

## DETERMINACIÓN DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) EN BIENESTARINA CRUDA

*Doris Mabel Gartner C., Patricia Restrepo\**

Recibido marzo 3/97 - Aceptado septiembre 9/97

**Keywords:** vitamin A, HPLC, validation, flour.

### RESUMEN

En el presente trabajo se valida una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) para la determinación y cuantificación de la vitamina A en Bienestarina cruda (mezcla alimenticia infantil producida por el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, ICBF).

En primer lugar se lleva a cabo la validación del método analítico, mediante el uso de patrones de concentración conocida de palmitato de vitamina A, para lo cual se determina la linealidad, sensibilidad (límites de detección y cuantificación), la precisión y la exactitud del método.

En segundo lugar se determinan las mejores condiciones de extracción de la vitamina, como son peso de la muestra, uso de antioxidante y porcentaje en peso de éste, adición de  $\alpha$ -amilasa; unidades de actividad en relación al peso de muestra, temperatura y tiempo de actividad enzimática.

Finalmente se comparan dos métodos de extracción: el método de extracción líquido-líquido (utilizado rutina-

riamente en el Laboratorio del ICBF) con el método de extracción sólido-líquido usando columnas Lichrolut.

Todas las variables son estadísticamente evaluadas con un análisis de varianza de una sola vía y con la prueba de Duncan.

El método utilizado para la determinación por CLAE de vitamina A, es lineal entre 1,75 y 8,50 UI, sensible (con un límite de detección  $2,73 \times 10^{-5}$  UI) y como límite de cuantificación 1,68UI), preciso y exacto. Para la extracción de la vitamina A de Bienestarina, las mejores condiciones encontradas son: 10g de muestra, 5,0 o 10% de hidroquinona, 2,0 unidades de actividad (UA) de  $\alpha$ -amilasa/g de muestra, 45 °C y 60 minutos.

La extracción sólido-líquido es más exacta, rápida, menos tóxica y con mayor poder de recuperación que el método de extracción líquido-líquido.

### ABSTRACT

In the present work is validated of the HPLC (High performance Liquid Chromatography) for determination of vitamin A in special flour (Bienestarina) produced by Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) as food for Children.

In first place was used a commercial standard of vitamin A (palmitate) of known concentration for validation of method: linearity, the sensibility, the precision and exactness.

\*Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490. Santafé de Bogotá, Colombia.

In second place was studied the improve conditions of vitamin A extraction; of the sample: the best weight of sample, the best percentage of antioxidant, units of activity of  $\alpha$ -amilase, as well as the temperature and best time of enzymatic activity.

Finally, two methods of extraction were compared: the extraction liquid-liquid with ethyl ether (method used of routine in the laboratory of ICBF) and the method of extraction solid-liquid used the Lichrolut columns. In both methods were evaluated the precision, exactness and the percentage of recuperation.

All the variables were statistically evaluated with a variance analysis in one way and with Duncan test.

It was determined that HPLC method for the cuantification of vitamin A, was linear between 1.75 UI and 8.5 UI, sensitive (detection limit of  $2.73 \times 10^{-5}$  UI, cuantification limit of 1.68 UI), precise and exact. It should to use 10g of sample, 5-10% of hidroquinone in relationship to the weight of sample, as for the parameters of enzymatic activity: 2.0 UA (units of enzymatic activity)/g of sample, 45 °C and 60 minutes. The extraction with Lichrolut is more exact, rapid, fewer toxic and has more vitamin A recuperation that method of liquid-liquid extraction.

## INTRODUCCIÓN

En 1975 el Instituto de Bienestar Familiar (ICBF) presentó una formulación la cual dio a conocer con el nombre de **Bienestarina**. Ésta es catalogada como una de las mejores mezclas alimenticias, definiéndose como un alimento de alto valor nutricional, con una formulación técnicamente planeada que aporta proteína con un balance adecuado de aminoácidos esenciales, contribuyendo también con los requerimientos de calorías, minerales y vi-

taminas como tiamina, riboflavina, niacina y vitamina A (1). El ICBF produce dos tipos de Bienestarina: la cruda que es el resultado de la mezcla de las materias primas sin tratamiento térmico y la precocida, la cual es sometida a un proceso térmico con el fin de disminuir la carga microbiológica y prolongar la vida útil del producto.

La vitamina A ha sido determinada utilizando métodos biológicos con bioensayos que miden la actividad del retinol en los alimentos de origen animal y métodos fisicoquímicos que miden los carotenoides en términos de vitamina A sin determinar la potencia biológica (3).

Estos procedimientos utilizan métodos de extracción seguidos por una saponificación y por métodos físicos para separar pigmentos. El método de cuantificación utilizado se basa en la absorción de luz a 620 nm por el complejo formado en la reacción de Carr-price con la vitamina (7), técnica utilizada en el ICBF. La reacción es rápida y debe leerse antes de 5 segundos para impedir lecturas inexactas, por la pérdida de color del complejo formado; el reactivo utilizado en este método (cloruro de antimonio) es altamente corrosivo. Además los volúmenes de éter etílico empleados para la extracción de vitamina A, resultan tóxicos para quien realiza el procedimiento.

Por la importancia de la vitamina A en la nutrición de los niños y por la técnica utilizada para su determinación, se hace necesario desarrollar técnicas rápidas, reproducibles y sensibles, que evalúen la calidad nutricional de la Bienestarina.

La cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) es una técnica rápida, reproducible y cuantitativamente sensible para el análisis de carotenos y de retinol en alimentos compuestos por matrices sencillas como jugos de frutas (4,5), y de algunas matrices a

base de almidón como alimentos infantiles (9). En este método se utilizan diferentes columnas y solventes, identificando la vitamina por el tiempo de retención y cuantificándola en forma más rápida y precisa que otros procedimientos utilizados para la determinación de vitamina A.

Por las anteriores razones este trabajo tiene como objetivo principal establecer las técnicas de extracción y determinación por CLAE de la vitamina A en Bienestarina cruda, que es una matriz muy compleja por su composición y de la que no se conocen reportes bibliográficos de la extracción ni determinación cromatográfica de la vitamina.

## METODOLOGÍA

### Puesta a punto del método analítico.

#### Condiciones cromatográficas del estudio.

Las condiciones cromatográficas utilizadas (4), para la validación del método analítico son:

- Cromatógrafo líquido Merck-Hitachi.
- Fase estacionaria: silicagel (activada, 60:5 mm) de 12.5 cm de longitud y 0.4 cm de diámetro int.
- Fase móvil: n-Hexano-isopropanol (98 : 2).
- Flujo de la fase móvil: 0.5 mL/min.
- Detector: UV (326 nm).
- Volumen de inyección: 20µL.
- Atenuación 4.

Estas condiciones se mantienen constantes durante todo el estudio.

#### Determinación de la sensibilidad y la linealidad.

Con un patrón de palmitato de retinol (que tiene el mismo comportamiento cromatográfico de la vitamina A) de 1'800.000 UI (SIGMA) se prepa-

ra una curva de calibración con puntos desde 18 UI diluyéndose sucesivamente a la mitad hasta cuando el área del pico corresponda al doble del ruido (se utiliza la mayor sensibilidad del equipo). Cada uno de los puntos se pasa 10 veces, para determinar el área en cada concentración, se determinan además la media, la desviación estándar, el límite superior e inferior de confianza para cada concentración y a partir de estos datos la **sensibilidad** del método mediante el límite de detección y de cuantificación (4) y la **linealidad** mediante el cálculo de los límites de confianza inferior y superior del total del gráfico, el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación, entre los límites establecidos.

#### Determinación de la precisión y la exactitud del método.

Un patrón de concentración 4.5 UI correspondiente al punto medio de la porción lineal de la curva, se pasa por el equipo 19 veces y se determinan la media y los límites de confianza para los datos obtenidos de la medida del área. La **precisión** se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RSD), evaluando la dispersión de datos obtenidos con el estándar de 4.5 UI en relación al valor medio. La **exactitud** se expresa matemáticamente como el porcentaje del valor medio de los datos obtenidos en relación al valor verdadero, además se aplica un ensayo (t) de student a un nivel de 95% de confianza para encontrar si existen diferencias significativas entre el porcentaje obtenido experimentalmente y el 100%.

#### **Puesta a punto del método de extracción de la vitamina A de la Bienestarina.**

Debido a que la Bienestarina es un alimento con una matriz compleja y no existen reportes bibliográficos de la extracción de la vitamina de dicho ali-

mento, es necesario poner a punto un método de extracción que permita obtener la vitamina, en un nivel de concentración que esté dentro del rango lineal del método analítico, para lo cual se estudian tres diferentes pesos de muestra inicial de Bienestarina: 5g, 10g, 15g; se estudia el uso de hidroquinona como antioxidante al 5, 10 y 15% y la adición de  $\alpha$ -amilasa (taca diastasa, Parke Davis and Co.) con el fin de degradar los polisacáridos presentes en la muestra que absorben la vitamina e impiden su extracción cuantitativa; se estudian cuatro niveles de enzima: 0.1UA, 1.0UA, 2.0UA, y 5.0UA por gramo de muestra; tres tiempos: 10, 30, y 60 minutos y cuatro temperaturas de actividad enzimática: 20, 37, 45 y 60 °C. Cada uno de los niveles, de cada variable se estudia dejando constantes los demás parámetros en los niveles máximos estudiados, excepto la temperatura que se mantiene constante a 37 °C. Cada determinación se realiza mínimo por triplicado y se evalúa estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía, para encontrar si existe diferencia significativa entre las determinaciones. En caso de encontrar diferencia significativa, se lleva a cabo la prueba de Duncan para encontrar la mínima diferencia significativa (dms) entre los tratamientos estudiados.

Finalmente una vez deabsorbida la vitamina de la matriz de polisacáridos se realiza una saponificación con el fin de separar posteriormente, mediante extracción líquido-líquido o sólido-líquido, la vitamina A en forma de alcohol de los lípidos saponificables presentes en la Bienestarina. La saponificación se lleva a cabo con KOH alcohólico al 1%, a ebullición durante una hora.

#### Extracción líquido-líquido y sólido-líquido.

Para separar la vitamina A de los lípidos saponificables, se comparan los métodos de extracción con éter y en

columnas de sílica gel (Lichrolut marca Merck); en la extracción con éter se realizan cinco extracciones; el extracto etéreo es lavado con agua hasta pH neutro y se seca con sulfato de sodio anhidro. La mezcla se solubiliza en hexano para ser inyectada al cromatógrafo.

En la extracción sólido-líquido se utilizan columnas de silicagel de 1 cm<sup>3</sup> de fase estacionaria y una capacidad total de 3 mL. Una vez saponificada la muestra se realiza una extracción con 10 mL de hexano, el total del extracto obtenido se pasa por la columna de sílica, previamente lavada con 2 mL de n-hexano, la vitamina es eluida del cartucho con 2 mL de una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (1:1) y este extracto es sometido a análisis por CLAE.

#### Determinación de la precisión y exactitud del sistema.

Con el fin de validar el sistema y comparar los métodos de extracción de la vitamina A de la Bienestarina, se prepara un placebo de Bienestarina cruda, al que se le adiciona una premezcla de vitaminas y minerales que aportan 2000 UI de palmitato de retinol por cada 100g de muestra. Se realizan 10 determinaciones de la extracción con éter y 10 determinaciones de la extracción sólido-líquido, teniendo en cuenta los parámetros ajustados de peso de muestra, peso de antioxidante y las diferentes variables enzimáticas. Se calcula la media poblacional, la desviación estándar, la **precisión** como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación y la **exactitud** como el porcentaje promedio de recuperación, su desviación estándar y se aplica una prueba (t), para cada uno de los métodos de extracción.

#### Comparación de los métodos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido.

Para conocer la diferencia de los métodos de extracción y cómo afectan

los niveles de recuperación de la vitamina A en Bienestarina cruda se realizan por triplicado, en una muestra de Bienestarina de la Planta de Paipa los dos métodos de extracción estudiados; se analiza la vitamina A por CLAE y se realiza un análisis de varianza de los resultados obtenidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Puesta a punto del método analítico.

La validación del método se realiza para confirmar y documentar que los resultados del análisis de vitamina A por CLAE, en las condiciones cromatográficas mencionadas en la metodología son confiables.

### Determinación de la linealidad y la sensibilidad.

La determinación de vitamina A por CLAE resulta ser un método lineal entre 1.75 y 8.50 UI, obteniéndose una

recta con un coeficiente de correlación de 0.997 existiendo una alta correlación entre la concentración de vitamina A y la respuesta del método de detección, con una pendiente de  $4.93 \times 10^{-5}$  y un intercepto de 0.54 UI.

La determinación de sensibilidad del método muestra que posee un límite de detección de  $2.73 \times 10^{-5}$  UI y un límite de cuantificación de 1.68 UI.

### Determinación de la precisión y la exactitud del método.

Las tablas 1 y 2 muestran, respectivamente, los resultados obtenidos para determinar la precisión y la exactitud del método analítico aplicado.

Como se muestra en la tabla 1 el RSD o coeficiente de variación es un número menor al determinado por el criterio de aceptación confirmando la precisión del método. En la tabla 2 se muestra que el porcentaje de recupera-

Tabla 1. Precisión del método de determinación de vitamina A por CLAE.

Parámetros para evaluar la precisión	
N	19
Media	5.21
Desviación estándar	$1.21 \times 10^{-4}$
RSD	2.33
Criterio de aceptación	2.77 (4)
Intervalo de confianza $p = 0.05$	$5.00 \times 10^{-3} / 5.42 \times 10^{-3}$

Tabla 2. Exactitud del método de determinación de vitamina A por CLAE.

Parámetros para evaluar la exactitud	
N	19
% de recuperación	104.22
Desviación estándar	9.06
RSD	8.69
t-calculado	2.11
t-tabulado	2.10

ción medio es mayor al 100%, es decir los valores que se obtiene de vitamina A dan 4.5 UI o superiores, probablemente debido a pequeños cambios en los valores del área obtenida bajo la curva de los picos de vitamina A, además el t-calculado es igual al t-tabulado demostrando este resultado que el método es exacto.

#### Puesta a punto del método de preparación de la muestra.

##### Peso de muestra.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos al analizar la vitamina A obtenida a partir de los tres niveles diferentes de peso de Bienestarina.

La mayor recuperación de vitamina A se obtiene cuando se utilizan 5 o 10 g de muestra; cuando se emplean 15 g la recuperación es baja debido a que esta cantidad de muestra dificulta su manejo, presentándose pérdidas durante la extracción. Para el desarrollo de la técnica se decide emplear 10 g por que la cantidad de muestra es de fácil manejo y es además representativa en el análisis de alimentos. No obstante, en algunos casos cuando haya poca cantidad de muestra, se pueden utilizar 5 g.

La tabla 3 muestra los resultados del análisis estadístico, donde el F calculado (225) es mayor que el F tabula-

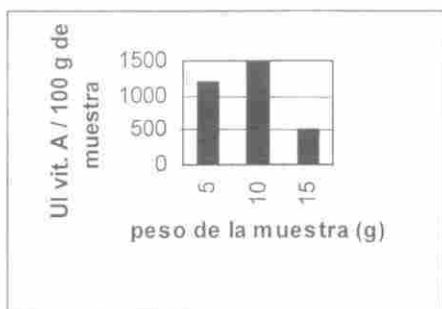


Figura 1. Recuperación de vitamina A de acuerdo al peso de Bienestarina.

Tabla 3. Prueba de Duncan para el peso de muestra.

Peso de muestra (g)	peso de muestra (g)	P. Duncan, $p=0,05$
5	15	Hay dms
5	10	No hay dms
10	15	Hay dms

do (4.46), por lo tanto hay diferencia significativa entre los diferentes pesos de muestra.

##### Porcentaje de antioxidante.

Se utiliza hidroquinona como antioxidante, con el fin de disminuir las pérdidas de vitamina A por oxidación durante el proceso de extracción por contacto con aire o luz o cuando se realiza la evaporación del solvente.

La figura 2 y la tabla 4 muestran los resultados obtenidos al utilizar tres niveles de antioxidante.

El análisis de varianza muestra que el F calculado es mayor que F tabulado ( $214 > 4.46$ ), lo que significa que existe diferencia entre los diferentes porcentajes de antioxidante utilizados. Los resultados obtenidos muestran que en-

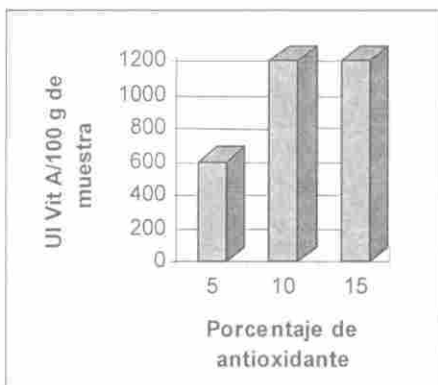


Figura 2. Recuperación de vitamina A con relación al porcentaje de antioxidante.

tre 10 y 15% de antioxidante no existe diferencia significativa, lo que si ocurre entre 5 y 10% y 5 y 15%. Por esta razón se pueden utilizar tanto 10 como 15% de antioxidante.

#### Puesta a punto de la actividad de $\alpha$ -amilasa.

Las figuras 3, 4 y 5 y la tabla 5, muestran, respectivamente, los resultados obtenidos del estudio de los diferentes niveles de unidades de enzima, tiempo y temperaturas de actividad enzimática.

La figura 3 muestra cómo la mayor recuperación de vitamina A se obtiene al utilizar 2.0 UA/g de Bienestarina. Con unidades de actividad menores, la recuperación de vitamina A es poca por que la cantidad de carbohidrato presente supera la capacidad de hidrólisis de la  $\alpha$ -amilasa y a unidades de actividad enzimática mayores, los productos de hidrólisis de los polisacáridos presentes en la Bienestarina, producen inhibición competitiva de la actividad enzimática. El análisis estadístico muestra un F calculado (66) mayor que el F tabulado (3.98), lo que significa que hay diferencia significativa entre los tratamientos utilizados para encontrar las UA que facilitan la recuperación de la mayor cantidad de vitamina A. La prueba de Duncan, tabla 4, mues-

tra que existe diferencia significativa entre todos los tratamientos estudiados y se establece que se deben utilizar 2.0 UA /g de Bienestarina porque se obtiene la mayor recuperación de vitamina A.

Los resultados para las diferentes temperaturas ensayadas se muestran en la figura 4 y la tabla 5. La mayor recuperación de vitamina A se obtiene al realizar el ensayo con 45 °C; con temperaturas menores se presenta una disminución en la velocidad de reacción y con 60 °C hay probablemente alguna leve alteración a nivel del sitio activo de la enzima, disminuyendo su actividad. El tratamiento estadístico muestra que existe diferencia entre las temperaturas ensayadas ya que el F calculado (24) es mayor que el F tabulado (3.98) y esta diferencia se establece según la prueba de Duncan, entre todos los tratamientos excepto a 20 °C y 37 °C donde la actividad enzimática es muy baja y entre 45 °C y 60 °C donde se obtiene la mayor actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasa, pero se decide utilizar 45 °C puesto que garantiza una mayor recuperación de vitamina A, se produce un ahorro de energía y se hace menos vulnerable la reacción a la contaminación microbiana.

La figura 5 muestra que con 60 minutos de actividad enzimática se recupera la mayor cantidad de vitamina A

**Tabla 4. Prueba de Duncan para las Unidades de Actividad, temperatura y tiempo de actividad de  $\alpha$ -amilasa.**

UA Enzimática	UA Enzimática	P. Duncan	Temperatura °C	Temperatura °C	P. Duncan	Tiempo (min)	Tiempo (min)	P. Duncan
0.1	1.0	Hay dms	20	37	No hay dms	10	30	Hay dms
0.1	2.0	Hay dms	20	45	Hay dms			
0.1	5.0	Hay dms	20	60	Hay dms	10	60	Hay dms
1.0	2.0	Hay dms	37	45	Hay dms			
1.0	5.0	Hay dms	37	60	Hay dms	30	60	Hay dms
2.0	5.0	Hay dms	45	60	No hay dms			

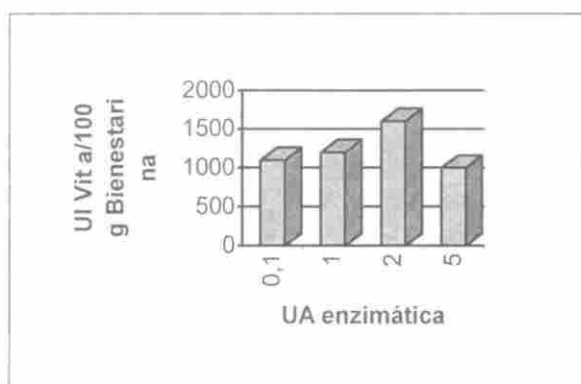


Figura 3. Vitamina A recuperada de acuerdo a las UA de  $\alpha$ -amilasa adicionadas a la Bienestarina.

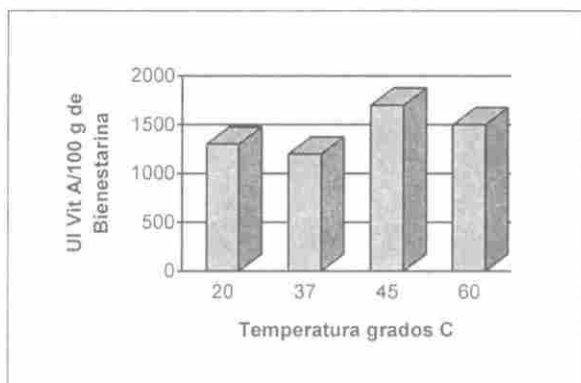


Figura 4. Recuperación de vitamina A con diferentes temperaturas de actividad de  $\alpha$ -amilasa.

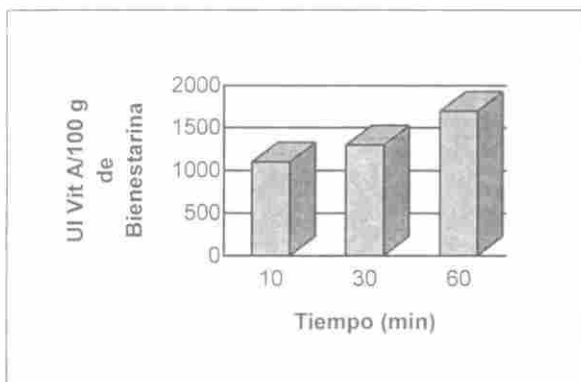


Figura 5. Vitamina A recuperada a diferentes tiempos de actividad de  $\alpha$ -amilasa.



de la muestra de Bienestarina, y que de acuerdo al análisis estadístico el F calculado (6.047) es mayor al F tabulado (4.46) y existe diferencia significativa entre los tiempos estudiados. Esta diferencia, según se muestra en la tabla 5, existe entre los tres tiempos estudiados; a 10 y 30 minutos la enzima no alcanza a actuar en forma eficiente, mientras que a 60 minutos se encuentra la mayor recuperación de vitamina; es probable que a tiempos mayores la actividad de la enzima aumente, pero a este tiempo se obtienen mejores resultados que los determinados por extracción directa de la vitamina a partir de la muestra, por el método líquido-líquido con éter y posterior cuantificación por Carr-price. Se recomienda ensayar tiempos mayores teniendo en cuenta que el método de extracción sea aplicable para análisis de rutina.

#### Puesta a punto del método de extracción.

El proceso de extracción se realiza para separar la vitamina A de los demás componentes de la matriz alimenticia, aprovechando sus características de ser soluble en solventes orgánicos

y no saponificable. La extracción se debe hacer después de la saponificación y en este caso se realiza con cinco lavados sucesivos con éter; los resultados obtenidos del proceso se reportan en la tabla 5 donde se muestra la precisión del sistema y en la tabla 6 la exactitud del mismo.

Comparando los resultados obtenidos en el RSD o coeficiente de variación con el criterio de aceptación dado por las tablas estadísticas (4), este valor es mayor, lo que hace el método de extracción con éter **no preciso**; los valores obtenidos en UI de vitamina A se acercan entre sí, pero se alejan del valor medio. Con respecto a la exactitud, el tratamiento estadístico de los resultados muestra que al comparar el t-calculado con el t-tabulado el sistema de extracción con éter es **no exacto** y sólo se recupera un 51.96% a partir del placebo de 2000 UI.

Debido a los resultados obtenidos en la extracción con éter y a la contaminación que esta metodología produce, se decide ensayar el método de extracción de la vitamina A utilizando columnas Lichrolut de silicagel; los re-

Tabla 5. Precisión de la extracción de la de vitamina A de Bienestarina con éter.

	Precisión
N	10
Media	1111.34 UI
Desviación estándar	178.24
RSD	16.0
Criterio de aceptación	1.9
Intervalo de confianza, p = 0.05	983.85-1238.83UI

Tabla 6. Exactitud de la extracción de vitamina A de Bienestarina con éter.

	Exactitud
N	10
Porcentaje (%) de recuperación medio	51.96
Desviación estándar	18.20
RSD	35.03
t-calculado	4.33
t-tabulado	2.26

sultados del análisis estadístico del estudio de este sistema se muestran en las tablas 7 y 8.

El obtener un valor de RSD mayor al criterio de aceptación, hace de la extracción con columnas Lichrolut de sílicagel un sistema **no preciso** para la extracción de vitamina A de Bienestarina Cruda; este resultado se puede deber al bajo número de replicaciones y a la poca experiencia en el manejo de las columnas, no se efectúa una buena activación de la columna, por lo que sería recomendable realizar un mayor número de determinaciones mejorando el sistema de activación de la columna y la elución de la vitamina de ésta.

Los resultados de la exactitud del sistema de extracción con columnas de Lichrolut de sílicagel muestran que es un sistema **exacto**, con un porcentaje de recuperación del 80% mucho mayor que el obtenido en el sistema de recuperación con éter; es importante por tanto implantar este sistema de extracción, porque además de ser exacto, aporta beneficios de tipo económico y ambiental al reducir la cantidad de éter utiliza-

do en el proceso, el cual es altamente tóxico para quien realiza la técnica.

## CONCLUSIONES

-La CLAE reúne los requerimientos analíticos de: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud; por tal razón los resultados producidos por CLAE para el análisis de vitamina A son confiables.

-Se encuentra que las mejores condiciones para la extracción de vitamina A de Bienestarina cruda son: 10g de muestra; adicionar 15% de hidroquinona como antioxidante; 2.0 UA de  $\alpha$ -amilasa por gramo de muestra, a 45 °C, durante 60 minutos.

-El método de extracción líquido-líquido con éter de la vitamina A no cumple los requerimientos de precisión y exactitud, además que sólo permite la recuperación del 50% de la vitamina presente en la Bienestarina.

-La extracción sólido-líquido de la vitamina A utilizando columnas Lichro-

Tabla 7. Precisión de la extracción de vitamina A de Bienestarina con sílica.

	Precisión
N	10
Media	1628.5 UI.
Desviación estándar	163.5
RSD	10
Criterio de aceptación	1.9
Intervalo de confianza, $p = 0.05$	1223,06-2003.32

Tabla 8. Exactitud de la extracción de vitamina A de Bienestarina con sílica.

	Exactitud
N	10
Porcentaje (%) de recuperación medio	80
Desviación estándar	21.64
RSD	27.0
t-calculado	1.28
t-tabulado	4.303

lut de silicagel es un sistema exacto y permite una recuperación mayor del 80% de la vitamina a partir de la Bienestarina cruda.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y a MERCK Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ICBF, Subdirección de Nutrición, División de Investigaciones Nutricionales. *Informe sobre Desarrollo, Valor Nutricional, Especificaciones Técnicas y Producción de Bienestarina*. 1975, 23.
2. International Vitamin A Consultative Group (IVACG). *Methodology Biochemical for the Assessment of Carotenes*. 1987, 2-10.
3. The Association of Vitamin Chemist, Inc. *Methods of Vitamin Assay*. Interscience Publishers, N.Y. 1966, 63-79.
4. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S. I.; LABA, R. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. MERCK. 1992.
5. SKOOG, A. L.; JAMES, J. *Análisis Instrumental*. Mac Graw Hill. España. 1994.
6. ROCHE. *Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feed*. 1988.
7. MACRAE R. *HPLC in Food Analysis*. Academic Press, Inc. N.Y. 1982, 187-196.
8. MERCK. *Adsorbex, Application Notes. Extraction of Vitamin A,D,E from Feeds*. 1990.
9. *Journal of Micronutrient Analysis*. 1988. 4, 250-283.