
III. PRINCIPIOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN PREMEZCLAS Y EN AZUCAR FORTIFICADA	7
A. Método espectrofotométrico	7
B. Método colorimétrico	8
IV. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL EN PREMEZCLAS	9
A. Referencia	9
B. Principio	9
C. Puntos críticos y precauciones	9
D. Equipo y materiales	10
E. Reactivos	10
F. Procedimiento	10
G. Cálculos	11
V. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA	13
A. Referencia	13
B. Principio	13
C. Puntos críticos y precauciones	13
D. Equipo y materiales	14
E. Reactivos	14
F. Procedimiento	14
G. Cálculos	15
H. Verificación de la recuperación del método	16
VI. DETERMINACIÓN COLORIMETRICA SEMI-CUANTITATIVA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA	19
A. Referencias	19
B. Principio	19
C. Puntos críticos y precauciones	19
D. Materiales	19
E. Reactivos	20
F. Procedimiento	20

VII.	METODO VOLUMETRICO PARA LA DETERMINACION DE PEROXIDOS EN ACEITES .	23
A.	Referencia	23
B.	Principio	23
C.	Puntos críticos y precauciones	23
D.	Equipo y materiales	23
E.	Reactivos	24
F.	Procedimiento	25
G.	Cálculos	26
VIII.	METODOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN SANGRE	27
A.	Introducción	27
B.	Toma y manejo de las muestras	28
IX.	DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL SANGUÍNEO POR DESTRUCCIÓN ULTRAVIOLETA DEL RETINOL	31
A.	Referencias	31
B.	Principio	31
C.	Puntos críticos y precauciones	31
D.	Equipo y materiales	32
E.	Reactivos	32
F.	Procedimiento	33
G.	Cálculos	34
H.	Verificación de la reproducibilidad del método	35
I.	Verificación de la recuperación del método	36
J.	Variantes	37
X.	DETERMINACION DEL RETINOL SANGUINEO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)	39
A.	Referencias	39
B.	Principio	39
C.	Puntos criticos y precauciones	39
D.	Equipo y materiales	40
E.	Reactivos	41
F.	Procedimiento	43
G.	Cálculos	46
H.	Verificación de la recuperación del método	46
XI	METODOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN LECHE HUMANA	49
A	Introducción	49
B	Toma y manejo de las muestras de leche	50
XII	APLICACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO POR DESTRUCCION ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACION DE RETINOL TOTAL EN LECHE HUMANA	51
XIII	DETERMINACION DE RETINOL EN LECHE HUMANA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)	53
A	Referencia	53
B	Principio	53

C.	Puntos críticos y precauciones	53
D.	Equipo y materiales	54
E.	Reactivos	54
F.	Procedimiento	57
G.	Cálculos	59
H.	Verificación de la recuperación del método	59
I.	Variantes	60
XIV.	CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO	63
A.	Criterios para el control de calidad	63
B.	Rutinas del control de calidad	65
C.	Calibración del equipo	68
XV.	LECTURAS SUGERIDAS	73
ANEXO 3.1:	CONSTRUCCION DE UNA CAMARA DE IRRADIACION ULTRAVIOLETA	75
ANEXO 3.2:	SUGERENCIAS PARA EL CUIDADO Y LAVADO DE LA CRISTALERIA Y DE LAS CELDAS DE ESPECTROFOTOMETROS	79
ANEXO 3.3:	PROVEEDORES, EQUIPOS, Y MATERIALES DE LABORATORIO	81

TABLAS

Tabla 3.1:	Factores de Corrección de la Absorbancia del Retinol a Diferentes Longitudes de Onda cuando se usa Fuente de <u>Luz Visible</u>	8
------------	---	---

FIGURAS

Figura 3.1:	Estructura Química del Retinol y derivados	3
Figura 3.2:	Ejemplo de la Cinética de Destrucción del Retinol (o Palmitato de Retinol) en una Cámara de Irradiación	67
Figura 3.3:	Absorbancia del Retinol por Tiempo de Irradiación	71
Anexo Figura 3.1a:	Cámara de Irradiación	76
Anexo Figura 3.1b:	Cámara de Irradiación (Plano de construcción)	77

AGRADECIMIENTOS

Este manual se basa en la experiencia de la fortificación de azúcar del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Muchas personas han participado en este programa durante los últimos 25 años, y este manual representa el esfuerzo y el trabajo de todos ellos, quienes son tantos que sería imposible mencionarlos individualmente.

Los autores desean manifestar que el contenido y presentación de las partes 1, 2 y 3 de este de este manual mejoró sensiblemente debido a las correcciones y sugerencias de sus revisores, a quienes presentan un sincero agradecimiento. Fueron ellos Dra. Frances R. Davidson y Dr. Timothy Quick, de la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Estados Unidos de América (USAID); Dr. Juan R. Aguilar, de UNICEF, Perú; Dr. José O. Mora, del Instituto Internacional de Ciencia y Tecnología (ISTI); Dr. Luis Mejía, de la compañía Kellogg para Latinoamérica; Ing. Alberto Nilson, de la compañía Hoffman-La Roche para Latinoamérica; Dr. Kenneth Brown, de la Universidad de California en Davis; Ing. Leonardo De León, del INCAP; Dr. Jean Humphrey y Dr. Esse Yameni, de la Universidad Johns Hopkins; y especialmente la Dra. Penelope Nestel, del programa “Opportunities for Micronutrient Interventions” (OMNI).

La parte 2 de este manual, que trata sobre la descripción del proceso de fortificación, reúne el conocimiento y la experiencia colectiva de varias personas que han perfeccionado la tecnología de la fortificación de azúcar en Centro América durante los últimos diez años. Merecen especial mención las siguientes personas: Ing. Leonel Anleu, de la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA); Dr. Oscar Pineda, ex-funcionario del INCAP y actual consultor en micronutrientes, Guatemala; Dra. Vilma Estrada, Dra. Doris Chinchilla, Ing. Plutarco Murillo, e Ing. Victoria Sarai Bejarano, de Honduras; y Dr. Manuel de Gracia y Dr. Enrique Murillo, de Panamá.

La parte 3 de este manual, que reúne metodologías analíticas para la determinación de retinol, se escribió con base en las contribuciones, modificaciones y mejoras que en este campo han proporcionado miembros del Laboratorio de Química y Bioquímica (LQB) del INCAP, entre quienes deben mencionarse a los siguientes profesionales: Carolina Martínez, Dora Inés Mazariegos, María Elena Estrada de Sandoval, Esmeralda Morales, Mónica Guamuch y Gerardo Pirir.

El manual fue traducido al inglés por Maritza Méndez de Oliva y Carlos Cipriani. Oddette Sanabria de Osorio se encargó de la elaboración de las figuras. Ingrid Cabrera, Hazel de Orellana y Ana Ruth de Burckhard realizaron la labor secretarial para producir la versión en español, y, Lisa Sherburne y Pamela Cubberly diagramaron y revisaron la edición en inglés. El trabajo de todas estas personas merece nuestro agradecimiento.

Actividades de apoyo, realizadas en los años de 1992-94, y que en parte han servido de base a esta publicación fueron financiadas por ROCAP/AID mediante el proyecto 596-0169.

PROLOGO GENERAL

En muchos países, la deficiencia de vitamina A es un problema generalizado y no necesariamente limitado a comunidades o poblaciones específicas. Entre las intervenciones disponibles, la fortificación de alimentos es un medio ampliamente aceptado y difundido en los países desarrollados, y que ha probado ser eficaz para el suministro de los nutrientes deseados a la población. En esos países, alimentos tales como leche en polvo, margarina y mantequilla, alimentos infantiles, y cereales para el desayuno están normalmente fortificados con micronutrientes, incluyendo la vitamina A. Los alimentos mencionados, sin embargo, no son consumidos regularmente por la mayoría de las personas de los países en desarrollo, especialmente aquellos con el mayor riesgo de sufrir la deficiencia de vitamina A. Una excepción es el azúcar, alimento que puede ser fortificado con vitamina A. La fortificación de azúcar es práctica porque no requiere el cambio de los hábitos alimentarios de la población objetivo, ni el establecimiento de un sistema de distribución específico y costoso. La fortificación simplemente requiere de la existencia de un sistema de producción y comercialización del azúcar que permita el agregado uniforme del compuesto fortificante y la supervisión del proceso. La fortificación de azúcar con vitamina A es una de las intervenciones más seguras, eficaces y de mejor costo-efectividad para prevenir y controlar la deficiencia de dicho micronutriente.

Con el fin de sistematizar y facilitar la instauración y ejecución de programas de fortificación de azúcar con vitamina A, se ha elaborado este manual, el cual está integrado por tres partes. La parte 1, titulada *Guías para el Desarrollo, Operación y Evaluación de un Programa de Fortificación de Azúcar con Vitamina A*, ofrece pautas generales y básicas para el establecimiento de un programa de este tipo. En ésta se discuten las estrategias existentes para prevenir y reducir la deficiencia nutricional de la vitamina A, y se detallan los elementos básicos que deben tenerse en consideración para establecer un programa adecuado de fortificación de azúcar con vitamina A. Además, ofrece una visión general de todo el programa, para proveer, particularmente a los funcionarios de los sectores privado y público con funciones de coordinación y gerencia, los conocimientos y elementos necesarios que aseguren su adecuado funcionamiento. Tópicos técnicos de ese documento también son de utilidad para el personal especializado involucrado en etapas específicas del proceso de fortificación, tales como operaciones necesarias para llevar a cabo la fortificación del azúcar, determinando tanto la eficiencia como la eficacia de la intervención, y guías para estimar los costos del programa.

La parte 2, *Guía Técnico Operativa para la Preparación de la Premezcla y el Azúcar Fortificada con Vitamina A*, está dirigida especialmente al personal técnico encargado de ejecutar el proceso de fortificación. El capítulo I cubre generalidades del proceso de la fortificación, el capítulo II presenta una sección específica que describe la fabricación de la premezcla, y el capítulo III describe el procedimiento para el agregado del compuesto vitamínico al azúcar. Además, esta parte incluye una descripción detallada de las actividades de control de calidad

La parte 3, *Metodologías Analíticas para el Control y la Evaluación de la Fortificación de Azúcar con Vitamina A* presenta métodos de laboratorio y de campo para estimar el contenido de vitamina A en la premezcla y en el azúcar fortificada. Este documento también provee detalles para la determinación de la vitamina A en muestras biológicas, lo que es indispensable en la

evaluación de impacto del programa de fortificación. Esta parte está dirigida fundamentalmente al personal de laboratorio a cargo de determinaciones analíticas.

La lectura de los tres documentos descritos anteriormente (partes 1, 2 y 3) que conforman este manual revela que, ocasionalmente, se repite cierta información y algunos conceptos. Estas repeticiones no son el resultado de descuidos editoriales sino, por el contrario, se hacen a propósito para resaltar su importancia y conferirle a cada parte individual una relativa autosuficiencia en los aspectos más básicos. Sin embargo, la situación ideal, y es lo que aquí se recomienda, es que las tres partes se consideren una unidad teórica y práctica y que sean utilizadas en conjunto para asegurar su papel complementario.

La investigación para la fortificación de azúcar con vitamina A principió en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) en los años sesenta, bajo el liderazgo de Guillermo Arroyave con el apoyo del Dr. M. Forman de USAID. El desarrollo de esta tecnología necesitó aproximadamente 10 años. Finalmente a partir de 1974, Costa Rica, Guatemala, Honduras y Panamá legislaron que el azúcar debía fortificarse con vitamina A. Con el apoyo de USAID, el INCAP demostró en forma concluyente que la fortificación de azúcar con vitamina A es eficaz y costo-efectiva. El respaldo de USAID a este programa, recientemente a través del proyecto OMNI, ha continuado durante los años; esta ayuda ha contribuido a que la fortificación de azúcar haya mejorado en Centro América, y ha estimulado su adopción por otros países en Latinoamérica.

El establecimiento de un programa exitoso de fortificación de azúcar refleja el esfuerzo conjunto de la iniciativa privada, funcionarios públicos, investigadores y entidades de cooperación internacional. El propósito de este documento es compartir las experiencias de Centro América, para que así otros países puedan planificar y establecer este tipo de programas con la finalidad de controlar y prevenir la deficiencia nutricional de vitamina A.

Frances Davidson
Oficina de Salud y Nutrición, USAID
Washington, D.C.

Hernán Delgado
INCAP/OPS
Guatemala

I. INTRODUCCION

El laboratorio es indispensable para la correcta operación de un programa de fortificación de azúcar con vitamina A. Se requieren metodologías analíticas para verificar la concentración de retinol tanto en la premezcla como en el azúcar fortificada. Además, la determinación de los niveles de retinol en especímenes de suero sanguíneo y leche humana es esencial para la evaluación del efecto biológico de esta intervención.

Los usuarios de este manual deben tener en cuenta que los laboratorios donde se llevan a cabo determinaciones de retinol deben tener un área sin luz solar directa o iluminación muy fuerte. El área de trabajo debe iluminarse con tubos incandescentes de luz amarilla. Si estas condiciones no son factibles, o aún como una precaución adicional, los tubos de ensayo y recipientes que contienen soluciones de retinol pueden cubrirse con una tela negra en todo momento en que el procedimiento lo permita. Otra facilidad que deben poseer estos laboratorios es la presencia de campanas de laboratorio para reducir los riesgos asociados con el uso de solventes volátiles e inflamables.

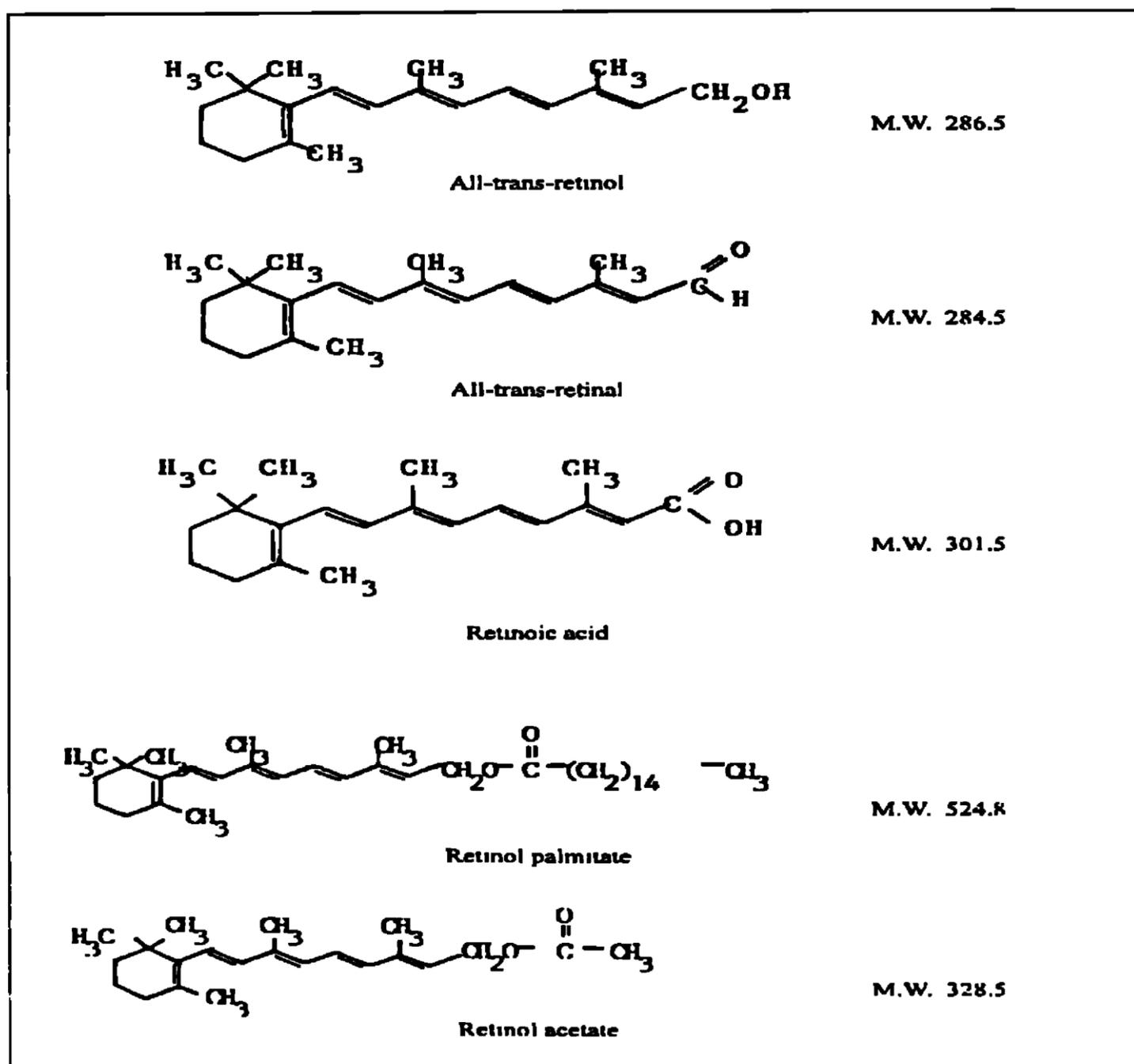
Esta parte del manual principia describiendo las propiedades generales del retinol y del preparado de retinol que se usa en la fortificación de azúcar, con el propósito de dar las bases sobre las que se fundamentan las metodologías analíticas. Seguidamente, aparecen secciones que describen los métodos de laboratorio,¹ para determinar el contenido de retinol en (a) premezcla y azúcar fortificada (incluyendo la determinación de peróxidos en el aceite vegetal, que se usa en la preparación de la premezcla), (b) en sangre, y (c) leche humana. Cada una de estas secciones presentan generalidades sobre los principios y procedimientos comunes de los métodos, descripción de sus ventajas y limitaciones, y guías para la toma y manejo de las muestras. Una última sección describe procedimientos para control de calidad de los métodos analíticos. Los anexos presentan la descripción y calibración de una cámara de irradiación con luz ultravioleta, sugerencias para el lavado y cuidado apropiado de la cristalería del laboratorio, y un listado y direcciones de los proveedores de los equipos y reactivos necesarios para los ensayos analíticos.

¹ A menos que sea específicamente señalado, los métodos que se incluyen aquí son los que actualmente están en uso en el Laboratorio de Química y Bioquímica del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

II. PROPIEDADES DEL RETINOL Y DEL COMPUESTO DE VITAMINA A USADO EN LA FORTIFICACION DE AZUCAR

El retinol es la forma activa de la vitamina A, presente en los tejidos y fluidos del organismo animal pero no en plantas.² En la naturaleza, el retinol se encuentra predominante esterificado con ácidos grasos, siendo el palmitato el éster más común. Se encuentran además derivados del retinol con funciones bioquímicas específicas, tales como el retinal y el ácido retinoico, en los cuales el radical alcohólico primario (-OH) se ha oxidado a radical aldehído (-CHO) y ácido (-COOH), respectivamente. La estructura química del retinol y otros derivados se muestra en la figura 3.1.

Figura 3.1
ESTRUCTURA QUIMICA DEL RETINOL Y DERIVADOS



2 En el reino vegetal no se encuentra retinol preformado, pero abundan los compuestos estructuralmente relacionados conocidos como carotenoides. Solamente 50 de aproximadamente 600 carotenoides naturales dan origen a retinol en el organismo animal y por eso se le reconoce como carotenoides activos precursores de vitamina A. De estos, el más activo es el beta-caroteno, lo cual lo hace el más importante desde el punto de vista nutricional.

En la sangre el retinol es transportado por una proteína específica denominada la proteína ligadora de retinol. En la leche, el retinol aparece esterificado con varios ácidos grasos. Para la determinación de retinol en suero (o plasma), las muestras se tratan con una mezcla etanólica alcalina con el propósito de liberar el retinol del complejo y precipitar las proteínas. En la leche, el retinol debe ser separado de sus ésteres mediante saponificación.

En la actualidad, el retinol disponible comercialmente para usos farmacéuticos o industriales es sintético. Sus presentaciones son en forma de ésteres, comúnmente palmitato y acetato, los cuales tienen una mayor estabilidad y son de más fácil manejo. El retinol y sus ésteres son solubles fácilmente en solventes orgánicos y grasas, e insolubles en agua. Por esta razón, no pueden utilizarse directamente para fortificar alimentos que se mezclen o disuelven con agua. Sin embargo, la industria alimenticia ha producido preparaciones de vitamina A que son secas y miscibles en agua, tales como microencapsulados de ésteres de retinol. Esto ha permitido el desarrollo de tecnologías para la fortificación de alimentos de base seca o hidrosoluble, incluyendo el azúcar.

El prototipo de microencapsulado de palmitato de retinol utilizado en la fortificación de azúcar es el compuesto 250-CWS.³ En éste, el palmitato de retinol se encuentra en una matriz de gelatina que contiene sustancias antioxidantes que le confieren gran estabilidad, así como componentes que lo hacen dispersable en agua. El compuesto 250-CWS es un polvo de partícula esférica, de color amarillo pálido y olor característico. Su estabilidad y otras características físicas lo hacen altamente adecuado para su uso como fortificante en el azúcar blanca. Como ya se dijo anteriormente, el retinol es liposoluble y por lo tanto es fácilmente extraíble con solventes orgánicos. En la forma microencapsulada, sin embargo, es necesario que primero la microcápsula se disperse en agua para liberar el palmitato de retinol de las otras sustancias acompañantes.

Una vez extraído el retinol o sus ésteres, otras de sus características se manifiestan más claramente. La consideración de algunas de estas características es importante para el diseño y ejecución de los métodos de laboratorio para determinar retinol. Entre éstas se incluyen:

- ◆ *Destrucción por luz UV*. El retinol se destruye cuando es irradiado con luz ultravioleta. Esta propiedad permite determinar con gran especificidad los niveles de retinol en las muestras, midiendo la absorbancia del retinol antes y después de su destrucción selectiva con luz ultravioleta. Esta propiedad, sin embargo, demanda que el retinol sea protegido de la exposición a la luz directa durante su manejo en el laboratorio.
- ◆ *Absorción de energía electromagnética en la zona de UV y visible cercano*. Debido a los dobles enlaces conjugados que presenta la estructura del retinol, éste absorbe energía radiante alrededor de los 325 nm. Esta propiedad es la que se utiliza generalmente para determinar cuantitativamente el retinol, midiendo su absorbancia a

³ Producido por las compañías Hoffmann-La Roche y BASF

la longitud de onda de máxima absorción, la que puede variar un poco según el solvente y el derivado de retinol.

- ◆ *Oxidación.* El retinol fácilmente incorpora oxígeno en enlace peróxido en su estructura, reacción cuya velocidad depende de la temperatura. Por lo tanto muestras y soluciones que contienen retinol deben protegerse del contacto prolongado con el oxígeno del aire y guardarse a temperaturas inferiores de 10°C.

III. PRINCIPIOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN PREMEZCLAS Y EN AZUCAR FORTIFICADA

El retinol en premezcla o azúcar fortificada puede determinarse cuantitativamente por medio de un método espectrofotométrico o semi-cuantitativamente utilizando una reacción cromogénica.

A. Método espectrofotométrico

Las etapas del método espectrofotométrico son las siguientes:

1. *Toma y manejo de la muestra.* Como mínimo, se recomiendan 5 g de premezcla y 50 g de azúcar. Las muestras deben almacenarse en frascos opacos de vidrio o plástico herméticamente cerrados, y transportarlas protegidas de exposición a la luz, calor y humedad. Una vez en el laboratorio, las muestras se almacenan en un lugar fresco y seco. Previo a pesar la muestra para el análisis, la premezcla o el azúcar deben mezclarse completamente.
2. *Dispersión de las microcápsulas de palmitato de retinol.* Para asegurar la completa dispersión en agua del 250-CWS es recomendable emplear agua a 50-60°C y, en lo posible, mantener la solución a dicha temperatura por 15 minutos.
3. *Extracción.* El palmitato de retinol es extraído del medio acuoso con un solvente orgánico. El solvente más apropiado es el hexano. Por el contenido tan alto de palmitato de retinol en la premezcla, la extracción es innecesaria; basta con diluir previamente la solución acuosa con 2-propanol.
4. *Determinación de la concentración de retinol.* La determinación del retinol se basa en su absorbancia a 325 nm, utilizándose un espectrofotómetro. En el caso de la premezcla y el azúcar fortificada, por su alto contenido de retinol, puede utilizarse una longitud de onda mayor, pero siempre por debajo de 350 nm. En estas circunstancias, la exactitud y la sensibilidad son menores, requiriéndose introducir un factor de corrección, que puede obtenerse mediante el cociente que resulta de dividir la absorbancia a 325 nm de una solución de retinol, en un espectrofotómetro de referencia, entre la absorbancia de esa misma solución a la otra longitud de onda. La tabla 3.1 presenta factores de corrección para diferentes longitudes de onda determinados en los laboratorios del INCAP.

Tabla 3.1: Factores de Corrección de la Absorbancia del retinol a Diferentes Longitudes de Onda Cuando se usa Fuente de Luz Visible⁴

Longitud de onda (nm)	Factor de corrección
325	1.007
330	1.066
335	1.177
340	1.360
345	1.622
350	2.030

5. **Incremento de la especificidad analítica.** Cuando los materiales por analizar contienen cantidades significativas de sustancias interferentes, se hace necesario incrementar la especificidad del método. Esto puede lograrse de dos maneras: Primero, utilizando una columna cromatográfica de alta resolución (HPLC) para separar el retinol de otras sustancias que absorben energía radiante de longitud de onda igual o cercana al retinol o, segundo, midiendo la absorbancia de los extractos antes y después de destruir selectivamente el retinol por exposición a luz ultravioleta. La diferencia en absorbancia entre el extracto no irradiado y el irradiado es debida específicamente al retinol y en este dato se basa el cálculo de la concentración de retinol en la muestra. Este procedimiento se utiliza en el análisis de la premezcla. En el caso del azúcar fortificada, el extracto orgánico esencialmente carece de sustancias interferentes, por lo que basta con restar a las lecturas de absorbancia de las muestras la absorbancia de un blanco de reactivos.

B. Método colorimétrico

El otro método para determinar los niveles de retinol en azúcar fortificada es el colorimétrico;⁵ éste es más rápido y no requiere un espectrofotómetro, pudiendo ser adaptado a procedimientos de campo. El método se basa en la reacción de Carr-Price, la cual se basa en la formación de anhidroretinol al mezclar el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. En este reactivo, el anhidroretinol se protona transitoriamente, generándose una coloración azul proporcional a la concentración de retinol en la muestra. Este método es menos exacto y preciso que el espectrofotométrico, por lo cual se recomienda verificar periódicamente la validez de los resultados contra datos obtenidos con una misma muestra por el método espectrofotométrico.

⁴ El valor de referencia utilizando una fuente de radiación ultravioleta a 325 nm es 1.000

⁵ Este método no es lo suficientemente exacto para ser utilizado en el control de calidad de la premezcla

IV. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL EN PREMEZCLAS

A. Referencia⁶

B. Principio

Este método consiste en la solubilización de la microcápsula hidrodispersable de palmitato de retinol en agua caliente, seguida por dilución en 2-propanol. La concentración de retinol presente como palmitato de retinol, es determinada por su absorbancia a 325 nm.

C. Puntos críticos y precauciones

Se necesita un espectrofotómetro con capacidad de lectura cercana a 325 nm. Por la importancia del espectrofotómetro en cuanto a la exactitud y confiabilidad de los análisis, éste debe calibrarse frecuentemente; para ello, deben seguirse las instrucciones que generalmente se incluyen en los manuales del fabricante que vienen con el equipo, especialmente para verificar que el monocromador está bien ajustado. La calibración debe hacerse periódicamente y no sólo cuando se instala una lámpara nueva.⁷

También se requiere una cámara de irradiación con luz ultravioleta, en la cual se destruye el retinol. Esta cámara puede consistir simplemente en una fuente de luz ultravioleta y una cortina que proteja a los técnicos analistas de la exposición a dicha irradiación. Lo importante es establecer con exactitud la distancia apropiada entre la fuente de luz UV y las soluciones, así como el tiempo óptimo de irradiación. Se recomienda confirmar la eficiencia de la cámara de irradiación periódicamente (cada tres meses, p.e.) y siempre que se instala una nueva lámpara. El anexo 3.1 presenta un ejemplo de cámara de irradiación y de un procedimiento de calibración.

Una vez que el azúcar se ha solubilizado en 2-propanol, el análisis no debe interrumpirse.

De acuerdo a la experiencia con este método en los laboratorios del INCAP, si la variabilidad entre los duplicados de una misma solución es tal que estos se apartan de su promedio en más del 3%, se rechazan los resultados y se repiten las lecturas. Los resultados de dos submuestras de la misma muestra pesadas independientemente no deben apartarse de su promedio en más de 8%; en caso contrario es necesario repetir el análisis completo.

⁶ Basado en un procedimiento descrito por Pineda (1) (1989) *Fortificación de azúcar con vitamina A. manual de operaciones*. División de Nutrición y Salud. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) 23 p.
⁷ La sección XIV C 1 describe un procedimiento para calibrar espectrofotómetros simples los que comúnmente son utilizados en química clínica

D. Equipo y materiales

Agitador tipo Vortex
Balones volumétricos o probetas de 100 mL
Baño de agua (50-60°C)
Cámara de irradiación con luz ultravioleta (descrita en el anexo 3.1)
Celdas para el espectrofotómetro (preferiblemente de cuarzo)
Espátulas de pesada
Espectrofotómetro UV/VIS
Papel de aluminio
Pipetas graduadas serológicas
Pipetas volumétricas
Tubos de ensayo de 20 mL
Tubo de vidrio de 10 x 75 mm transparentes a luz U.V.
Varillas de vidrio
Vasos de precipitar (beaker) de 200-250 mL

E. Reactivos

2-Propanol p.a. ((CH₃CH(OH)CH₃), pureza=99.7%, PM=60.10, d=0.78 g/mL).

F. Procedimiento

1. Homogenice la muestra mezclándola varias veces.
2. Pese en duplicado aproximadamente 1 g de la muestra, registrando el peso exacto en miligramos, y disuelva en 80 mL de agua destilada a 50°-60°C en un vaso de precipitar o Erlenmeyer. Utilice una varilla de vidrio para disolver completamente la muestra.
3. Incube en baño de agua a 50-60°C por 15 min. Deje en reposo a temperatura ambiente hasta que la solución se enfríe. Transfiera a un balón volumétrico o una probeta de 100 mL. Lave varias veces el vaso de precipitar con pequeñas porciones de agua destilada y transfiera los lavados al balón o probeta. Lleve a volumen con agua destilada y mezcle. Esta solución es de apariencia lechosa
4. En un tubo de ensayo de 20 mL mida 2 mL de la solución del paso 3 y agregue 8 mL de 2-propanol (esto da una dilución 2:10). Mezcle vigorosamente con el agitador Vortex.
5. En otros tubos de ensayo de 20 mL mida 1 mL de la solución del paso 4 y agregue 9 mL de 2-propanol (esto da una dilución 1:10) Mezcle con el agitador Vortex

6. Separe cerca de 1 mL de la solución de la etapa 5 y póngala en un tubo de ensayo transparente a luz UV. Irradie esta solución en la cámara de irradiación por 35 min (o el tiempo necesario según la eficiencia de la cámara de irradiación).
7. Ajuste el cero del espectrofotómetro con 2-propanol. Lea la absorbancia de las soluciones irradiadas y no irradiadas a 325 nm⁸ en celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

G. Cálculos

La concentración de palmitato de retinol en las muestras de premezcla se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Palmitato de retinol(mg/g)} = \frac{(Abs_o - Abs_{irrad})}{\epsilon} \times \frac{Vi}{p} \times FD \times FC_{esp}$$

en donde:

Abs_o = absorbancia sin irradiación
 Abs_{irrad} = absorbancia después de irradiación

Los parámetros de la ecuación son los siguientes:

Parámetro	Explicación	Valor
ε	Coefficiente de absortividad del palmitato de retinol (mg ⁻¹ cm ⁻¹ mL)	94.0
Vi	Volumen de la solución inicial de la muestra (mL)	100.0
p	Peso de la muestra (g) (etapa F.2)	dato de pesada
FD	Factor de dilución	50.0
FC _{esp}	Factor de corrección del espectrofotómetro, ⁹ idealmente	1.000

⁸ Si no se dispone de un espectrofotómetro con luz ultravioleta, puede leerse en un espectrofotómetro de luz visible que alcance longitudes de onda inferiores a 350 nm (ver tabla 3.1)

⁹ Ver Sección XIV C.1

Utilizando estos parámetros, y expresando los resultados como retinol no esterificado (multiplicando por la relación de pesos moleculares retinol/palmitato de retinol: $286.46/524.84 = 0.546$), la ecuación anterior se simplifica a:

$$\text{Retinol (mg/g)} = (Abs_o - Abs_{irrad}) \times \frac{29.04}{p} \times FC_{esp}$$

V. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA

A. Referencia

Arroyave G. y Funes C. de 1974. Enriquecimiento de azúcar con vitamina A. Método para la determinación cuantitativa de retinol en azúcar blanca de mesa. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 24:147-153.

B. Principio

Este método es una adaptación del método propuesto por Arroyave y Funes (1974). El procedimiento como está descrito aquí utiliza 5-10 veces menos cantidad de reactivos que el original, tiene una exactitud y recuperación semejantes, y su precisión, aunque un poco menor, es muy satisfactoria. Consiste en la extracción del palmitato de retinol en hexano. La concentración de retinol es determinada por su absorbancia a 325 nm. El método usualmente no requiere la destrucción del retinol por irradiación con luz ultravioleta, porque la absorbancia a 325 nm del extracto orgánico es debida esencialmente al retinol presente en el azúcar.

C. Puntos críticos y precauciones

Se necesita un espectrofotómetro con capacidad de lectura cercana a 325 nm. Por la importancia del espectrofotómetro en cuanto a la exactitud y confiabilidad de los análisis, éste debe calibrarse frecuentemente; para ello, deben seguirse las instrucciones que generalmente se incluyen en los manuales del fabricante que vienen con el equipo, especialmente para verificar que el monocromador está bien ajustado. La calibración debe hacerse periódicamente y no sólo cuando se instala una lámpara nueva.¹⁰

También se requiere una cámara de irradiación con luz ultravioleta, en la cual se destruye el retinol. Esta cámara puede consistir simplemente en una fuente de luz ultravioleta y una cortina que proteja a los técnicos analistas de la exposición a dicha irradiación. Lo importante es establecer con exactitud la distancia apropiada entre la fuente de luz UV y las soluciones, así como el tiempo óptimo de irradiación. Se recomienda confirmar la eficiencia de la cámara de irradiación periódicamente (cada tres meses, p.e.) y siempre que se instala una nueva lámpara. El anexo 3.1 presenta un ejemplo de cámara de irradiación y de un procedimiento de calibración.

Una vez que el palmitato de retinol se ha extraído en hexano, el análisis no debe interrumpirse.

De acuerdo a la experiencia con este método en los laboratorios del INCAP, si la variabilidad entre las réplicas de una misma solución de azúcar es tal que éstas se apartan de su

¹⁰ La sección XIV C 1 describe un procedimiento para calibrar espectrofotómetros simples, los que comúnmente son utilizados en química clínica

promedio en más del 5%, se rechazan los resultados y se repiten las extracciones. La recuperación del método es por lo menos 91%.

D. Equipo y materiales

Agitador tipo Vortex
Balones volumétricos o probetas de 100 mL
Baño de agua (50-60°C)
Bulbos de aspiración para pipetas Pasteur y pipetas serológicas
Celdas para espectrofotómetro (preferiblemente de cuarzo)
Espátulas de pesada
Espectrofotómetro UV/Vis
Pipetas graduadas serológicas
Pipetas Pasteur
Pipetas volumétricas
Tubo de ensayo de 20 mL, con tapón esmerilado o de rosca
Varillas de vidrio
Vasos de precipitar (beaker) de 200-250 mL

E. Reactivos

1. Etanol absoluto p.a. ((C₂H₅OH), pureza=99.8%, PM=46.07, d=0.79 g/mL).
2. Hexano p.a. ((C₆H₁₄), pureza=99%, PM=86.18, d=0.66 g/mL).
3. Hidróxido de sodio-0.1 N Disuelva 4 g de hidróxido de sodio ((NaOH, pureza=97%, PM=40.0) en 1 L de agua destilada. Guarde en botella de polietileno o polipropileno.

F. Procedimiento

1. Homogenice la muestra de azúcar mezclándola varias veces.
2. Pese aproximadamente 20 g de azúcar, registrando el peso exacto en miligramos, y disuelva con 60-80 mL de NaOH-0.1 N en un vaso de precipitar de 200-250 mL. Mezcle con una varilla de vidrio para disolver completamente.
3. Incube en baño de agua a 50-60°C por 15 min. Deje en reposo a temperatura ambiente hasta que las soluciones se enfrien. Transfiera cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL. Lave varias veces el vaso de precipitar con pequeñas porciones de NaOH-0.1 N y transfiera los lavados al balón. Afore a 100 mL NaOH-0.1 N y mezcle

4. Transfiera 4 mL de la solución preparada en el paso (3) a cada uno de tres tubos de vidrio de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca) con el propósito de analizar cada solución por triplicado. Prepare en triplicado un blanco de reactivos solamente con NaOH-0.1 N y llevándolo a través de los mismos pasos del procedimiento que las muestras.
5. Agregue 4 mL de etanol absoluto a cada tubo. Mezcle en agitador tipo Vortex por 5 segundos.
6. Mida 5 mL de hexano y agregue a cada uno de los tubos del paso (5). Tape cada tubo inmediatamente y agite con suficiente intensidad en el agitador tipo Vortex por 30 segundos, para asegurar la extracción completa del palmitato de retinol. Destape ligeramente los tubos para aliviar la presión de los gases.
7. Permita la separación de fases. La fase orgánica es la superior.
8. A la mayor brevedad posible, transfiera con una pipeta Pasteur la fase orgánica a una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, y lea su absorbancia a 325 nm.¹¹ Ajuste el cero del instrumento con el hexano antes de cada lectura.

G. Cálculos

La concentración de palmitato de retinol en las muestras de azúcar se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Palmitato de retinol } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Abs}_{\text{corregida}}}{\epsilon} \times \frac{V_h}{V_{az}} \times \frac{V_i}{p} \times FC_{\text{esp}}$$

en donde:

$$\text{Abs}_{\text{corregida}} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

$\text{Abs}_{\text{blanco}}$ es el promedio de tres lecturas, y que debería ser menor de 0.050.

Los parámetros de la ecuación son los siguientes:

11 Si no se dispone de un espectrofotómetro con luz ultravioleta puede leerse en un espectrofotómetro de luz visible que alcance longitudes de onda inferiores a 350 nm

Parámetro	Explicación	Valor
ϵ	Coefficiente de absorptividad del palmitato de retinol en hexano ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$)	0.092
Vh	Volumen de la fase orgánica (mL)	5.0
Vaz	Volumen de la alícuota analizada de la solución de azúcar (mL)	4.0
Vi	Volumen de la solución inicial de la muestra (mL)	100.0
p	Peso de la muestra (g) (etapa F.2)	dato de pesada
FC _{esp}	Factor de corrección del espectrofotómetro ¹² idealmente	1.000

Utilizando estos parámetros, y expresando los resultados como retinol no esterificado (multiplicando por la relación de pesos moleculares retinol/palmitato de retinol: $286.46/524.84 = 0.546$), la ecuación anterior se simplifica a:

$$\text{Retinol } (\mu\text{g/g}) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{741.85}{p} \times \text{FC}_{\text{esp}}$$

H. Verificación de la recuperación del método

Se recomienda verificar la eficiencia de la extracción por medio del siguiente procedimiento:¹³

1. Prepare una muestra “control” con azúcar sin fortificar, y siga las etapas (F.1) a la (F.4) del procedimiento. En este punto, agregue a 2 de los 3 tubos de ensayo, 3 mL de etanol absoluto y luego 1 mL de una solución en etanol de palmitato de retinol de concentración conocida (aproximadamente 20 microgramos de palmitato de retinol por mililitro¹⁴), los “controles”. Al tercer tubo (el “blanco”), agregue 4 mL de etanol absoluto. Continúe con el procedimiento descrito a partir de la etapa

¹² Ver Sección XIV C.1

¹³ Notese que este ensayo de recuperación se hace con referencia a palmitato de retinol puro en vez de la forma microencapsulada (250-CWS). Sin embargo, la experiencia de los laboratorios del INCAPI indica que los resultados son prácticamente los mismos.

¹⁴ Preparada a partir de una solución madre de 100 $\mu\text{g/mL}$ de palmitato de retinol en etanol, almacenada a -20°C bajo atmósfera de nitrógeno y en frasco oscuro. La solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ debería tener una absorbancia cercana de 2.0 a 325 nm en contra de etanol absoluto.

(F.6). Lea la absorbancia de los “controles” y de su “blanco”. Sustraiga la absorbancia del “blanco” al promedio de las absorbancias de los “controles”; ésta es la absorbancia debida al palmitato de retinol agregado (*s*).

2. Por aparte, prepare una solución de palmitato de retinol en la siguiente forma: Mida 1 mL de la misma solución de palmitato de retinol que fue usada en la etapa anterior en un balón volumétrico de 5 mL y afore con etanol. Lea la absorbancia de esta solución, y multiplique por 0.98, para compensar por la mayor absorbancia del palmitato de retinol en etanol que en hexano. Este producto (*t*) es la absorbancia teórica que debía haberse encontrado si la recuperación fuera 100% eficiente.
3. Calcule la recuperación (*R*) así:

$$R = \frac{s}{t} \times 100$$

VI. DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA SEMI-CUANTITATIVA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA

A. Referencias

Arroyave G., Pineda O. y Funes C. de 1974 Enriquecimiento de azúcar con vitamina A. Método rápido para la fácil inspección del proceso. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 24: 155-159.

Bayfield R.F. y Cole E.R. 1980 .Colorimetric determination of vitamin A with trichloroacetic acid. En: McCormick D.B. y Wright L.D., Eds. *Methods in Enzymology, Parte F. Vitamins and Coenzymes*, Vol. 67. New York: Academic Press. pp 189-195.

B. Principio

El método aquí descrito es una modificación del propuesto por Arroyave, Pineda y Funes (1974). Este método se basa en la formación de anhidroretinol al mezclarse el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. Se genera un compuesto de color azul cuya intensidad puede medirse por comparación visual contra una escala de soluciones de sulfato de cobre. El color es transitorio por lo que la comparación debe hacerse dentro de 10 segundos después de haber agregado el reactivo.

C. Puntos críticos y precauciones

Es preciso preparar el reactivo cromógeno con suficiente frecuencia, ya que es inestable. Se sugiere utilizarlo dentro de cinco días si se guarda a 25°C y dentro de 14 días si se guarda en refrigeración. En este último caso, el reactivo debe sacarse del refrigerador de dos a tres horas antes de ser utilizado; si se forman cristales deben disolverse con movimientos rotativos. Para verificar la calidad del reactivo, se recomienda analizar un control de azúcar con concentración conocida de retinol y cerciorarse de que la intensidad del color azul coincida con la esperada según la escala.

El reactivo cromógeno es muy corrosivo, por lo que debe manejarse con precaución y sólo por personal adecuadamente capacitado. Pocos minutos antes de utilizarlo, la cantidad necesaria debe decantarse en un vaso de precipitar para que sea más fácil tomarlo con una jeringa. Se utiliza una jeringa en vez de pipeta para asegurar el agregado vigoroso y rápido del reactivo sobre la solución de azúcar. El reactivo tiende a enturbiarse al contacto con la humedad del ambiente. No debe regresarse el reactivo sobrante del vaso de precipitar al envase original.

D. Materiales

Frasco de plástico de 50 mL

Frasco de vidrio de boca ancha (para descartar los desechos)

Frasco de 500 mL o termo (para transportar el agua destilada)

Frasco oscuro con tapón de vidrio esmerilado
Guantes desechables de goma
Jeringa de vidrio de 5-10 mL con punta de polietileno de 3 cm en el extremo
Pipetas graduada de 10 mL
Soluciones de sulfato de cobre (escala colorimétrica), ver descripción más adelante.
Tubos de ensayo de 15 x 100 mm con una marca a 1 mL y otra al nivel del volumen que ocupan 10 g de azúcar del tipo que se va a analizar
Vasos de precipitar (beaker) de 50-100 mL

E. Reactivos

1. Reactivo cromógeno: ácido tricloroacético /diclorometano

Disuelva 120.0 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolver por completo, entibie la mezcla en baño de agua a 50-60°C, agitando constantemente. Almacene en un frasco ámbar con tapón esmerilado, preferiblemente en refrigeración. El reactivo hecho de esta manera alcanza para 25-30 muestras.

2. Escala colorimétrica

A partir de una solución “madre” de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) prepare las siguientes diluciones:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ <i>(g L)</i>	Equivalencia aprox. de concentración <i>($\mu\text{g g}$ retinol en azúcar)</i>
30	5
60	10
90	15
120	20

Mida 4 mL de cada una de las soluciones patrón de sulfato de cobre en el mismo tipo de tubos de ensayo en los que se analizarán las muestras. Tápelos herméticamente para evitar evaporación. Rotule cada tubo con su respectivo número de identificación, que indica el color aproximado que produce una muestra de azúcar con esa concentración de retinol en $\mu\text{g/g}$. Estas soluciones son estables indefinidamente a temperatura ambiente.

F. Procedimiento

I Homogenice la muestra de azúcar mezclándola varias veces

2. En el frasco de 50 mL, ponga 10 g de azúcar (o con uno de los tubos de ensayo con menisco marcado, tome el volumen equivalente).
3. Agregue 10 mL de agua a 50-60°C, preferiblemente destilada. Disuelva el azúcar, si necesario calentando la solución.
4. Deje la solución en reposo a temperatura ambiente hasta que se enfríe.
5. Transfiera solución de azúcar a un tubo de ensayo hasta el nivel marcado a 1 mL.
6. Vierta la cantidad estimada del cromógeno que se utilizará en un vaso de precipitar.
7. Utilizando la jeringa, agregue a cada solución de azúcar 3 mL del reactivo cromógeno y mezcle inmediata y vigorosamente. Utilice guantes desechables para evitar el contacto accidental del reactivo cromógeno con la piel.
8. Compare el color azul de la muestra con los patrones de la escala colorimétrica. Efectúe esta comparación antes de que hayan transcurrido 10 segundos de haber agregado el reactivo, ya que el color se mantiene por un corto tiempo.
9. Estime el nivel de retinol en el azúcar ($\mu\text{g/g}$) con base en el patrón cuyo color es el más similar al desarrollado por la muestra. En la mayoría de los casos, la intensidad del color azul cae entre dos de los tubos de referencia. La concentración de retinol, por lo tanto, debe informarse dentro de este rango. Por ejemplo, si la intensidad del color cae entre los niveles 30 y 60 g/L de sulfato de cobre, el contenido de retinol es entre 5 y 10 $\mu\text{g/g}$.
10. Deseche los residuos del reactivo cromógeno, incluyendo el que se ha hecho reaccionar con el azúcar, dentro del frasco de vidrio para desechar, y llévelo al laboratorio para su deposición final.

VII. METODO VOLUMETRICO PARA LA DETERMINACION DE PEROXIDOS EN ACEITES

A. Referencia

Association of Official Analytical Chemist 1984 *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14a. ed. Arlington, Virginia.

B. Principio

Este método se aplica para determinar el nivel de peróxidos en los aceites que se usan en la preparación de la premezcla de vitamina A. Los peróxidos y productos similares provienen de la oxidación de las grasas y aceites. Los peróxidos oxidan al yoduro de potasio a yodato, el cual se mide cuantitativamente por su reacción redox con tiosulfato de sodio. La reacción se lleva a cabo en medio ligeramente ácido y en presencia de un exceso de iones yoduro. Debido a la naturaleza hidrofóbica del aceite, la titulación se lleva a cabo en una mezcla de ácido acético/cloroformo.

C. Puntos críticos y precauciones

Es recomendable que los reactivos se mantengan libres de oxígeno, por lo que se sugiere burbujearlos con un gas inerte (CO₂ o N₂).

D. Equipo y materiales

Agitador magnético

Balones volumétricos de 500 y 1000 mL

Bureta

Erlenmeyers de 250 mL, de preferencia con tapón esmerilado

Espátulas de pesada

Frasco gotero

Probeta de 1000 mL

Varillas de vidrio

Vasos de precipitar (beaker) de 100 y 400 mL

E. Reactivos

1. Acido acético/cloroformo.

Mezcle 3 volúmenes de ácido acético glacial ((CH_3COOH) , pureza=99.7%, PM=60.05, $d=1.05 \text{ g/mL}$, con 2 volúmenes de cloroformo USP ((CH_2Cl_2)). Prepare sólo la cantidad necesaria para su pronto uso, y colóquelo en frasco de vidrio.

2. Solución indicadora de almidón-1%.

En un vaso de precipitar de 100 mL agregue 0.5 g de almidón p.a. y 5 mL de agua destilada caliente. Mezcle y agregue con agitación constante 45 mL de agua destilada. Hierva por unos pocos minutos, enfrie y filtre. Guarde en frasco gotero por no más de una semana.

3. Tiosulfato de sodio-0.1 N.

Disuelva aproximadamente 25 g de tiosulfato de sodio p.a. ($(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, pureza=99.5%, PM=248.18), en un litro de agua destilada. Lleve a ebullición y hierva suavemente por 5 minutos. Guarde en un frasco oscuro lavado previamente con mezcla crómica y enjuagado con agua hervida. Almacene en un lugar oscuro y fresco. La solución es estable por cerca de 6 meses. Descarte si se enturbia. Esta solución debe estandarizarse antes de su uso (ver sección de Procedimiento más adelante). Diluciones de esta solución se preparan con agua destilada hervida, justo antes de su uso.

4. Yoduro de potasio. ((KI), PM=166.01) libre de yodato.

5. Acido clorhídrico-1 N.

En un balón volumétrico de 1000 mL, conteniendo 300 mL de agua destilada; agregue lentamente 82.8 mL de ácido clorhídrico concentrado ((HCl) , 37%, PM=36.46, $d=1.2 \text{ g/mL}$). Enfrie a temperatura ambiente y lleve, a la marca de 1000 mL con agua destilada. Guarde en frasco de vidrio bien tapado, evitando su contacto con vapores o medios alcalinos.

6. Dicromato de potasio. ($(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$, pureza=99.0, PM=294.19).

F. Procedimiento

1. Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio

Cada vez que se corre un lote de muestras, todo el procedimiento siguiente se hace en triplicado,

- a. Pese entre 0.2000 a 0.2300 g de dicromato de potasio, secados previamente por 2 horas a 105°C y guardado en una desecadora; registre el peso exacto. Transfiera a frasco Erlenmeyer de 250 mL.
- b. Agregue cerca de 80 mL de agua destilada, 2 g de yoduro de potasio y, con agitación constante, 20 mL de HCl-1 N. Deje en reposo por 10 minutos en la oscuridad.
- c. Agitando constantemente con el agitador magnético, titule con tiosulfato de sodio-0.1 N, hasta que el color amarillo casi haya desaparecido. En ese punto, agregue 10 gotas de solución de almidón-1% como indicador. Continúe la titulación con un goteo lento. El punto final es indicado por la desaparición brusca del color azul. Anote el volumen final de la solución de tiosulfato que fue requerido para llegar al punto final.

La normalidad de la solución de tiosulfato se calcula así:

$$Na_2S_2O_3(eq/mL) = \frac{g K_2Cr_2O_7}{mL Na_2S_2O_3} \times \frac{1 eq Cr_2O_7}{294.19 g Cr_2O_7} \times \frac{6 eq S_2O_3}{1 eq Cr_2O_7}$$

Simplificando se tiene:

$$Normalidad Na_2S_2O_3 (eq/L) = \frac{g K_2Cr_2O_7}{mL Na_2S_2O_3} \times \frac{1000 (mL/L)}{49.032}$$

2. Titulación de las muestras

Cada muestra se corre en duplicado

- a. Pese 5.00 ± 0.05 g de muestra (grasas o aceites) en un Erlenmeyer de 250 mL con tapón esmerilado.
- b. Agregue 30 mL de la solución de ácido acético/cloroformo y mezcle suavemente para disolver.
- c. Agregue 1 g de yoduro de potasio y disuelva. Deje reposar por un minuto.
- d. Agregue 30 mL de agua destilada y 10 gotas de solución de almidón-1%. Titule lentamente con tiosulfato de sodio-0.1 N con agitación fuerte para liberar el yodo (I_2) de la fase de cloroformo. El punto final es indicado por la desaparición brusca del color azul. Si la titulación consume menos de medio mililitro de tiosulfato de sodio-0.1 N, rebaje la normalidad de la solución a 0.01 N (dilución 1:10) con agua destilada hervida y repita la titulación.

El yodo (I_2) intermediario formado es soluble en la fase orgánica, por lo que la desaparición del color (amarillo primero, y azul cuando ya se ha agregado el almidón) debe observarse en esa fase.

3. Titulación del blanco

En cada corrida, obtenga un blanco repitiendo el procedimiento anterior sin agregar muestra (debería necesitarse menos de 0.1 mL de la solución de tiosulfato de sodio). Sustraiga el volumen de titulante usado para el blanco de los volúmenes de titulación de cada muestra.

G. Cálculos

Los miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de muestra se calculan así:

$$\text{Peróx. (meq/kg)} = \frac{\text{Vol } S_2O_3 \text{ en mL}}{\text{g muestra}} \times S_2O_3 \text{ (eq/L)} \times 1000 \text{ (meq/eq)}$$

El nivel máximo de peróxidos en el aceite vegetal debe ser 5 meq/kg.

VIII. METODOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN SANGRE

A. Introducción

La evaluación del impacto nutricional de un programa de fortificación de azúcar con vitamina A requiere la medición de niveles de retinol en sangre, antes y después de la intervención.

En este capítulo se presentan dos métodos para la determinación del retinol sanguíneo. El primero es una adaptación del método espectrofotométrico clásico de Bessey y colaboradores (1946) (ver sección IX). La especificidad de este método se basa en la destrucción selectiva del retinol libre o esterificado presente en la muestra, por irradiación con luz ultravioleta. El segundo método requiere un aparato de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para separar el retinol libre de otras sustancias, lo cual lo hace más específico y sensible (ver sección X). El método espectrofotométrico, sin embargo, tiene la ventaja de que su costo es menor, y además permite analizar dos a tres veces más muestras durante el mismo período de tiempo. Su relativa limitación de no permitir diferenciar el retinol libre de sus ésteres tiene importancia sólo en poblaciones con ingesta muy alta de retinol en condiciones postprandiales, situación que no ocurre en los países en los que la deficiencia de vitamina A es un problema de salud pública.

La selección entre uno u otro método depende, pues, de los propósitos del estudio y de los recursos disponibles. Mientras que el método de HPLC es indudablemente más exacto y preciso, ambos métodos son suficientemente informativos para propósitos de evaluación.

La determinación de retinol en suero (o plasma) o en leche sigue las siguientes etapas de laboratorio:

1. *Tratamiento con álcalis.* Teóricamente, éste resulta en la hidrólisis de los ésteres de retinol presentes en las muestras. En el método espectrofotométrico dicha hidrólisis no es completa, pero esta limitación no afecta la utilidad del método para el fin que se propone. En el caso del suero o plasma este tratamiento es necesario para romper el complejo del retinol con su proteína transportadora, precipitando las proteínas séricas, liberando el retinol y eliminando sustancias interferentes.
2. *Extracción* El retinol y sus ésteres no hidrolizados son extraídos con un solvente orgánico. En la determinación espectrofotométrica se prefiere una mezcla de xileno-keroseno, mientras que en la determinación por HPLC se utiliza hexano u otro solvente de fácil evaporación.

3. *Determinación de la absorbancia.* Tanto en el método espectrofotométrico como en el de HPLC, la absorbancia del retinol a 325 nm se usa para su determinación cuantitativa.
4. *Destrucción selectiva del retinol.* Como ya se mencionó anteriormente, para asegurarse de que la absorbancia sea debida sólo al retinol, ésta se determina en los extractos de las muestras antes y después de destruir selectivamente el retinol por irradiación con luz ultravioleta. El método de HPLC no requiere esta etapa, ya que previo a la medición de la absorbancia del retinol, éste se separa cromatográficamente de otras sustancias acompañantes, inclusive de sus ésteres.

B. Toma y manejo de las muestras

El retinol sanguíneo puede medirse en suero o en plasma. Se prefiere suero si las muestras de sangre se toman en un lugar fijo y se procesan dentro de un período no mayor a 6 horas. Si esas condiciones no se logran, como es común en muchas encuestas, se recomienda utilizar plasma, ya que ha sido demostrado que se reduce el riesgo de hemólisis. Usando plasma puede demorarse la centrifugación de las muestras hasta 24 horas siempre que se conserven refrigeradas.

La sangre puede obtenerse por punción venosa o, si el laboratorio emplea micro-adaptaciones de los métodos analíticos, por pinchazo de la yema del dedo. Si se usa punción venosa, pueden extraerse 3 a 5 ml de sangre de una de las venas del antebrazo, tomando las precauciones rutinarias de higiene y seguridad. Aguja # 21 ó # 22 pueden utilizarse en niños preescolares, y # 20 en adultos. Cuando se aplica un torniquete en el antebrazo, éste debe quitarse tan pronto como la sangre empieza a fluir, con el propósito de evitar hemólisis. Se sugiere tomar directamente la muestra dentro de tubos "vacutainer" forrados con una camisa de papel de aluminio. Estos tubos deben rotularse tanto sobre sus paredes de vidrio como sobre la camisa de papel de aluminio. Si se encuentra que la extracción de sangre venosa con "vacutainer" es dificultosa, se sugiere utilizar una jeringa y luego trasladar por inyección a un tubo "vacutainer". Para evitar esta doble manipulación de la muestra, un procedimiento alternativo, aunque un poco más costoso, es utilizar los tubos-jeringa de Sarstedt (Tipo Luer-Monovette), en los que la jeringa se convierte en el tubo de transporte y procesamiento una vez que su émbolo es eliminado. Tubos "vacutainer" conteniendo geles separadores de suero o plasma ayudarán a prevenir hemólisis, siempre que la sangre sea centrifugada antes de ser transportada.

La muestra de sangre debe protegerse de exposición al aire, a la luz solar directa y al contacto con el hielo. Las muestras deben acondicionarse de una forma tal que se minimice su movimiento durante el transporte. Si la muestra entra en contacto con el aire, se recomienda desplazarlo, sin agitar la muestra, con una corriente de gas inerte por 30-60 segundos y luego tapar el tubo herméticamente

El suero debe separarse del coágulo sanguíneo por centrifugación a 2,500-3,000 rpm durante 15 minutos. Si el suero no es claro, el sobrenadante se transfiere con una pipeta Pasteur a otro tubo de centrifuga, y la centrifugación se repite. El suero debe guardarse congelado a -20°C o temperaturas inferiores dentro de viales de tamaño adecuado, de tal forma que el espacio libre entre la superficie de la muestra y la tapadera sea mínimo, aunque suficiente para permitir la expansión de la muestra al congelarse.

El plasma se separa de las células sanguíneas mediante un procesamiento similar, con la variante de que el tiempo de centrifugación puede reducirse a 10 minutos. Estas muestras deben manejarse y almacenarse de la misma forma que las muestras de suero. Una vez que las muestras hayan sido congeladas se recomienda descongelarlas sólo hasta el momento de su análisis. Bajo estas condiciones, las muestras permanecen sin cambio al menos por un año.

Si es necesario transportar las muestras de suero (o plasma) de un sitio a otro debe asegurarse que se mantengan congeladas todo el tiempo. Deben utilizarse cantidades suficientes de hielo seco o nitrógeno líquido para evitar que se descongelen.

Cuando las muestras se tomen por medio de pinchazo de la yema del dedo, se recomienda utilizar lancetas automáticas, que provocan una herida de profundidad fija, y menos dolorosa al paciente. Es importante recalcar que la sangre no debe obtenerse presionando (“ordeñando”) el dedo. La cantidad de sangre que fluye por la herida puede aumentarse, si antes de realizar la punción se solicita a la persona agitar vigorosamente la mano hacia arriba y hacia abajo. La muestra puede colectarse en un “microvacutainer”,¹³ el cual puede ser centrifugado. Después de la centrifugación, el suero o plasma debe ser transferido a un vial y almacenado como se explicó anteriormente.

Con el propósito de verificar que las muestras no se han deteriorado durante el almacenamiento, alícuotas de controles de suero o plasma con niveles conocidos de retinol deben ser almacenados bajo las mismas condiciones y analizados simultáneamente con las muestras.

El laboratorio debe preparar instructivos específicos sobre los procedimientos para la toma, preparación y transporte de los especímenes biológicos colectados en el campo. Los técnicos responsables deben ser rigurosamente adiestrados, creando en ellos conciencia de la importancia de que las muestras lleguen al laboratorio en perfectas condiciones para no afectar la validez de los resultados analíticos. Personal profesional del laboratorio debe periódicamente hacer visitas de inspección al trabajo de laboratorio de campo para cerciorarse de que todo marcha bien y discutir posibles problemas que se presenten.

¹³ “Microvacutainer” con labio facilitara dirigir el flujo de sangre hacia su interior

IX. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE RETINOL SANGUÍNEO POR DESTRUCCIÓN ULTRAVIOLETA DEL RETINOL

A. Referencias

Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. y López J.A. 1946 The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem.* 166:177-188.

Araujo C.R.C. y Flores H. 1978 Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clin. Chem.* 24:386.

B. Principio

El procedimiento descrito es una adaptación del método de Bessey *et al.* (1946). Este consiste en la precipitación de proteínas, con una solución de potasa alcohólica, y la subsecuente extracción del retinol y sus ésteres en una mezcla de keroseno-xileno. La saponificación, aunque incompleta, facilita la extracción de retinol, y elimina sustancias interferentes. El retinol en el extracto es destruido selectivamente por exposición a luz ultravioleta. La diferencia entre la absorbancia a 328 nm¹⁴ antes y después de la irradiación es atribuible y proporcional al retinol total.

C. Puntos críticos y precauciones

Se necesita un espectrofotómetro con capacidad de lectura cercana a 325 nm. Por la importancia del espectrofotómetro en cuanto a la exactitud y confiabilidad de los análisis, éste debe calibrarse frecuentemente; para ello, deben seguirse las instrucciones que generalmente se incluyen en los manuales del fabricante que vienen con el equipo, especialmente para verificar que el monocromador está bien ajustado. La calibración debe hacerse periódicamente y no sólo cuando se instala una lámpara nueva.¹⁵

También se requiere una cámara de irradiación con luz ultravioleta, en la cual se destruye el retinol. Esta cámara puede consistir simplemente en una fuente de luz ultravioleta y una cortina que proteja a los técnicos analistas de la exposición a dicha irradiación. Lo importante es establecer con exactitud la distancia apropiada entre la fuente de luz UV y las soluciones, así como el tiempo óptimo de irradiación. Se recomienda confirmar la eficiencia de la cámara de irradiación periódicamente (cada tres meses, p.e.) y siempre que se instala una nueva lámpara. El anexo 3.1 presenta un ejemplo de cámara de irradiación y de un procedimiento de calibración.

14 Longitud de onda de máxima absorbancia del retinol en una mezcla de keroseno-xileno

15 La sección XIV C.1 describe un procedimiento para calibrar espectrofotómetros simples, los que comúnmente son utilizados en química clínica

Una vez que el retinol se ha extraído en la fase orgánica el análisis no debe interrumpirse.

De acuerdo a la experiencia con este método en los laboratorios del INCAP, los resultados de dos submuestras de la misma muestra analizadas independientemente no deben apartarse de su promedio en más de 10% si su concentración es igual o superior a 30 $\mu\text{g/dL}$, o en más de 15% si su concentración es entre 15 y 30 $\mu\text{g/dL}$. En caso contrario, el análisis de la muestra se repite completamente. Muestras para las que se calcule una concentración de retinol menor de 15 $\mu\text{g/dL}$ deben informarse como conteniendo <15 $\mu\text{g/dL}$. La recuperación del método es de 93% o más.

D. Equipo y materiales

Agitador tipo Vortex

Baño de Agua (56°C)

Bulbos para aspiración con pipetas Pasteur y pipetas serológicas

Cámara de irradiación con luz ultravioleta (ejemplo en anexo 3.1)

Celdas de cuarzo con paredes negras de 1 mL o menor capacidad

Centrífuga refrigerada

Cronómetro

Espectrofotómetro UV/Vis

Frascos de vidrio oscuro

Pipetas graduadas serológicas

Pipetas automáticas tipo Eppendorf

Pipetas Pasteur

Probetas de vidrio

Tubos de vidrio de 10 x 75 mm transparentes a luz U.V.

Tubos de vidrio de 12 x 75 mm

Varillas de vidrio

E. Reactivos

1. Potasa alcohólica.

Combine 10 volúmenes de etanol absoluto p.a., ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), pureza=99.8%, PM=46.07, $d=0.79 \text{ g/mL}$, con 1 volumen de hidróxido de potasio-11.0 N (KOH, PM=56.11). Mezcle 50 veces con una varilla de vidrio Centrifugue a 3,000 rpm por 15 minutos. Después de la centrifugación puede observarse un pequeño precipitado blanquecino o una fase separada en el fondo del tubo, esto es causado por la presencia de carbonato de potasio que existe en algunas

preparaciones de KOH. La solución sobrenadante clara debe emplearse dentro de 60 minutos después de preparada.

2. Keroseno/Xileno 1:1 v:v

Mezcle inmediatamente antes de su uso las cantidades necesarias de keroseno (fracción 206-216°C¹⁶ destilada en vidrio) y xileno (fracción 138-143°C¹⁶ destilada en vidrio). Agite hasta que la solución se torne clara. Tanto los solventes individuales como su mezcla deben almacenarse en frascos de vidrio oscuro.

F. Procedimiento

1. Si las muestras han estado en congelación, descongélelas a temperatura ambiente (20-25°C) y mézclelas perfectamente en un agitador tipo Vortex. Centrifugue a 2,500 rpm por 10 minutos, preferiblemente en una centrífuga refrigerada, para eliminar cualquier interferencia debida a la formación de fibrina.
2. A tubos de vidrio de 12 x 75 mm transfiera respectivamente en duplicado 0.5 mL de cada suero (o plasma).
3. Prepare en duplicado un blanco de reactivos con 0.5 mL de agua destilada. Además, prepare dos tubos con 0.5 mL de sueros control con niveles de retinol conocidos.
4. Agregue 0.5 mL de potasa alcohólica a todos los tubos. Mezcle en un agitador tipo Vortex por 10-20 segundos.
5. Tape los tubos con tapones de hule e incube en baño de agua a 56°C por 20 minutos.
6. Enfrie a temperatura ambiente. Agregue 1.0 mL de la mezcla keroseno/xileno 1:1. Mezcle en agitador tipo Vortex por 30 segundo medidos con cronómetro. La

16 Estas temperaturas deben corregirse de acuerdo a la presión ambiental a diferentes altitudes sobre el nivel del mar.
asi

$$T_o \text{ corregida} = T_o \text{ ref} - \frac{(273 - T_o \text{ ref}) (760 - \text{mmHg lugar})}{10\,000}$$

agitación debe ser suficientemente vigorosa para asegurar una completa extracción.¹⁷

7. Centrifugue a 3,000 rpm por 10 minutos en centrífuga, preferiblemente refrigerada.
8. Separe con pipeta Pasteur la fase orgánica y transfiera a una celda espectrofotométrica. Tenga cuidado de no acarrear fase acuosa. Lea la absorbancia de la fase orgánica a 328 nm contra la mezcla de keroseno/xileno.
9. Con una pipeta Pasteur, transfiera la fase orgánica de la celda espectrofotométrica a un tubo de 10 x 75 mm que sea transparente a la luz ultravioleta. Irradie con luz ultravioleta por 35 minutos, o lo que se haya determinado que es necesario para destruir preferencialmente al retinol (ver anexo Sección XIV.C.2).
10. Entre muestra y muestra, aspire completamente el residuo dejado dentro de la celda espectrofotométrica, utilizando una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío. Lave las celdas con la mezcla xileno-keroseno cada 15 lecturas.
11. Lea la absorbancia a 328 nm de cada uno de los extractos irradiados contra la mezcla de keroseno/xileno.

G. Cálculos

1. Corrija la absorbancia de cada muestra antes de irradiar restando la absorbancia del blanco no irradiado. Haga lo mismo con las fracciones irradiadas, utilizando el blanco irradiado. Nótese que en ocasiones la absorbancia del blanco de reactivos es negativa, por lo que debe sumarse esta lectura en vez de restarse.
2. Determine la absorbancia específica debida al retinol restando las lecturas corregidas de los tubos irradiados de las de sus correspondientes no irradiados, y corrija por el "factor" de eficiencia de la cámara de irradiación (ver Sección XIV C.2).

17 La relación de los volúmenes de suero:potasa alcohólica xileno/keroseno en el procedimiento como está descrito es 1:1.2. Si se desea incrementar la sensibilidad del método se puede (a) aumentar el volumen de suero (o plasma) y proporcionalmente el de potasa alcohólica (manteniendo la relación 1:1) sin variar el volumen de keroseno/xileno, en cuyo caso el tamaño de los tubos de ensayo debe adaptarse para que éstos acepten mayores volúmenes, o (b) disminuir el volumen de keroseno/xileno manteniendo inalterados los volúmenes de suero y potasa alcohólica. En estos casos debe considerarse la necesidad de adaptaciones para asegurar que en la cámara de irradiación la exposición de los extractos a la luz ultravioleta es extensa y completa. Tómese en cuenta que cualquier variación en la relación de volúmenes de suero a xileno/keroseno conlleva un diferente factor de dilución en la ecuación para los cálculos.

3. Calcule la concentración de retinol con la ecuación siguiente:

$$[Retinol] (\mu\text{g/dL}) = \frac{Abs_{Retinol} \times Vs \times 10^6}{\epsilon \times Vm}$$

en donde:

$Abs_{retinol}$ es la absorbancia de cada muestra determinada como se explica en la etapa G.2, arriba.

Los parámetros de la ecuación son los siguientes:

Parámetro	Explicación	Valor
ϵ	Coefficiente de absorción ($\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{dL}$) del retinol en la mezcla de keroseno/xileno a 328 nm	1570
Vs	Volumen de la fase orgánica (mL)	1.0
Vm	Volumen de la muestra (mL)	0.5

Utilizando estos parámetros, la ecuación anterior se simplifica a:

$$[Retinol] (\mu\text{g/dL}) = Abs_{retinol} \times 1273.9$$

H. Verificación de la reproducibilidad del método

Con el propósito de verificar la reproducibilidad del método a través de corridas independientes, se recomienda preparar un pool de suero y determinar su concentración exacta de retinol. Prepare una serie de viales con 1.5 mL de este suero control, tratando de que se deje el mínimo espacio libre entre la superficie de la muestra y la tapadera del tubo. Desplace el aire de los tubos con un gas inerte (p.e. nitrógeno) y tape herméticamente. Mantenga estos tubos congelados a -20°C o temperaturas más bajas. Incluya en cada corrida rutinaria el análisis de este control. Con los valores encontrados después de 10 o más corridas del control, calcule el coeficiente de variación interensayo del método.

1. Verificación de la recuperación del método

Se aconseja verificar periódicamente la recuperación de la extracción. Para ello, se sugiere el siguiente procedimiento:

1. Irradie una muestra control de plasma o suero con luz ultravioleta por 1 hora. Luego, separe dos porciones. A una de las porciones (el “control”) agregue 10 microlitros de una solución de retinol-50 µg/mL en etanol absoluto¹⁸ por cada mililitro de muestra. A la segunda porción (el “blanco”) agregue 10 microlitros de etanol por cada mililitro de muestra. Trate ambas porciones como muestras independientes siguiendo el procedimiento de análisis a partir de la etapa F.2.
2. Calcule la absorbancia debida al retinol agregado así:

$$Abs_{retinol} = (Abs_{cont} - Abs_{hk} - Abs_{contirr} + Abs_{bkirr})$$

en donde Abs_{cont} y $Abs_{contirr}$ son la absorbancia del “control” antes y después de irradiación, respectivamente; y Abs_{hk} y Abs_{bkirr} son las absorbancias del “blanco” antes y después de irradiación, respectivamente.

El resultado de este cálculo es la absorbancia debida al retinol agregado (s).

3. Por aparte, en un balón de 10 mL, ponga 50 µL de la misma solución de retinol (50 µg/mL) y lleve a volumen con la mezcla de keroseno/xileno. Lea la absorbancia de esta solución a 328 nm en contra de la mezcla de keroseno/xileno, y multiplíquela por 0.99, que es la relación entre esta dilución y la dilución que ocurre durante el ensayo de recuperación (200/202). Este producto (i) es la absorbancia teórica que debía haberse encontrado si la recuperación fuera 100% eficiente.
4. Calcule la recuperación (R) así:

$$R = \frac{s}{i} \times 100$$

¹⁸ Una dilución 1:10 de la solución de retinol-50 µg/ml. debería tener una absorbancia cercana a 0.9 cuando es leída a 325 nm en contra de etanol

J. Variantes

Si se contara con un espectrofotómetro que pueda leer con exactitud celdas de menor capacidad, los volúmenes de muestra y reactivos pueden reducirse proporcionalmente, haciendo las adaptaciones necesarias en el tamaño de los tubos de ensayo y tubos de irradiar, así como en la cámara de irradiación.

Tanto con el método descrito anteriormente como con micrométodos, se recomienda que antes del uso de un espectrofotómetro se verifique su capacidad para leer celdas pequeñas. Para ello, prepare diluciones 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 y 5:100 de una solución de retinol-50 µg/mL en etanol. Lea la absorbancia de estas soluciones a 325 nm utilizando celdas de cuarzo normales (3 mL), y compare la absorbancia con celdas de cuarzo semi-micro (1 mL) o micro (menos de 1 mL). La lectura con las últimas celdas debería coincidir con aquella de las celdas normales. Se espera que las diluciones de retinol señaladas arriba tengan absorbancias en el intervalo de 0.100 a 0.500.

X. DETERMINACION DEL RETINOL SANGUINEO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

A. Referencias

Bankson D.D., Rusell R.M. y Sadowski J.A. 1986 Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal-phase liquid chromatography: method and applications. *Clin. Chem.* 32:35-40.

Bieri J.G., Tolliver T.J. y Catignani G.L. 1979 Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:2143.

DeRuyter M.G.M. y DeLeenheer A.P. 1976 Determination of serum retinol (vitamin A) by high-speed liquid chromatography. *Clin. Chem.* 22:1593-1595.

Packer L. 1990 *Methods in Enzymology. Retinoids. Part A. Molecular and metabolic Aspects.* Vol. 189: 75-76, 155-167, 170-175. New York: Academic Press.

B. Principio

Este es un método muy selectivo y preciso, que no requiere de blancos ni de la irradiación de los extractos que contienen el retinol. La muestra no necesita saponificación, ya que el método se destina a medir sólo el retinol libre. Si se deseara determinar los ésteres de retinol, el método puede adaptarse con tal propósito.

El suero o plasma es diluido 1/2 con una solución de acetato de retinol en etanol. El acetato de retinol sirve de control interno y el etanol precipita las proteínas y libera al retinol, que luego se extrae con hexano. El extracto se evapora bajo un atmósfera de nitrógeno y el residuo se resuspende en metanol. El retinol se separa por medio de cromatografía líquida de alta resolución, utilizándose una fase estacionaria apolar (C_{18}) y metanol al 95% como fase móvil. El retinol se detecta con un detector ultravioleta a 325 nm, y su concentración se determina con base en la relación del área del pico del retinol con la del acetato de retinol.

C. Puntos críticos y precauciones

Se necesita un espectrofotómetro con capacidad de lectura cercana a 325 nm. Por la importancia del espectrofotómetro en cuanto a la exactitud y confiabilidad de los análisis, éste debe calibrarse frecuentemente, para ello, deben seguirse las instrucciones que generalmente se incluyen en los manuales del fabricante que vienen con el equipo, especialmente para verificar que

el monocromador está bien ajustado. La calibración debe hacerse periódicamente y no sólo cuando se instala una lámpara nueva.¹⁹

Una vez que el retinol se ha extraído en la fase orgánica, el análisis no debe interrumpirse.

Debido a que tanto el patrón de retinol como el control interno de acetato de retinol no son completamente puros, debe estimarse su pureza mediante el porcentaje del área del pico correspondiente a cada uno de estos analitos con relación al área total de los picos del cromatograma.

Si se carece de agua grado HPLC obtenible comercialmente, ésta puede prepararse en el laboratorio con agua bidestilada, sometiéndola a desmineralización, filtrado y ebullición.

De acuerdo a la experiencia con este método en los laboratorios del INCAP, los resultados de dos submuestras de la misma muestra analizadas independientemente no deben apartarse de su promedio en más de 10%; en caso contrario el análisis de la muestra se repite completamente. La recuperación del método es mayor de 95%.

D. Equipo y materiales

Agitador tipo Vortex

Balones volumétricos de 10 y 100 mL

Bulbos para aspiración con pipetas Pasteur y pipetas serológicas

Celdas de cuarzo para espectrofotómetro

Centrifuga refrigerada

Columna Micropak SP-18-5 de 150 x 4 (D.I.) mm

Cromatógrafo líquido con detector UV

Cronómetro

Espectrofotómetro UV/Vis

Frascos de vidrio oscuro

Membranas Millpore para filtros de 45 µm

Pipetas automáticas tipo Eppendorf

Pipetas graduadas serológicas

Pipetas Pasteur

Tubos cónicos para centrifuga (9 x 76 mm)

Tubos microcentrifuga ámbar (500 µL)

¹⁹ La sección XIV C 1 describe un procedimiento para calibrar espectrofotómetros simples los que comúnmente son utilizados en química clínica

Vasos de precipitar (beaker) de 10 mL

E. Reactivos

1. Etanol Absoluto p.a. (C_2H_5OH), pureza=99.8%, PM=46.07, d=0.79 g/mL).
2. Hexano grado HPLC (C_6H_{14}), pureza=95%, PM=86.18, d=0.66 g/mL).
3. Metanol grado HPLC (CH_3OH) pureza 100%, PM=32.04, d=0.79 g/mL).
4. Gas Nitrógeno (pureza=99.5%).
5. Control interno de acetato de retinol

- a. Solución “concentrada” ($\approx 500 \mu\text{g/mL}$)

En un vaso de precipitar de 10 mL pese 0.056 g de acetato de retinol de la más alta pureza (PM=328.5, pureza \approx 90%) y disuelva con etanol absoluto. Transfiera a un balón volumétrico de 100 mL. Lave el vaso de precipitar con varias porciones de etanol absoluto, y transfiera los lavados al balón. Agregue aproximadamente 0.002 g de BHT (3,5-bis-(t-butil)-4-hidroxitolueno). Afore a 100 mL con etanol absoluto. Guarde la solución en congelación (-20°C) en un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca. La concentración de esta solución se estima por cálculo a partir de la concentración de la solución “hija”.

- b. Solución “madre” ($\approx 50 \mu\text{g/mL}$)

En un balón volumétrico de 10 mL diluya 1 mL de la solución “concentrada” a 10 mL con etanol absoluto. Guárdela como se indica para la solución “concentrada” y estime la concentración de retinol a partir de la concentración de la solución “hija”.

- c. Solución “hija” ($\approx 0.5 \mu\text{g/mL}$)

En un balón volumétrico de 50 mL, diluya 0.5 mL de la solución “madre” a 50 mL con etanol absoluto Guárdela refrigerada Descártela al terminar de utilizarla

Determine la concentración de acetato de retinol en la solución “hija” en un espectrofotómetro como sigue:

- i. **Ajuste** el cero del instrumento con etanol absoluto. **Lea** en triplicado la absorbancia de la solución “hija” de acetato de retinol a 325 nm.
- ii **Divida** el valor promedio de la absorbancia entre 0.156^{20} y **multiplique** por el grado de pureza del reactivo (área del acetato de retinol/área total de todos los picos del cromatograma). El resultado obtenido es la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de la solución “hija”.

El nivel de retinol de las soluciones “madre” y “concentrada” en $\mu\text{g/mL}$ se obtiene multiplicando ese valor por 100 y 1000, respectivamente.

6. Soluciones patrón de retinol

- a. Solución “concentrada” ($\approx 500 \mu\text{g/mL}$)

En un vaso de precipitar de 10 mL **pese** 0.071 g de retinol de la más alta pureza ($\text{PM}=286.5$, pureza $\approx 70\%$) y **disuelva** con etanol absoluto. **Transfiera** a un balón volumétrico de 100 mL. **Lave** el vaso de precipitar con varias porciones de etanol absoluto, y **transfiera** los lavados al balón. **Agregue** aproximadamente 0.002 g de BHT. **Afore** a 100 mL con etanol absoluto. **Guarde** la solución en congelación (-20°C) en un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca. La concentración de esta solución se estima por cálculo a partir de la concentración de la solución “hija”.

- b. Solución “madre” ($\approx 50 \mu\text{g/mL}$)

En un balón volumétrico de 10 mL **diluya** 1 mL de la solución “concentrada” a 10 mL con etanol absoluto. **Guárdela** como se indica para la solución “concentrada” y estime la concentración de retinol a partir de la concentración de la solución “hija” de mayor concentración.

- c. Soluciones “hijas” ($\approx 1-10 \mu\text{g/mL}$)

²⁰ Este valor es el coeficiente de absortividad ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$) del acetato de retinol en etanol a 325 nm

En balón volumétrico de 25 mL, diluya 5 mL de la solución “madre” a 25 mL con etanol absoluto; ésta es la solución “hija” de 10 µg/mL. Diluya con etanol absoluto esta solución “hija” para obtener por lo menos 10 mL de 5 soluciones de retinol de diferente concentración dentro del rango de 1 a 10 µg/mL. Guarde las soluciones “hijas” refrigeradas. Descártelas al terminar de utilizarlas.

Determine en un espectrofotómetro, la concentración de retinol de la solución hija de mayor concentración como sigue:

- i. Ajuste el cero del instrumento con etanol absoluto. Lea en triplicado la absorbancia de la solución “hija” de retinol-10 µg/mL a 325 nm.
- ii. Divida el valor promedio de la absorbancia entre 0.1845²¹ y multiplique por el grado de pureza del reactivo (área del retinol/área total de todos los picos del cromatograma). El resultado obtenido es la concentración en µg/mL de esta solución “hija”. Calcule la concentración de las otras soluciones “hijas”, dividiendo el valor obtenido entre los respectivos factores de dilución.

El nivel de retinol de las soluciones “madre” y “concentrada” en µg/mL se obtiene multiplicando el nivel de retinol la solución “hija” de mayor concentración por 5 y 50, respectivamente.

F. Procedimiento

1. Obtención de la curva de calibración

- a. En balones volumétricos de 10 mL, ponga 0.1 mL de la solución “madre” de acetato de retinol (≈ 50 µg/mL), y 1.0 mL de cada solución “hija” de retinol. Lleve a volumen con metanol grado HPLC.
- b. Filtre cada solución a través de una membrana Millipore de 45 µm. Analice cada una de las soluciones preparadas en la etapa anterior en el equipo de HPLC

21 Este valor es el coeficiente de absortividad ($\text{mg}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ml}^{-1}$) del retinol en etanol a 325 nm

- c. **Trace** una gráfica de las concentraciones de retinol de las soluciones “hijas” en $\mu\text{g/mL}$ (x) *versus* el producto de la concentración del control interno de acetato de retinol por la razón de las áreas de los picos de elución del retinol sobre el del acetato de retinol (y). **Calcule** la ecuación de la línea de regresión con los valores obtenidos; ésta le servirá para calcular los niveles de retinol de las muestras. Esta curva es del tipo:

$$y = m \cdot x + b$$

en donde:

$y =$ [Acetato de retinol ($\mu\text{g/mL}$)] \times (Área pico de retinol/Área pico de acetato de retinol)

$x =$ Concentración de retinol ($\mu\text{g/mL}$)

$m =$ Pendiente (y x)

$b =$ Intercepto en la ordenada

Se recomienda calcular esta línea de regresión cada quince días para confirmar que las condiciones analíticas permanecen invariables. Sin embargo, en cada corrida debe analizarse por lo menos un control de retinol para confirmar la validez de la curva de calibración.

2. Extracción

Una sola extracción es suficiente para plasma y suero ya que se procesa un mayor número de muestras y se introducen menos errores.

- a. Si las muestras han estado en congelación, **descongélelas** a temperatura ambiente (20-25°C) y **mézclelas** perfectamente en un agitador tipo Vortex. Si se usa plasma, **centrifugue** a 2,500 rpm por 10 minutos para eliminar cualquier interferencia debida a la formación de fibrina
- b. A tubos cónicos para centrifuga de 9 x 76 mm, **transfiera** en duplicado 0.25 mL de suero (o plasma)
- c. **Agregue** 0.25 mL de la solución “hija” del control interno (acetato de retinol) **Mezcle** en un agitador tipo Vortex por 1 minuto

- d. Agregue 0.5 mL de hexano, y mezcle vigorosamente en agitador tipo Vortex por 1 minuto.
- e. Centrifugue a 2,000 rpm 2 minutos, preferiblemente en una centrifuga refrigerada.
- f. Transfiera con pipeta Pasteur la fase orgánica a un tubo microcentrífuga ámbar.
- g. Evapore utilizando una corriente de nitrógeno, dentro de una campana para solventes orgánicos.
- h. Resuspenda el extracto con 0.25 mL de metanol grado HPLC. Mezcle en agitador tipo Vortex por 1 minuto.
- i. Centrifugue a 2,000 rpm 5 minutos.

3. Cromatografía:

- a. Con una jeringa, tome la cantidad apropiada de muestra de acuerdo a la capacidad del equipo e inyéctela al sistema de HPLC bajo las condiciones analíticas especificadas. Un ejemplo es el siguiente:

Fase móvil	95% metanol/5% agua
Flujo	1.6 mL/min
Detector	UV a 325 nm con sensibilidad de 0.002 UA/mV
Atenuación integrador	4
Velocidad del papel	1 cm/min
Volumen de inyección	100 µL
Tiempo de elución	Retinol: 2.5 min Acetato de retinol: 4.5 min

- b. Al finalizar el trabajo del día, lave el sistema por lo menos por 30 minutos a un flujo de 0.5 mL/min con una mezcla de 95% metanol/5% agua, y después con metanol al 100% por 15 minutos

G. Cálculos

1. Calcule la razón del área del pico de retinol sobre el de acetato de retinol de cada muestra, y luego multiplíquela por la concentración de la solución “hija” de acetato de retinol.
2. La concentración de retinol en las muestras se calcula utilizando directamente la curva de calibración.
3. Para informar los niveles de retinol en las muestras en $\mu\text{g/dL}$, multiplique los valores estimados en el paso anterior x 100.

H. Verificación de la recuperación del método

Aunque no es imprescindible para los cálculos, se aconseja verificar trimestralmente la recuperación del método. Para ello, se sugiere el siguiente procedimiento:

1. Irradie una muestra de plasma o suero con luz ultravioleta por lo menos 1 hora. Luego, separe dos porciones. A una de las porciones agregue 10 microlitros de la solución “madre” de retinol de $50 \mu\text{g/mL}$ por cada mililitro de muestra (“control”).²² A la segunda porción (“blanco”) agregue 10 microlitros de etanol por cada mililitro de muestra. Trate ambas porciones como muestras independientes siguiendo todo el proceso cromatográfico.
2. Usando la curva de calibración, calcule el nivel de retinol para las dos porciones. Sustraiga el nivel de retinol calculado para el “blanco” del nivel calculado para el “control”. El resultado de este cálculo es la cantidad de retinol recuperada (*y*).
3. Por aparte, en un balón de 10 mL, ponga 0.1 mL de la solución “madre” de retinol de $50 \mu\text{g/mL}$, 0.1 mL de la solución “madre” del control interno (acetato de retinol) y lleve a volumen con metanol grado HPLC. Analice esta solución en el sistema de HPLC.
4. Estime el nivel de retinol usando la curva de calibración, y divídalos entre 1.01 (ajuste por la dilución hecha de la solución “madre” de retinol en la muestra “control”). Este valor (*t*) es el nivel teórico de retinol que debía haberse encontrado si la recuperación fuera 100% eficiente.

22 Una dilución 1:10 de la solución “madre” de retinol debería tener una absorbancia cercana a 0.9 cuando es leída a 325 nm en contra de etanol

5. Calcule la recuperación (R) así:

$$R = \frac{S}{t} \times 100$$

XI. METODOS PARA LA DETERMINACION DE RETINOL EN LECHE HUMANA

A. Introducción

La evaluación del impacto nutricional de un programa de fortificación de azúcar con vitamina A puede hacerse midiendo los niveles de retinol en leche humana, antes y después de la intervención.

Dos métodos para la determinación del retinol en leche humana se presentan aquí. El primero es una adaptación del método espectrofotométrico clásico de Bessey y colaboradores (1946) (ver sección XII). La especificidad de este método se basa en la destrucción selectiva del retinol libre o esterificado presente en la muestra, por irradiación con luz ultravioleta. El segundo método requiere un aparato de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para separar el retinol libre de otras sustancias, lo cual lo hace más específico (ver sección XIII). El método espectrofotométrico, sin embargo, tiene la ventaja de que su costo es menor, y además permite analizar dos a tres veces más muestras durante el mismo período de tiempo.

La selección entre uno u otro método depende pues de los propósitos del estudio y de los recursos disponibles. Mientras que el método de HPLC es indudablemente más exacto y preciso, ambos métodos son suficientemente informativos para propósitos de evaluación.

La determinación de retinol leche humana sigue las siguientes etapas de laboratorio:

1. *Saponificación.* Las muestras son tratadas con potasa alcohólica para hidrolizar los ésteres de retinol. La mayor parte de la vitamina A está en forma de ésteres en la leche, por lo que es necesario hidrolizarlos para obtener retinol libre. En el método espectrofotométrico, la saponificación también mejora la exactitud de la determinación al evitar errores debidos a diferencias en proporciones de extracción de las diferentes formas en las que aparece el retinol.
2. *Extracción.* El retinol y sus ésteres no hidrolizados son extraídos con un solvente orgánico. En la determinación espectrofotométrica se prefiere una mezcla de xileno-keroseno, mientras que en la determinación por HPLC se utiliza hexano u otro solvente de fácil evaporación.
3. *Determinación de la absorbancia.* Tanto en el método espectrofotométrico como en el de HPLC, la absorbancia del retinol a 325 nm se usa para su determinación cuantitativa
4. *Destrucción selectiva del retinol* Para asegurarse de que la absorbancia sea debida solo al retinol, esta se determina en los extractos de las muestras antes y después

de destruir selectivamente el retinol por irradiación con luz ultravioleta. El método de HPLC no requiere esta etapa, ya que previo a la medición de la absorbancia del retinol, éste se separa cromatográficamente de otras sustancias acompañantes, inclusive de sus ésteres.

B. Toma y manejo de las muestras de leche

Las muestras de leche deberían idealmente ser representativa del contenido total extraído de un pecho, que no haya sido utilizado durante por lo menos 2 horas, porque la concentración de algunos componentes de la leche, especialmente grasas y sustancias solubles en grasa como la vitamina A aumentan durante el período de amamantamiento. Sin embargo, en encuestas epidemiológicas esto es generalmente impráctico, por lo que se recomienda tomar 10 mL del pecho lleno que no ha sido utilizado durante por lo menos una hora. Es esencial que el procedimiento seguido sea claramente documentado y consistentemente seguido.

La leche puede obtenerse en forma manual o utilizando una bomba, virtiéndola dentro de frasco de 20 a 30 mL con boca ancha y tapadera de rosca. Este frasco puede ser de vidrio o de polipropileno (e.g. Nalgene). Las muestras deben protegerse de exposición al aire, la luz solar, la luz brillante y temperaturas elevadas. Se recomienda que alícuotas de cada muestra sean puestas en viales separados tan pronto como sea posible después de la recolección. Se aconseja que si las muestras van a permanecer congeladas por períodos largos de tiempo, la atmósfera arriba de la superficie de la muestra sea llenada con nitrógeno, reemplazando la atmósfera original con una corriente de este gas durante 30 segundos, después de las cuales el frasco se cierra lo mejor posible. Las muestras deben ser congeladas tan pronto como sea posible, y no descongelarse hasta el momento de su análisis. Antes de su análisis, las muestras de leche deben ser completamente homogenizadas, preferiblemente por sonificación.

XII. APLICACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO POR DESTRUCCION ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACION DE RETINOL TOTAL EN LECHE HUMANA

A pesar de que el método descrito en la sección IX fue originalmente propuesto para la determinación espectrofotométrica de retinol en suero o plasma, éste puede ser aplicado fácilmente a leche humana. El principio del método, así como el equipo, materiales y reactivos necesarios son los mismos.

Alícuotas de las muestras de leche cuidadosamente homogenizadas son tratadas y analizadas exactamente como las de suero o plasma. El tamaño de las alícuotas es igual, ya que los rangos de concentración de retinol en estos fluidos es muy similar. El cálculo de los resultados se basa en las mismas ecuaciones.

Debe notarse que este método mide vitamina A preformada total y no diferencia entre retinol libre y sus ésteres. Debido a que la leche contiene varios ésteres de retinol, la exactitud de los resultados en términos estrictos de retinol libre es un poco inferior a las de suero sanguíneo, ya que la saponificación no es completa y los residuos de ésteres no hidrolizados pueden comportarse en forma ligeramente diferente durante el paso de extracción del análisis. Esta relativa limitación, sin embargo, se ve ampliamente compensada por la gran practicabilidad y bajo costo de este método, características que lo hacen el más recomendable en encuestas epidemiológico-nutricionales para la evaluación del impacto de intervenciones con vitamina A. En efecto, para este propósito lo que interesa fundamentalmente es el contenido de retinol total en la leche materna (libre más sus ésteres) o sea su actividad de vitamina A preformada, pues existe abundante evidencia de que este parámetro refleja el estado nutricional de vitamina A de las mujeres lactantes.

XIII. DETERMINACIÓN DE RETINOL EN LECHE HUMANA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)²³

A. Referencia²⁴

B. Principio

El retinol en leche humana se encuentra en su mayor parte esterificado con ácidos grasos. El enlace éster debe ser saponificado para obtener retinol libre. El derivado de retinol conocido como acetato de 3,4-didehidroretinol, puede ser utilizado como un estándar interno, agregándose a las muestras de leche previo a la saponificación. Después de la saponificación, tanto el retinol como el didehidroretinol son extraídos y analizados por HPLC utilizando una columna de fase reversa del tipo C₁₈, y una fase móvil de metanol/agua.

C. Puntos críticos y precauciones

Se necesita un espectrofotómetro con capacidad de lectura cercana a 325 nm. Por la importancia del espectrofotómetro en cuanto a la exactitud y confiabilidad de los análisis, éste debe calibrarse frecuentemente; para ello, deben seguirse las instrucciones que generalmente se incluyen en los manuales del fabricante que vienen con el equipo, especialmente para verificar que el monocromador está bien ajustado. La calibración debe hacerse periódicamente y no sólo cuando se instala una lámpara nueva.²⁵

Una vez que el retinol se ha extraído en la fase orgánica, el análisis no debe interrumpirse.

En los casos que no se pueda obtener agua grado HPLC, ésta puede prepararse en el laboratorio con agua bidestilada, sometiéndola a desmineralización, filtrado y ebullición.

De acuerdo a la experiencia con este método en el departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad de Iowa, los resultados de dos submuestras de la misma muestra analizadas independientemente no deben apartarse de su promedio en más de 10%; en caso contrario el análisis de la muestra se repite completamente.

²³ Esta sección fue escrita por Sherry Tanumihardjo, del departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad del Estado de Iowa

²⁴ Este método se basa en el procedimiento desarrollado por S. Tanumihardjo y J.A. Olson del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad del Estado de Iowa

²⁵ La sección XIV C-1 describe un procedimiento para calibrar espectrofotómetros simples, los que comúnmente son utilizados en química clínica

D. Equipo y materiales

Agitador tipo Vortex

Balones volumétricos de 25 mL

Bulbos para aspiración con pipetas Pasteur y pipetas serológicas

Celdas de cuarzo para espectrofotómetro

Centrífuga refrigerada

Columna de fase reversa "Water Resolve" 5 μm C₁₈

Cromatógrafo líquido con detector UV

Cronómetro

Espectrofotómetro UV/Vis

Pipetas automáticas tipo Eppendorf

Pipetas graduadas serológicas

Pipetas Pasteur

Tubos de 10 mL con tapón de rosca

Tubos de ensayo de 7 mL con tapón de rosca

E. Reactivos

- 1. Etanol Absoluto p.a. ((C₂H₅OH), pureza=99.8%, PM=46.07, d=0.79 g/mL).**
- 2. 2-propanol p.a. ((CH₃CH(OH)CH₃), pureza=99.7%, PM=60.10, d=0.78 g/ml)**
- 3. Hidróxido de potasio 50:50 p/v en agua (KOH/H₂O)**
- 4. Agua purificada**
- 5. Hexano grado HPLC ((C₆H₁₄), pureza=95%, PM=86.18, d=0.66 g/ml)**
- 6. Metanol grado HPLC ((CH₃OH), pureza=100%, PM=32.04, d=0.79 g/ml)**
- 7. Dicloruro de etileno grado HPLC ((ClCH₂CH₂Cl), pureza=99.8%, PM=98.96, d=1.25 g/ml) o dicloruro de metileno grado HPLC ((CH₂Cl₂), pureza=99.9%, PM=84.94, d=1.32 g/ml).**
- 8. Nitrógeno o argón (pureza=99.5%)**

**9. Control interno de acetato de 3,4-didehidroretinol (ADR)²⁶
(C₂₂H₃₀O₂, PM=326)**

El ADR es una excelente opción para utilizar como control interno por las siguientes razones:

- a. El ADR puede agregarse a la leche antes de que empiece el análisis y exponerse a todas las etapas del proceso hasta su detección en HPLC.
- b. El ADR se encuentra como éster, y por lo tanto puede servir como un modelo para seguir la saponificación.
- c. Permitiendo la elución de sustancias de la columna de HPLC por períodos más largos de lo usual puede determinarse la eficiencia de la saponificación en cada laboratorio.
- d. El ADR es fácilmente separable y diferenciable del retinol durante el análisis de HPLC.

La solución de ADR se prepara como sigue:

Tome 10 µl de la solución patrón de ADR (35 mM en aceite de maíz) y mezcle con 25 mL de 2-propanol en un balón volumétrico. Esta es la solución “madre” de ADR.

10. Soluciones patrón de retinol

- a. Solución “concentrada” (≈ 500 µg/mL)

En un vaso de precipitar de 10 mL pese 0.050 g de retinol de la más alta pureza (PM=286.5, pureza = 70%) y disuelva con etanol absoluto.²⁷ Transfiera a un balón volumétrico de 100 mL. Lave el vaso de precipitar con varias porciones de etanol absoluto, y transfiera los lavados al balón. Agregue aproximadamente 0.002 g de BHT (3,5,-bis-(t-butil)-4-hidroxi-

26 Cantidades pequeñas de este reactivo disueltas en aceite de maíz pueden solicitarse a la Universidad del Estado de Iowa cubriendo los costos de envío.

27 Si el retinol de alta pureza no se encuentra en el mercado, este puede prepararse con los siguientes métodos: (a) Reducción del retinaldehído (que es químicamente más estable que el retinol) con borohidruro de sodio (NaBH₄); (b) saponificación del acetato de retinol con una mezcla alcohólica de hidróxido de potasio (KOH); y (c) purificación del retinol comercial en el aparato de HPLC y colectando el pico de retinol que eluye de la columna.

tolueno). Afore a 100 mL con etanol absoluto. Guarde la solución en congelación (-20°C) en un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca. La concentración de esta solución se estima por cálculo a partir de la concentración de la solución “hija”.

b. Solución “madre” ($\approx 50 \mu\text{g/mL}$)

En un balón volumétrico de 10 mL diluya 1 mL de la solución “concentrada” a 10 mL con etanol absoluto. Guárdela como se indica para la solución “concentrada” y estime la concentración de retinol a partir de la concentración de la solución “hija” de mayor concentración.

c. Soluciones “hijas” ($\approx 1-10 \mu\text{g/mL}$)

En balón volumétrico de 25 mL, diluya 5 mL de la solución “madre” a 25 mL con etanol absoluto; ésta es la solución “hija” de $10 \mu\text{g/mL}$. Diluya con etanol absoluto esta solución “hija” para obtener por lo menos 10 mL de 5 soluciones de retinol de diferente concentración dentro del rango de 1 a $10 \mu\text{g/mL}$. Guarde las soluciones “hijas” refrigeradas. Descártelas al terminar de utilizarlas.

Determine en un espectrofotómetro, la concentración de retinol de la solución hija de mayor concentración como sigue:

- i. Ajuste el cero del instrumento con etanol absoluto. Lea en triplicado la absorbancia de la solución “hija” de retinol- $10 \mu\text{g/mL}$ a 325 nm.
- ii. Divida el valor promedio de la absorbancia entre 0.1845^{28} y multiplique por el grado de pureza del reactivo (área del retinol/área total de todos los picos del cromatograma) concentración en $\mu\text{g/mL}$ de esta solución “hija”. Calcule la concentración de las otras soluciones “hijas”, dividiendo el valor obtenido entre los respectivos factores de dilución.

El nivel de retinol de las soluciones “madre” y “concentrada” en $\mu\text{g/mL}$ se obtiene multiplicando el nivel de retinol la solución “hija” de $10 \mu\text{g/mL}$ por 5 y 50, respectivamente.

28 Este valor es el coeficiente de absortividad ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$) del retinol en etanol a 325 nm

F. Procedimiento

1. Obtención de la curva de calibración

- a. En balones volumétricos de 10 mL, ponga 1.0 mL de cada solución “hija” de retinol. Lleve a volumen con 2-propanol.
- b. Filtre cada solución a través de una membrana Millipore de 45 µm. Analice cada una de las soluciones preparadas en la etapa anterior en el equipo de HPLC.
- c. Haga una curva patrón de retinol ploteando las áreas de los picos del retinol versus la cantidad de retinol inyectada (ng). Determine la mejor línea recta con una ecuación del tipo:

$$y = m \cdot x + b$$

en donde:

y = Área del pico de retinol

x = Masa inyectada de retinol (ng)

m = Pendiente ($y \cdot x$)

b = Intercepto en la ordenada

Determine la masa de retinol en las muestras por medio del área del pico ya sea directamente con la gráfica o utilizando la relación:

$$x = \frac{(y - b)}{m}$$

Se recomienda calcular esta línea de regresión cada quince días para confirmar que las condiciones analíticas permanecen invariables. Sin embargo, en cada corrida debe analizarse por lo menos un control de retinol para confirmar la validez de la curva de calibración.

2. Saponificación

- a. Pipetee 0.5 mL de la leche a analizar dentro de un tubo de centrifuga de 10 mL con tapón de rosca.
- b. Agregue 40 µL de la solución “madre” de ADR (control interno).
- c. Agregue 0.75 mL de etanol y mezcle en el agitador Vortex por 15 segundos.
- d. Agregue 0.4 mL de la solución KOH/H₂O 50:50 p/v. Tape el tubo. Mezcle en el agitador Vortex por 15 segundos.
- e. Incube en baño de agua a 45°C durante 1 hora. Mezcle en el agitador Vortex por 15 segundos cada 15 minutos.

3. Extracción

- a. Después de la reacción de saponificación, extraiga el retinol y el ADR con 1 mL de hexano. Mezcle en el agitador Vortex por 30 segundos y luego centrifugue a 2,000 rpm por 30 segundos. Usando una pipeta Pasteur, transfiera la capa orgánica superior dentro de un tubo de ensayo limpio. Repita el procedimiento de extracción con hexano dos veces más. Esto es, agregue el hexano, mezcle en el agitador Vortex y centrifugue.
- b. Junte todas las fracciones en el mismo tubo y evapore a sequedad soplando con nitrógeno o argón, dentro de una campana de laboratorio apropiada para ser usada con solventes orgánicos.
- c. Resuspenda el extracto con 100 µl del solvente apropiado (p.e. 50:50 metanol:dicloruro de etileno [o metileno]). Mezcle en el agitador Vortex por 15 segundos, centrifugue, y mantenga a temperatura baja dentro de una hielera hasta su inyección en el sistema de HPLC.

4. Cromatografía:

- a. Con una jeringa, tome 25 µl de muestra e inyéctela al sistema de HPLC bajo las condiciones analíticas especificadas. Un ejemplo es el siguiente.

Fase móvil	85% metanol/15% agua o 90% metanol/10% agua
Flujo	1.0 mL/min
Detector	UV a 335 nm ²⁹ con sensibilidad de 0.002 UA/mV
Atenuación integrador	6
Velocidad del papel	0.5 cm/min
Tiempo de elución	Retinol: 5.6 min Didehidroretinol: 4.6 min

- b. Al finalizar el trabajo del día, lave el sistema por lo menos por 15 minutos a un flujo de 1.0 mL/min con una mezcla de 50% metanol/50% dicloruro de metileno, y después con metanol al 100% por 15 minutos.

G. Cálculos

1. Determine la cantidad de retinol (ng) de la muestra inyectada utilizando la curva de calibración.
2. Divida entre la cantidad de leche utilizada (en este caso 125 µL).
3. Corrija el valor de cada muestra dividiendo entre la proporción de recuperación del sistema (ver sección XIII.H, adelante).
4. Para informar los niveles de retinol en las muestras en µg/dL, multiplique los valores estimados en el paso anterior x 100.

H. Verificación de la recuperación del método

Se sugiere el siguiente procedimiento:

1. Diluya 0.4 mL de la solución “madre” de ADR a 1 mL con 2-propanol, e inyecte en el sistema de HPLC.

²⁹ Este es un punto intermedio entre la longitud de máxima absorción del retinol, 325 nm, y la longitud de máxima absorción del didehidroretinol, 350 nm.

2. Espere a que el pico del ADR eluya (cerca de 10 minutos en una columna C₁₈ de 15 cm de largo). Dependiendo de la columna, los isómeros *cis-trans* pueden separarse. De ser así, sume el área de ambos picos; ésta es el área si el 100% del didehidroretinol fuera recuperado (*t*) después de saponificación y extracción. En una columna de fase reversa generalmente esto no sucede. Sin embargo, cada laboratorio debe verificar el comportamiento de su sistema.
3. Por aparte, agregue 40 µl de la solución “madre” de ADR sobre 0.5 mL de agua. Luego, siga todo el procedimiento desde la etapa F.1.c hasta la F.4.a. El área del pico del didehidroretinol es la cantidad extraída en el sistema (*s*).
4. Calcule la recuperación del didehidroretinol (*R*) así:

$$R = \frac{s}{t}$$

Cada muestra tendrá un valor específico para (*s*), y éste debe ser corregido dividiendo entre (*R*).

I. Variantes

Cuando se expresa la cantidad de retinol por volumen, la colección de las muestras de leche deben estar distribuidas durante todo el día, para así poder compensar por la gran variación del contenido de grasa de la leche. Si esto no fuera posible, el contenido de la grasa de la leche puede estimarse fácilmente utilizando el método del “crematocrito”. Este método es útil sólo con muestras frescas, de no ser así, tiene que emplearse un método químico para determinación de grasa.³⁰

El procedimiento del método del crematocrito es el siguiente:

1. Coloque cerca de 75 µl de leche bien mezclada dentro de tubos capilares. Selle uno de los extremos del tubo, y centrifugue en una centrifuga de hematocrito.
2. Mida la proporción del largo de la capa de crema sobre el largo total de la muestra, y determine la cantidad de grasa con referencia en una curva de calibración establecida por medio de un método químico.

30) Varios métodos químicos pueden encontrarse en Ferris, A M y Jensen R G 1984 Lipids in human milk. A review. I Sampling, determination and content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3:108-122

3. Expresa la cantidad de retinol por gramo de grasa.

XIV. CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO³¹

A. Criterios para el control de calidad

Todo método tiene sus propias características intrínsecas, las que determinan su óptimo comportamiento en las mejores condiciones operacionales del laboratorio. Esta sección trata del control sistemático de la calidad de las operaciones de laboratorio más que de la determinación de la característica intrínseca de confiabilidad de cada método en particular. Cualquier procedimiento analítico está sujeto a errores derivados de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo. Estas incluyen el “factor humano”; factores ambientales tales como la temperatura, la humedad, la exposición a la luz; y las características del equipo usado.

Las dos características de los métodos que más comúnmente son afectadas en grado importante son la *exactitud*, o sea el grado al cual los resultados representan los valores verdaderos o reales, y la *precisión*, o sea la reproducibilidad de los resultados obtenidos por los métodos bajo condiciones operacionales rutinarias.

1. Determinación de la exactitud:

Al montar un método, cada laboratorio debe confirmar la exactitud del procedimiento analítico. Idealmente ésta debe ser igual, o acercarse, a la exactitud intrínseca original del método tal como se propone en la literatura bajo óptimas condiciones operacionales. El enfoque para determinar o verificar la exactitud bajo las condiciones de rutina del laboratorio puede variar de un método a otro. La base general más común es la recuperación de una cantidad conocida del analito que se trata de determinar. En el caso del presente manual, cantidades conocidas de retinol o de palmitato de retinol se agregan a una porción de la muestra. Las muestras, con y sin el analito añadido, se someten al análisis tal como ordinariamente se lleva a cabo en el laboratorio en cuestión. La cantidad del analito que se recobra expresada como porcentaje de la cantidad añadida constituye una expresión matemática de la exactitud del método. La validez de este ensayo se incrementa si se usan concentraciones del analito que representen por lo menos las concentraciones de retinol “insuficientes”, “adecuadas” y “altas” que se espera encontrar en las muestras. Por ejemplo, en el azúcar fortificada con vitamina A, estos niveles podrían ser 5 µg/g, 15 µg/g, y 25 µg/g respectivamente.

Un enfoque alternativo indirecto para estimar la exactitud es analizar *controles certificados* preparados por centros que se especializan en la producción de los mismos, tales como el Instituto Nacional de Estándares de los Estados Unidos. Los valores que se obtengan deberían ser iguales a aquéllos indicados por el laboratorio original

³¹ D. I. Mazanegos, INCIAP, aportó significativamente a la preparación de esta sección

Una forma alternativa para determinar la exactitud es comparar los resultados obtenidos con un mismo grupo de muestras por un laboratorio de referencia. Este método es conocido como la *validación externa*. Se sugiere que un mínimo de 20 muestras, representativas de los niveles de retinol que se esperan encontrar, sean analizadas por el laboratorio en validación y por el laboratorio de referencia. Los resultados deben presentarse en una gráfica, colocando en el eje-*X* los datos de laboratorio de referencia, y en el eje-*Y* aquéllos del laboratorio que está siendo analizado. Idealmente, la pendiente de esta curva de regresión debería ser uno y el intercepto cero.

2. Determinación de la precisión

La precisión es la expresión de la reproducibilidad del método. La precisión tiene dos componentes: *variación "intraensayo"*, que es la variación aleatoria entre réplicas en un mismo ensayo o corrida; y la *variación "interensayo"*, que es aquella que ocurre entre ensayos independientes. A continuación se presentan los enfoques para determinar estos parámetros.

Variación intraensayo. Se toman tres muestras control, a tres niveles de concentración que abarquen el rango de trabajo del analito de interés ("insuficiente", "adecuado" y "alto") y se analizan en la misma corrida por lo menos 10 veces. La variación se reporta en términos del coeficiente de variación (CV) de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Media}} \times 100$$

Variación interensayos. Se toman los mismos tres controles y se analizan en duplicado o con el número de réplicas que rutinariamente se usan en el laboratorio. Se deben hacer por lo menos 10 corridas en ocasiones diferentes. La variación se reporta en términos del coeficiente de variación como en el caso anterior. Debido a que este ensayo se efectúa durante diferentes periodos de tiempo se requiere que los controles puedan preservarse sin alteración, de manera que la concentración del analito no varíe durante el periodo de tiempo que cubre el ensayo.

Error analítico total (E_a). Este es la variación que resulta del efecto combinado de las variaciones descritas anteriormente. Esta se calcula con la siguiente ecuación:

$$E_a = \frac{1}{2} \sqrt{CV_{\text{intraensayo}}^2 + CV_{\text{interensayo}}^2}$$

Por regla general, un buen método es aquel que posee un error analítico inferior al 5%, aunque en ocasiones, especialmente cuando el método es muy complejo, un error analítico del 10% puede ser aceptable. Cada laboratorio debe decidir el grado de exactitud y precisión aceptables para sus propósitos.

B. Rutinas del control de calidad

Una vez que un método ha sido inicialmente validado, la confirmación rutinaria, de su exactitud y precisión en el rango analítico de trabajo, es indispensable para garantizar la confiabilidad de los resultados. En la práctica, se sugiere hacer varias réplicas de cada muestra, por lo menos duplicados. Se aceptan los resultados sólo si los valores de las muestras analizadas no se apartan de su promedio en una magnitud mayor a dos veces la precisión intraensayo del método. En muy raras ocasiones en las que es impráctico analizar por duplicado todas las muestras, siempre debe confirmarse la reproducibilidad del trabajo analizando réplicas de algunas muestras (10% p.e), distribuidas aleatoriamente dentro de la corrida. Esta práctica debe ser excepcional, y debe aplicarse sólo cuando el número de muestras es excesivo, la cantidad disponible de cada muestra es limitada, o cuando el ensayo es muy costoso para el laboratorio.

La precisión y la exactitud de los resultados de las corridas diarias se examina incluyendo en las mismas el análisis de controles a tres niveles del analito (“insuficiente”, “adecuado”, y “alto”). La corrida entera se repite, si los valores calculados para 2 de 3 de los controles, se apartan de la media previamente determinada para esos controles en más de dos veces la desviación estándar. Si sólo se tiene disponibilidad de correr un control diario, éste debe ser el del nivel “insuficiente”, ya que la mayoría de los métodos para la determinación de retinol tratan de identificar muestras por debajo de un nivel crítico inferior.

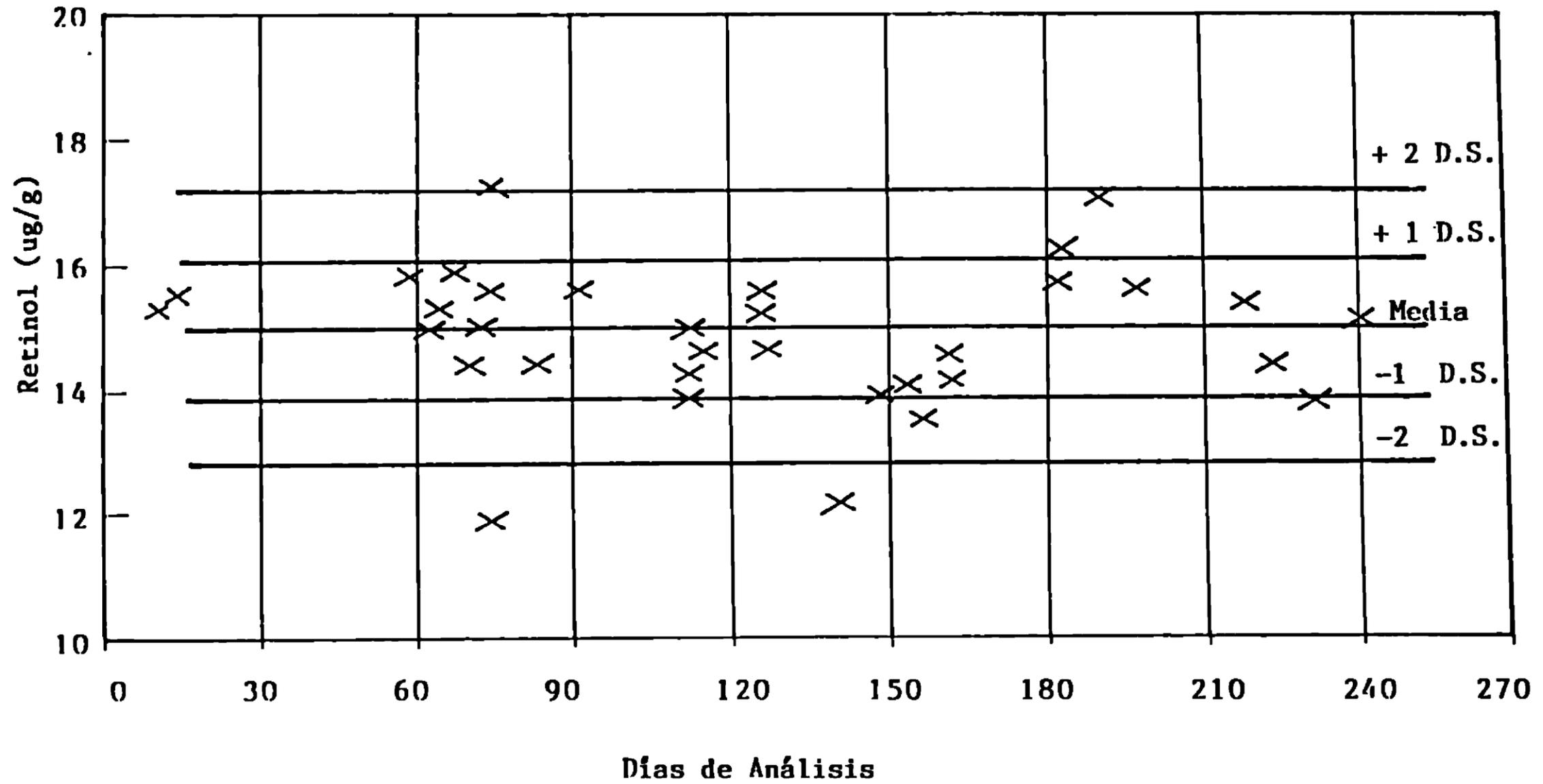
Con el propósito de llevar un registro sistemático de la calidad del trabajo, se sugiere utilizar gráficas de control de calidad, en las que la abscisa (*eje x*) sea el número de cada corrida o la fecha de realización de la misma, y la ordenada (*eje y*) sea el valor del analito calculado para los controles (ver figura 3.2). En esta gráfica, líneas paralelas al *eje x* indican la posición del valor promedio, y los valores correspondientes a una y dos desviaciones estándar a cada lado del promedio, calculadas con base en la variación interensayos de cada uno de los controles.

Si el método usa una curva de calibración con patrones, ésta debe ser obtenida idealmente para cada corrida mediante el análisis de por lo menos cinco concentraciones diferentes del analito, que abarquen todo el rango de trabajo del método. El coeficiente de correlación (r^2) de estas curvas de calibración debiera ser igual o mayor a 0.98. Las muestras que den una respuesta más alta que el patrón más concentrado de la curva deben diluirse y ser analizadas nuevamente; mientras que el resultado de aquellas muestras que sea inferior a la del patrón de menor concentración deben informarse como que tienen un nivel del analito “menor que esa concentración”. Es indebido extrapolar la curva de calibración afuera del rango experimentalmente determinado.

Finalmente, es importante recalcar que la aprobación de un método por el supervisor del laboratorio depende de que se mantengan las características esperadas del mismo a través del tiempo. Con este propósito, cada vez que se introduzcan cambios (cantidades de reactivos y

procedimientos, nuevo personal, nuevo equipo, p.e.), el método debe ser practicado lo suficiente hasta alcanzar valores aceptables de precisión y exactitud.

Figure 3.2:
EJEMPLO DE LA CINETICA DE DESTRUCCION DEL RETINOL (O PALMITATO DE RETINOL) EN UNA CAMARA DE IRRADIACION



C. Calibración del equipo

1. Calibración del espectrofotómetro

Espectrofotómetros simples, pueden usarse si previamente se calibran contra un espectrofotómetro de referencia. Para ello, debe obtenerse primero el espectro de absorción de una solución de retinol en etanol o hexano. Los espectros de ambos aparatos deben coincidir. Luego, debe obtenerse la absorbancia a la longitud de onda del pico de máxima absorción, utilizándose la misma solución de retinol en los dos aparatos. El factor de corrección (F.C.) del espectrofotómetro en calibración será:

$$F.C._{esp} = \frac{Absorbancia_{referencia}}{Absorbancia_{calibración}}$$

El rango lineal del espectrofotómetro también debe examinarse, utilizándose para ello soluciones de retinol en etanol con concentraciones entre 0.1 y 5.0 µg/mL (las absorbancias deberían estar entre 0.020 y 1.000), que pueden obtenerse haciendo diluciones apropiadas de una solución de retinol-50 µg/mL en etanol (p.e. 0.2:100, 0.5:100, 1:100, 2:100, 5:100 y 10:100). Se recomienda hacer las lecturas utilizando celdas de cuarzo estándar (3 mL).

2. Verificación de la eficiencia de la cámara de irradiación

La eficiencia de la cámara de irradiación debe ser verificada periódicamente. Si se usa diaria o muy frecuentemente, se sugiere que esta verificación se haga por lo menos cada mes, y siempre que se instalen nuevas lámparas de luz ultravioleta.

Una solución patrón de palmitato de retinol o de retinol se prepara en el solvente que se emplea para la extracción y/o dilución de las muestras, con una concentración de 5 µg/mL de retinol. La absorbancia de esta solución debe ser aproximadamente de 0.9 a 325 nm. Debe prepararse solamente la cantidad necesaria para el ensayo y protegerse de la luz directa en todo momento.

La unidad de irradiación se calibra determinando el tiempo requerido para la destrucción del retinol de la solución patrón. Dos procesos son necesarios. El primero sirve para establecer que todas las posiciones de los tubos reciben la misma intensidad de irradiación; y el segundo para determinar el tiempo óptimo de irradiación.

El primer procedimiento se lleva a cabo llenando cada posición de la gradilla de la cámara con tubos de solución patrón de retinol. Después de un tiempo fijo de irradiación (15 - 25 min, p.e.) se determina la absorbancia de cada una de las soluciones irradiadas. Si hubiera posiciones

en las cuales el retinol es destruido en menor grado, éstas deben ser marcadas y descartadas; estas posiciones están usualmente a los extremos de la gradilla.

La determinación del tiempo óptimo de irradiación se hace utilizando la misma solución patrón, midiendo por triplicado la absorbancia que queda después de diferentes periodos de irradiación; por ejemplo: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 60 minutos.

El procedimiento es el siguiente:

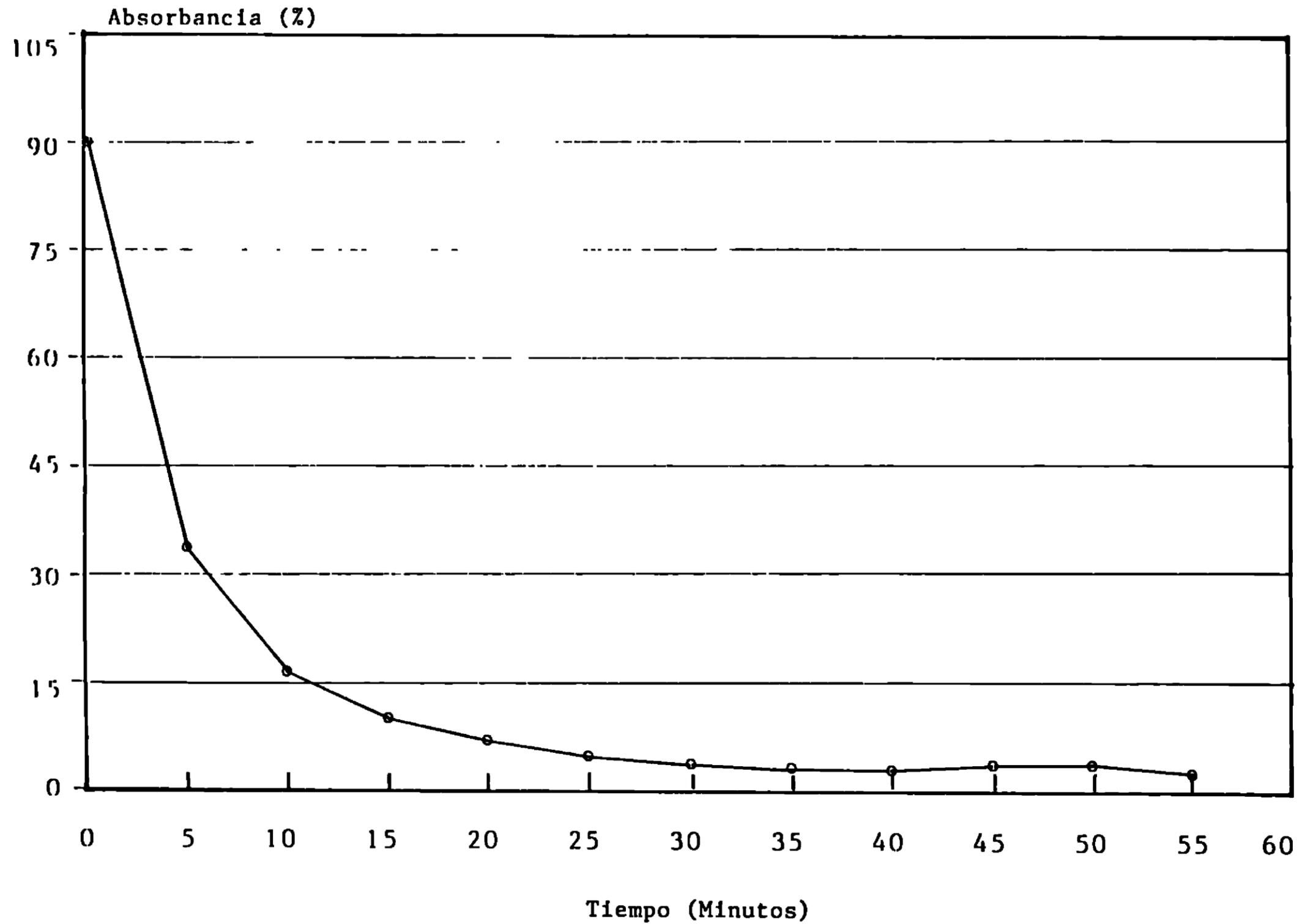
- a. Precaliente la lámpara de irradiación por lo menos 30 minutos antes de su uso.
- b. Ponga en cada tubo 1 mL de la solución patrón, e identifique tres tubos por cada periodo de tiempo, en secuencia de acuerdo a los tiempos programados de irradiación. Cuidese de que la marca de identificación quede a una altura donde no obstruya el paso de la luz ultravioleta.
- c. Cubra los tubos con tapón de teflón o, en su defecto, de goma de buena calidad (tipo tapón de “vacutainer”, p.e.). Señale con un lápiz marcador el nivel del menisco del liquido en cada tubo. Coloque los tubos en la gradilla.
- d. Coloque los 3 tubos correspondientes al control no irradiado (tiempo 0) en la oscuridad hasta el momento de su lectura.
- e. Al final de cada periodo de tiempo, retire los tubos correspondientes a ese punto y colóquelos en la obscuridad junto a los controles.
- f. Continúe la irradiación hasta completar la totalidad del ensayo.
- g. Revise el nivel del menisco en cada tubo y si éste ha bajado por evaporación (ver paso c), añada solvente al nivel marcado y mezcle el contenido. Con tubos tapados en la forma como se indicó, no debería haber evaporación.
- h. Ajuste el cero del instrumento con el solvente que haya usado para preparar los patrones. Mida la absorbancia a 325 nm de todas las soluciones irradiadas y de los controles no irradiados, utilizando las mismas celdas espectrofotométricas y condiciones en que se leen los extractos de las muestras

- i. **Trace una gráfica con los tiempos de irradiación (x) versus los promedios de la absorbancia de cada punto (y) (ver Fig 3.3).**

Se sugiere que el tiempo óptimo de irradiación sea aquel al cual 95-97% de retinol es destruido.³² Una vez determinado, dicho tiempo debe ser el usado para la irradiación de los extractos de las muestras en los métodos que aplican este sistema de irradiación. Los resultados deben corregirse por el “factor de eficiencia” o sea el porcentaje de destrucción en el tiempo que se haya fijado. Por ejemplo, del retinol si se establece que en 35 minutos se destruye el 95% y ese tiempo se aplica a los extractos, los resultados deben multiplicarse por 1.053 (100/95).

32 La irradiación no debería prolongarse más allá de este punto por tres motivos. Primero, que siendo la curva de destrucción de tendencia logarítmica, la destrucción de las últimas trazas de retinol tomaría un tiempo demasiado largo, difícil de definir y controlar exactamente. Segundo, que los extractos de muestras pueden contener sustancias que no son retinol, que absorben a 325 nm y que se destruyen durante irradiación muy prolongada afectando la especificidad y exactitud del análisis. Tercero, que nuevos compuestos interferentes que absorben a 325 nm pueden formarse durante un tiempo de irradiación muy prolongado, afectando igualmente la calidad del análisis.

Figure 3.3:
ABSORBENCIA DEL RETINOL POR TIEMPO DE IRRADIACION



XV. LECTURAS SUGERIDAS

- Arroyave G., Chichester C.O., Flores H., Glover J., Mejía L., Olson J.A., Simpson K.L., y Underwood B.A. 1982 *Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status*. Washington, D.C. Grupo Consultivo Internacional de Vitamina A (IVACG). 88 p.
- Carey N. y Garber C. 1989 Evaluation of Methods. En: Kaplan L. y Pesce A (Eds.) *Clinical chemistry. Theory, correlation and analysis*. 2a. ed. Saint Louis, Mosby Company. Capítulo 19, pp 290-310.
- Conacher H. 1990 Validation of methods used in crisis situations: task force report. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(2): 332-334.
- Cornbleet J. y Gochman N. 1979 Incorrect least squares regression coefficients in method-comparison analysis. *Clin. Chem.* 25:(3):432-438.
- Association of Official Analytical Chemists. 1988 Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(1):161-173.
- Ruig W., Stephany R. y Dijkstra J. 1989 Criteria for the detection of analytes in test samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(3):487-490.

Anexo 3.1

CONSTRUCCION DE UNA CAMARA DE IRRADIACION ULTRAVIOLETA³³

La unidad de irradiación (anexo figura 3.1a) consiste en el montaje, en una estructura de madera, de dos lámparas de “luz negra” (emisión de 350-390 nm).³⁴

Sus componentes son esencialmente una base de 70 x 21 cm sobre la cual se montan longitudinalmente y en forma equidistante dos paredes laterales de 70 x 14 cm (punto B, anexo figura 3.1a) entre sí por 7 cm. Estas paredes laterales tienen en su parte central inferior una ventana longitudinal de 60 x 4.2 cm que permite el paso de la luz emitida por las lámparas hacia los tubos de ensayo que contienen las soluciones de retinol. (punto C, anexo figura 3.1a) Cada una de estas paredes laterales tiene además en su lado interno y en sus extremos, rieles verticales para poder movilizar dentro de esta estructura básica una especie de gradilla (punto D, anexo figura 3.1a), también de madera, especialmente diseñada para colocar los tubos de ensayo. Esta gradilla consta de dos piezas de 70 x 4.9 cm. En la pieza superior se perforan dos filas de agujeros de diámetro un poco mayor de 1 cm, separados entre centro y centro por 2 cm. Los agujeros de una fila son alternos a los de la otra fila. En la pieza inferior se hacen solamente pequeñas depresiones, correspondientes a cada uno de los agujeros de la parte superior, para poder en ellos asentar la base de los tubos. Estas dos piezas están unidas entre sí, en sus cuatro extremos, por 4 pivotes que sirven además de ensamble en los rieles verticales de la estructura básica. Así, la gradilla puede colocarse o sacarse de la estructura fácilmente. El diámetro de los agujeros de la gradilla puede variarse si se usan tubos de tamaño diferente que el modelo descrito más adelante.

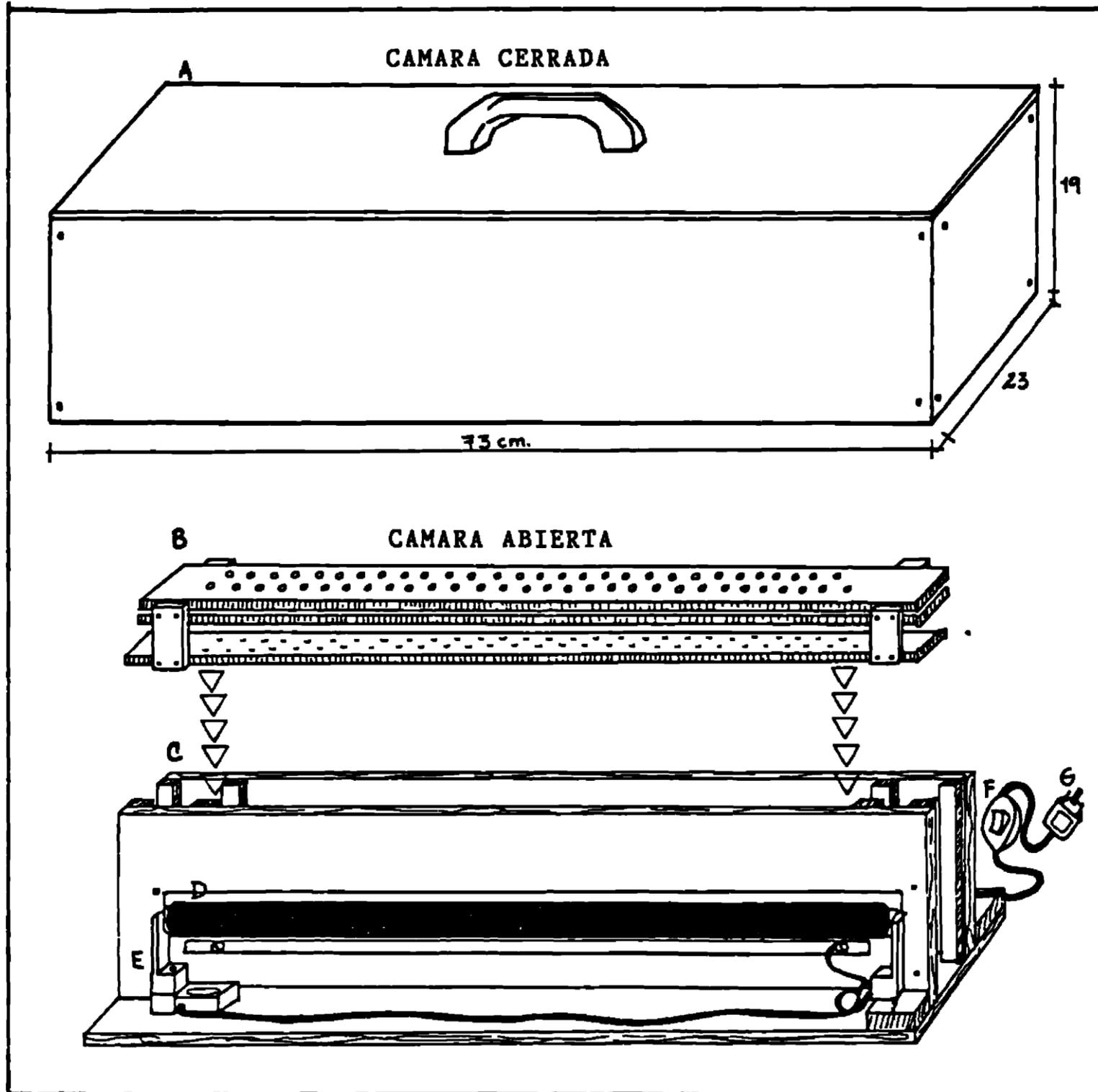
Las lámparas de luz UV se instalan a cada uno de los lados de la estructura básica por medio de los soportes y demás accesorios eléctricos necesarios para su funcionamiento (punto E, anexo figura 3.1a); éstos son sus respectivos transformadores y sus iniciadores (“starters”). Ambas lámparas son operadas simultáneamente por un interruptor colocado afuera de la unidad (punto F, anexo figura 3.1a). Todo el sistema se cubre con una tapadera (punto A, anexo figura 3.1a) también de madera a la cual se le hace una pequeña abertura en un extremo para la salida del cordón de conexión eléctrica.

La estructura de la unidad se detalla en el plano de construcción de la anexo figura 3.1b.

³³ Aparato diseñado por E. Mejía y G. Arroyave en el INCIAP

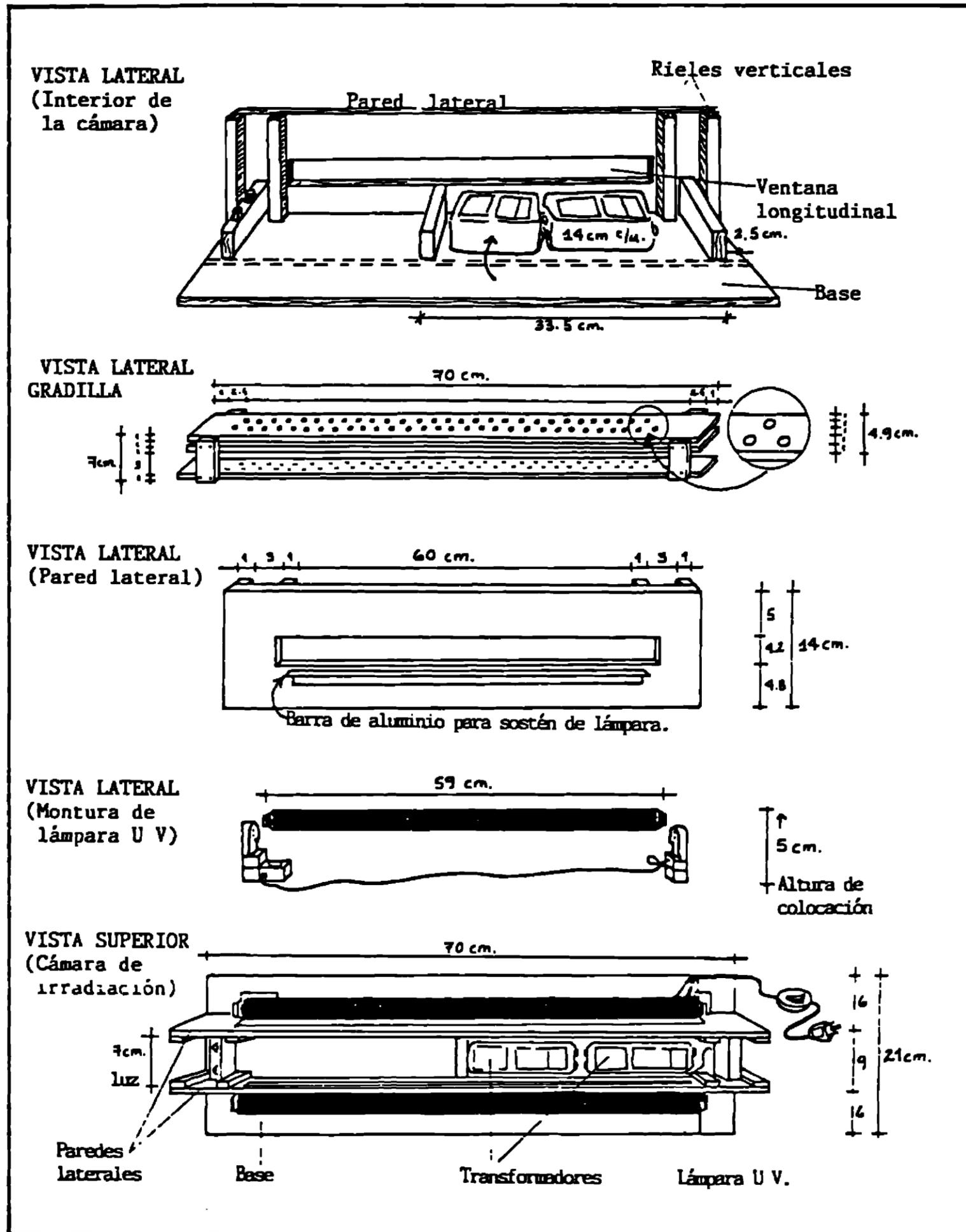
³⁴ La lámpara General Electric E-207-1248L.B de 20 vatios ha probado ser apropiada

Figura 3.1a:
CAMARA DE IRRADIACION



- A = CUBIERTA DE MADERA
- B = GRADILLA PARA TUBOS
- C = PAREDES LATERALES
- D = VENTANA LONGITUDINAL
- E = MONTURA DE LA LAMPARA ULTRAVIOLETA
- F = INTERRUPTOR

Figura 3.1b:
CAMARA DE IRRADIACION
(Plano de construcción)



Anexo 3.2

SUGERENCIAS PARA EL CUIDADO Y LAVADO DE LA CRISTALERÍA Y DE LAS CELDAS DE ESPECTROFOTOMETROS

La limpieza de la cristalería y de las celdas espectrofotométricas es un factor crítico para la confiabilidad de los análisis. Las celdas espectrofotométricas deben ser cuidadosamente lavadas y manejadas para evitar rayarlas y mancharlas. Los siguientes procedimientos deben seguirse para asegurar que tanto la cristalería como las celdas no afecten los resultados.

I. Cristalería:

- A. Recoja los residuos de muestras y reactivos desechables en recipientes apropiados para luego tratarlos en conjunto. Si son solventes orgánicos deben incinerarse o en casos específicos recobrase por destilación. Si son sustancias solubles en agua e inocuas, viértalas en el desagüe seguidas de abundante agua. Los desechos biológicos, previo a su descarte, deben descontaminarse ya sea por dilución y remojo en una solución de hipoclorito de sodio durante 24 horas o por tratamiento en autoclave a 121°C por 30 minutos.
- B. Sumerja la la cristalería en agua dentro de un recipiente de plástico. Lave cada pieza de cristalería grande con cepillo y solución al 2-3% de un detergente químico alcalino (Extrán o Teepol, p.e.). La cristalería pequeña y aquella de calibre angosto, tal como viales o pipetas, hiérvala durante 15 minutos en una solución al 5% de detergente alcalino.
- C. Enjuague con agua del chorro.
- D. Remoje en solución de ácido nítrico al 10% durante la noche. Material manchado puede ser tratado con una solución al 50% de ácido nítrico.
- E. Enjuague 20 veces con agua del chorro y 10 veces con agua destilada
- F. Seque en horno a 60°C.
- G. Almacene protegiendo de exposición al polvo o cualquier otro contaminante.

II. Celdas de espectrofotometro

- A. Al finalizar su uso, enjuáguelas en el solvente en el que estaban disueltas las muestras. Luego, enjuaguelas en una mezcla 1.2 l de agua/etanol-95%/HCl concentrado

- B. Si las celdas se usan frecuentemente, guárdelas en la mezcla anteriormente mencionada.

- C. Si las celdas no son usadas frecuentemente sáquelas de la solución anterior, deságüelas 5 veces con acetona, y séquelas soplando su interior con aire filtrado a través de algodón. *Nunca seque las celdas con calor dentro de un horno.* Guarde las celdas en un estuche cerrado.

- D. Inmediatamente antes de usar las celdas, remoje su interior con el solvente en el que están disueltas las muestras por analizar y succione el residuo con vacío.

Como una práctica rutinaria, específicamente para detectar algún problema de las celdas (sucias, manchadas, rayadas), se aconseja verificar que la lectura de absorbancia de las celdas en la posición de la muestra en contra de aquella en la posición de referencia, cuando llenas con la misma solución, es esencialmente la misma. Algunas veces podrían encontrarse pequeñas diferencias constantes entre celda y celda. En este caso, estos valores basales deben utilizarse como factores de corrección de las lecturas de absorbancia de las muestras.

Anexo 3.3

PROVEEDORES, EQUIPOS, Y MATERIALES DE LABORATORIO

I. Proveedores

A. ALDRICH

P.O. Box 355

Milwaukee, WI 53201-9358

U.S.A.

Tel. (414) 273-3850

Fax (414) 273-4979

B. BASF

6700 Ludwigshafen-Rhein, Ludwigshafen

Germany

Tel. (049) 621-600

Fax (049) 622-525

C. Beckman Instruments Inc.

2500 Harbor Boulevard

Fullerton, CA 92634

U.S.A.

Tel. (714) 521-3700

Fax (714) (213) 691-0841

D. Fisher Scientific

Headquarters

Pittsburgh 711 Forbes Avenue

Pittsburgh, PA 15219-4785

U.S.A.

Tel. (412) 562-8300

International headquarters, Latin America, Mexico and Caribbean
50 Fadem Road
Springfield, NJ 07081-3193
U.S.A.
Tel. (201) 467-6400
Fax (201) 379-7415

Europe-Mid East/Africa
New Enterprise House
St. Helen's Street
Derby, DE 1 3GY
United Kindgom
Tel. (44) 332-200755
Fax (44) 332-296546

Asia and Pacific
No. 1 101 Thomson Road
16-05 United Square
Singapore 1130
Tel. (65) 250-9766
Fax (65) 253-2286

E. Hoffman-La Roche
CH-4002, Basel
Switzerland
Tel. (061) 688-1111
Fax (061) 691-9600

F J.T. Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
U.S A
Tel (908) 859-2151
Fax (908) 857-4318

- G. Millipore Intertech
P.O. Box 10
Marlborough, MA 01752
U.S.A.
Tel. (508) 624-8400
Fax (508) 624-8630
- H. National Institute of Standards and Technology (NIST)
Bldg. 202, Room 204
Gaithersburg, MD 20899
U.S.A.
Tel. (301) 975-6776
Fax (301) 948-3730
- I. Perkin Elmer Corporation
761 Main Ave., Norwalk, CT 06859-0012
U.S.A.
Tel. (203) 762-1000
Fax (203) 762-6000
Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH
Postfach 10 11 64, D-7770 Überlingen
Germany
Tel. (075) 51-81-0
Fax (075) 51-1612
- Perkin-Elmer Ltd.
Post Office Lane, Beaconsfield, Bucks HP9 1QA
England
Tel. (0494) 676161
Fax (0494) 679333
- J Sarstedt
P O. Box 468
Newton, NC 28658-0468
U.S A
Tel (704) 465-4000
Fax (704) 465-4003

K. Sigma Chemical Company
P.O. Box 14508
St. Louis, MO 63178-9916
U.S.A.
Tel. (314) 771-5750
Fax (314) 771-5757

L. VARIAN
Varian Associates
Parts and supplies center
220 Humboldt Court
Sunnyvale, CA 94089
U.S.A.
Tel. (408) 734-5370
Fax (408) 744-0261

II. Equipos (Ejemplos)

1. Espectrofotómetro UV/VIS, VARIAN DMS-100S o Perkin Elmer Lamda 3B
2. Cromatógrafo Líquido (HPLC), Varian Chromatography 5500 con detector UV. Este incluye un Autosampler Vista 9090, interfase Varian IIM-A, computadora DS-650, e impresora HP Thinkjet.
3. Columna para HPLC Micropak Column Sp-18-5 of 150 x 4 (DI) mm (Varian 03-912042.42)
5. Tubos de ensayo 10 x 75 mm. Kimble KG-33
6. Celdas enmascaradas para espectrofotómetro. Beckman, Product 533043.

III. Reactivos (Ejemplos de proveedores con número de catálogo)

1. *Determinación espectrofotométrica de retinol en premezcla*
2-propanol (p.a.) Merck Art. 9634

2. *Determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada*
Etanol absoluto (p.a.). Merck Art. 983.25
Hexano (p.a.). Sigma Art. H-9379
Hidroxido de sodio. Sigma S-0899

3. *Determinación colorimétrica de retinol en azúcar fortificada*
Acido tricloroacético. Merck No. 1839
Dichlorometano. Merck No. 1593
Sulfato de cobre. Fisher Scientific Company Art. No. 493

4. *Peróxidos in aceite*
Acido acético glacial. Sigma Art. A-0808
Cloroformo, USP. Aldrich 31,998-8
Almidón (p.a.). Merck Art. 1252
Tiosulfato de sodio (p.a.). Merck Art. 6516
Yoduro de potasio. Merck Art. 5043 KI
Acido clorhídrico concentrado. Sigma Art. H-7020
Dicromato de potasio. Sigma Art. P-6435

5. *Determinación espectrofotométrica de retinol en sangre y leche por destrucción ultravioleta*
Etanol absoluto (p.a.). Merck Art. 983.25
Hidróxido de potasio. Aldrich Art. 30,656-8
Keroseno desodorizado. J.T. Baker Art. P339-00
Xileno (p.a.). J.T. Baker Art 9490-03

6. *Determinación de retinol en sangre y leche por HPLC*
Etanol absoluto (p.a.). Merck Art. 983.25
2-propanol (p.a.) Merck Art. 9634
Hexano (grado HPLC). J.T. Baker Art. 9303-3
Metanol (grado HPLC). J.T. Baker Art. 9093
Dicloruro de etileno (grado HPLC). Sigma-Aldrich Art. 27,056-3, o dicloruro de metileno (grado HPLC) Sigma-Aldrich Art 27,057-1.
Acetate de retinol Sigma Art. R-3513
BHT Sigma Art B-1378
Retinol Sigma Art R-7632

7. *Cámara de irradiación*

Lámparas de irradiación. General Electric F20 T 12 BLB