

059826

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE FARMACIA



METODOS DE VALORACION DE LA VITAMINA "C"

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

MARIA ELBA GRANADOS DE VELASQUEZ

PREVIA OPCION AL TITULO DE
DOCTOR EN QUIMICA Y FARMACIA

SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

JUNIO DE 1972

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

Dr. Rafael Menjivar.

SECRETARIO GENERAL:

Dr. Miguel Angel Sáenz Varela.

FACULTAD DE FARMACIA

DECANO:

Dr. Raúl Arévalo Alvarez.

SECRETARIO:

Dra. Amelia R. de Cortés.

47.74
448.
1972
=cc.QQ
C.2

PRIMER EXAMEN PRIVADO DE DOCTORAMIENTO:

Dra. Rosa Hernández de Díaz.

Dr. Raúl Arévalo Alvarez.

Dra. Rosa María P. de Rivera.

SEGUNDO EXAMEN PRIVADO DE DOCTORAMIENTO:

Dr. José Mauricio Alvarez C.

Dra. Hilda Mercedes P. de Novoa.

Dr. Pedro José Rosales C.

JURADO CALIFICADOR DE TESIS:

Dra. Lilian Aguilar de Fernández.

Dra. Gloria Gómez.

Dra. Carmen Luz Sermeño.

Dedicatoria:



A mis padres:

con profundo amor y agradeci-
miento.

A mis hermanos:

con mucho cariño y reconoci-
miento.

A mi esposo e hijos:

con inmenso amor.

A mi familia, compañeros y amigos.

Agradecimiento especial a la Dra. Hilda Mercede
des Pacheco de Novoa, por su sincera colaboraci
ción en este trabajo.

A la Dra. Vera Alicia F. de Navas, con respeto,
cariño y admiración.

I N D I C E

	P.
I. INTRODUCCION	1
II. ACIDO ASCORBICO VITAMINA "C"	2
III. METODOS FISICO-QUIMICOS	10
IV. METODO MICROBIOLOGICO	24
V. ANALISIS POLAROGRAFICO DEL ACIDO ASCORBICO	61
VI. CONCLUSIONES	75
VII. BIBLIOGRAFIA	77

I N T R O D U C C I O N

El empleo de Vitamina "C", en la industria farmacéutica y de productos alimenticios, confiere una importancia extraordinaria a su determinación cuantitativa.

Es muy difícil actualmente seleccionar la técnica apropiada para un problema particular, a partir de la gran cantidad de información bibliográfica que existe sobre la Vitamina "C".

El principal objetivo de este trabajo es facilitar a los Analistas su elección, respecto al método a seguir.

ACIDO ASCORBICO VITAMINA "C"

La Vitamina C, o ácido ascórbico, es la vitamina hidrosoluble necesaria para la prevención y curación de la enfermedad por Carencia, llamada escorbuto.

La vitamina C, se encuentra en todas las células vegetales vivas, se sintetiza durante la germinación de las semillas y está relativamente concentrada en los órganos vegetales de crecimiento rápido. Se encuentra así mismo en todos los tejidos animales, aunque no se almacena en grandes cantidades y existe en concentraciones bajas excepto en los órganos y glándulas que tienen funciones endocrinas, como el hígado, cápsulas suprarrenales, timo e hipófisis. Es esencial para la formación del colágeno intercelular; por lo que guarda gran relación con las estructuras dentarias, la sustancia fundamental de los huesos y las paredes de los capilares; en el escorbuto, son estos los tejidos defectuosos.

Nuestras mejores fuentes de suministro son las frutas frescas como los cítricos, frambuesas, grosellas y las verduras como la lechuga y la coliflor. Aunque las papas no contienen grandes cantidades de ácido ascórbico, son una de nuestras más grandes fuentes a causa de las grandes cantidades que se consumen.

La vitamina C, es esencial para la curación de las fracturas óseas, es un factor en la resistencia contra la infección, y reduce el efecto de la toxina diftérica,

teniendo también propiedades bactericidas.

El ácido ascórbico se presenta bajo la forma de cristales o polvo cristalino ligeramente amarillento. Es inodoro y posee sabor ácido, 0.05 mg. de ácido ascórbico cristalino corresponden a 1 unidad internacional de Vitamina C, (20).

Solubilidad.

En agua a 25°C. aprox. 30 gr./100 cc.

En alcohol etílico 95 % a 25°C. aprox. 3 gr./100 cc.

En alcohol etílico absoluto a 25°C. aprox. 1 gr./100 cc.

En eter, cloroformo, benceno, eter de petróleo, aceites y grasas insoluble

Estabilidad.

La estabilidad del ácido ascórbico no es ilimitada.

A causa de sus características químicas, la molécula de Vitamina C, puede oxidarse y descomponerse. Estas reacciones son provocadas principalmente por la acción de la luz, el calor y el aire, especialmente en presencia de humedad; por lo que se recomienda guardar el ácido ascórbico en recipientes herméticamente cerrados y en lugar fresco, seco y al abrigo de la luz. El material se mantendrá

estable durante mucho tiempo en estas condiciones. A veces puede producirse después de un almacenamiento prolongado, una ligera coloración amarilla que no afecta la actividad biológica del producto.

El efecto desfavorable que sobre la estabilidad del ácido ascórbico pueden ejercer condiciones adversas, durante la preparación o almacenamiento, se nota particularmente en el caso de las soluciones de ácido ascórbico. Por ejemplo: a pesar de que los metales prácticamente no alteran la estabilidad del ácido ascórbico cristalino seco; aceleran en cambio considerablemente la oxidación en solución acuosa, aún cuando solo se encuentran trazas de los mismos (especialmente hierro, cobre y manganeso). El aumento del pH también acelera la alteración de color de las soluciones de Vitamina C, que es bastante rápido en soluciones alcalinas. Por lo tanto, como las soluciones para uso parenteral han de ser neutralizadas para reducir al mínimo el dolor resultante de su inyección, debe evitarse cuidadosamente en la preparación cualquier exceso al alcalinizar.

Estas indicaciones son también aplicables en general a los comprimidos de Vitamina C. Las dificultades que presenta la elaboración de los comprimidos pueden vencerse se se toman las medidas de precaución recomendadas.

Es muy importante que la Vitamina C, que vaya a usarse, sea pura y de buena calidad. El ácido ascórbico triturado permite la obtención de una mezcla homogénea con los otros ingredientes, evitando además que los cristales-

de Vitamina C, lleguen a la superficie de los comprimidos.

Los cristales y esquirlas que lleguen a la superficie constituyen un factor causante de manchas en los mismos.

No se han de usar aparatos de cobre ya que este metal, actuando como catalizador, destruye la Vitamina C.

Con el fin de evitar que los comprimidos se peguen a los punzones, durante la compresión, hay que lubricar bien el granulado. El talco que se emplea para este fin, debe estar libre de hierro porque su reacción con el ácido ascórbico daría lugar a manchas coloreadas sobre los comprimidos.

El equipo para la elaboración de comprimidos ha de ser de acero inoxidable, de níquel o perfectamente esmaltado. También es necesario emplear matrices y punzones cromados. El ácido ascórbico tiende a producir alteraciones de color en contacto con glucosa. Esta reacción es una de las causas principales de la alteración de color de carácter no enzimático observada en muchos productos alimenticios. Los ácidos aceleran la hidrólisis y por esta causa suelen ocurrir alteraciones de color al encontrarse el ácido ascórbico en presencia de azúcar.

Ajuste de pH.

Una alcalinización local producida durante el pro-

ceso de ajuste de pH, aún cuando sea fugaz, puede causar una provocada alteración del color de la solución. El alcali a emplear es el bicarbonato de sodio, de pureza para análisis libre de metales pesados y de calcio.

El bicarbonato de sodio evita alcalinizaciones locales peligrosas durante la adición por ser una base relativamente débil, de constante de disociación baja, por otra parte reacciona con el ácido ascórbico desprendiendo anhídrido carbónico, lo que aumenta la protección. La mejor manera de agregar el álcali es en forma de una solución acuosa concentrada.

Se agita vigorosamente mediante un agitador mecánico o haciendo pasar una corriente de $C O_2$, a través de la solución de Vitamina C. El pH referido para las soluciones parenterales de ácido ascórbico es de 6.5 a 7.0. A este pH, el ácido ascórbico se encuentra en su mayor parte en forma de sal sódica.

Protección del Oxígeno.

Hay que hacer todo lo posible para evitar la oxidación del ácido ascórbico, de eliminarse todo el oxígeno contenido en el agua destilada libre de pirógenos empleada para la solución. La mejor manera de llevarlo a cabo es hacer pasar durante 10 minutos, por lo menos, una corriente de gas $C O_2$ a través del agua antes de agregar el ácido ascórbico. De esta manera se satura el solvente con

el gas inerte eliminando el oxígeno disuelto, La superficie del líquido también debe estar constantemente cubierto durante la composición, filtración y envase de la solución terminada por una atmósfera de $C O 2$ o de nitrógeno purificado. Ha de desplazarse el aire de las ampollas antes del cierre por medio del $C O 2$.

En las soluciones de Vitamina C, únicamente se usarán ingredientes controlados analíticamente, libres de metales pesados y de Co. En las fabricaciones han de usarse aparatos de vidrio, esmaltados en vidrio o cromados.

Protección de la Luz.

En todas las circunstancias es necesario proteger las soluciones de ácido ascórbico de la luz solar directa, o de fuerte luz artificial. Las botellas en las que se almacena la solución se envolverán en tela o en papel negro opaco, las ampollas llenadas se guardarán en recipientes que no deje entrar la luz.

Tanto las ampollas de vidrio incoloro como los de vidrio de color caramelo son utilizables. Los primeros ofrecen menos posibilidades de contaminación por los metales pesados, los de vidrio de color caramelo, por su parte, protegen la solución de la luz diurna. Si se desea puede emplearse para las soluciones de ácido ascórbico, frascos ampollas con cierre de goma; sin embargo, su período de estabilidad es limitado debido a la permeabilidad al oxígeno de la goma, aún-

de la mejor calidad.

Al llevar y cerrar las ampollas de Vitamina C, se tropieza a veces con grandes dificultades. Si en el cuello de la ampolla queda un resto de la solución, éste se carboniza al cerrar la ampolla a la llama.

Por esta causa han de llevarse las ampollas con mucho cuidado impidiendo que puedan adherirse al cuello gotitas de la solución.

Las ampollas se esterilizarán al calor por ejemplo: 30 minutos a 100°C., o por otro método admitido. Sea cual fuere el método aplicado es importante que el tiempo durante el cual se someta la solución de Vitamina C, al calor, sea lo más reducido posible, pues la descomposición es causada más por la prolongada exposición al calor que por el calor mismo, (1-16).

Aplicaciones del Análisis de Vitaminas.

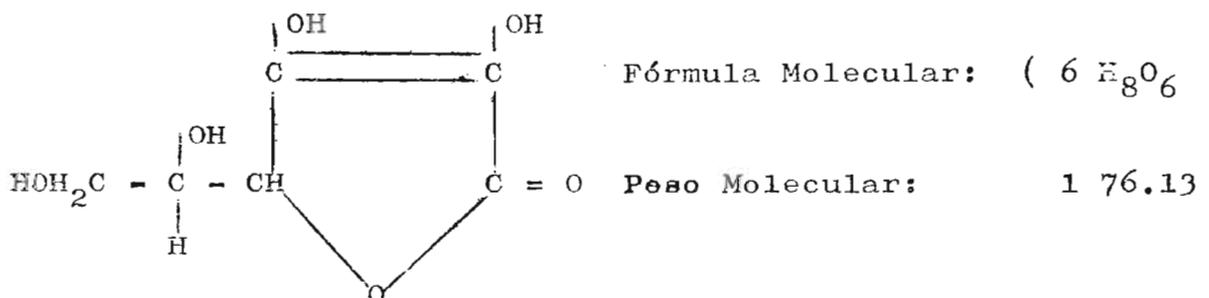
El conocimiento de la distribución y abundancia de las vitaminas en todo tipo de materiales y orígenes ha constituido uno de los principales problemas desde que se inició la investigación sobre estos compuestos. Por ello se ha prestado siempre una gran atención a los métodos para su detección y análisis. El mayor interés se centraba en las técnicas para determinar vitaminas en productos naturales, ya que la síntesis de la vitamina, la preparación de -

mezclas concentradas y su análisis completo se ha realizado en las últimas décadas. Pero el interés actual acerca de la determinación de vitaminas en productos naturales no ha de - crecido y puede afirmarse que no disminuirá en el futuro. El análisis cuantitativo de vitaminas es particularmente útil - en la determinación de los requerimientos nutritivos humanos y animales. El desarrollo de procedimientos prácticos para el análisis de vitaminas en muestras biológicas, por ejemplo en sangre y orina o en los órganos de animales de experimen- tación tiene una especial importancia en medicina. Finalmen- te, el empleo progresivo de vitaminas sintéticas en farmacia y en las industriales de la alimentación humana y animal, ha proporcionado un estímulo todavía mayor al perfeccionamiento y amplia aplicación de los métodos para la determinación de vitaminas en los laboratorios analíticos de los Centros Uni- versitarios, industriales, comerciales y estatales.

METODOS FISICO-QUIMICOS

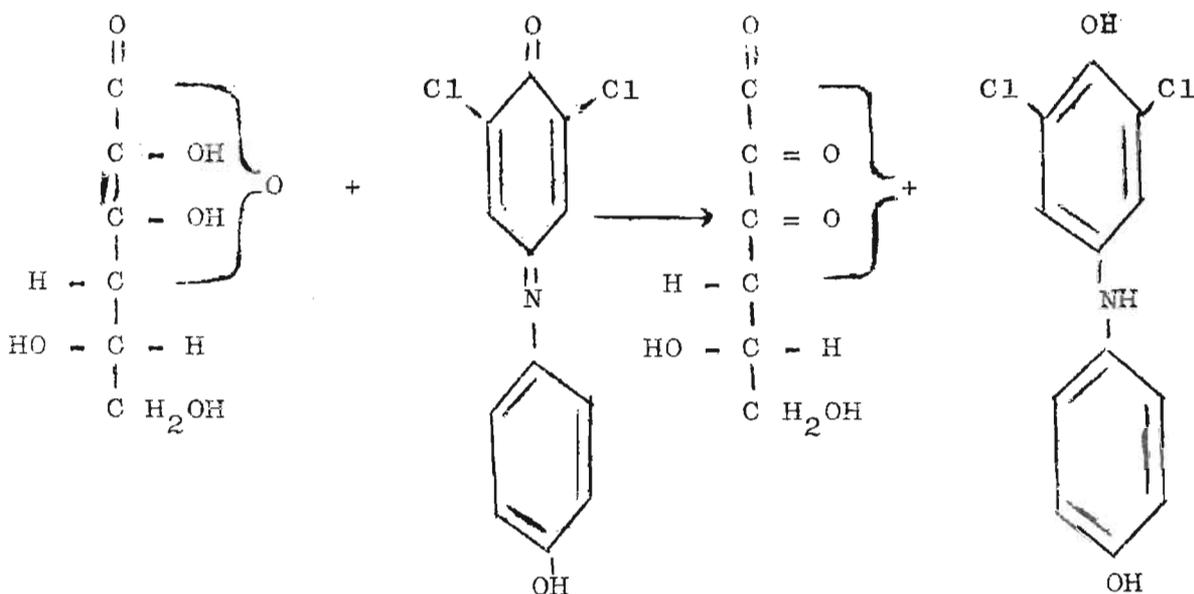
En los últimos veinte años las técnicas QUIMICAS Y FISICO-QUIMICAS han ido reemplazando sucesivamente a los métodos biológicos en la investigación de rutina, especialmente en la industria farmacéutica. Son métodos más rápidos y baratos que los biológicos y en general, sus límites de error son mucho más pequeños. Sin embargo, debido a la escasa especificidad que poseen normalmente los métodos químicos y físicos deben emplearse con ciertas reservas. Por ejemplo, cuando se analizan materiales de composición desconocida es conveniente determinar la vitamina que interesa no solo por un método químico o físico-químico, sino por dos o más métodos, o bien comprobar los resultados, si es posible, mediante los exámenes biológicos y microbiológicos correspondientes. Cuando se emplean técnicas volumétricas y ópticas (fotométricas), es particularmente importante confirmar la exactitud de los resultados obtenidos mediante otros procedimientos antes de decidir su empleo en el análisis sistemático, (19).

Vitamina "C" - Acido Ascórbico - Vitamina Antiescorbútica.



Consideraciones Generales.

Los métodos clásicos para el análisis de Vitamina "C" se basan en su fuerte poder reductor que permite su determinación por volumetría oxidimétrica. El método de "J - Tillmans", en el cual la vitamina se valora con 2,6-dicloro fenolindofenol, es el más utilizado desde hace muchos años para la valoración de la Vitamina "C". Este colorante es azul al estado sólido y en solución neutra o alcalina; la solución en medio ácido es de coloración rosada y se reduce al derivado leuco incoloro.



El ácido ascórbico se oxida ácido dehidroascórbico. Gracias a la intensidad de la coloración, la valoración con 2,6, diclorofenol-indofenol se emplea principalmente para el análisis de vitamina "C" en piensos y alimentos tales como frutos y zumos, y en materiales biológicos (Orina por ejemplo), (16 - 20).

Factores Interferentes.

El análisis de la Vitamina "C" por volumetría oxidimétrica es específica únicamente cuando se emplean soluciones de ácido ascórbico puro. Si existen en la solución otras sustancias reductoras además del ácido ascórbico se consume una mayor cantidad de la solución volumétrica y el contenido aparente en Vitamina "C" es mucho mayor del real. Aunque la interferencia debida a esta causa puede preverse y, en algunos casos, eliminarse adoptando las precauciones adecuadas, como en el caso de las preparaciones farmacéuticas, no sucede lo mismo cuando se trabaja con productos naturales. Los compuestos orgánicos con grupos -SH (Por ejemplo Glutatión), sustancias reductoras y otros derivados que pueden formarse durante la calefacción de los alimentos o materiales a ensayar (Por ejemplo Zumo, vegetales, mermelada, conservas vegetales, vegetales desecados) así como el bióxido de azufre - que se añade a los mostos no fermentados, pueden todos ellos interferir la valoración de la Vitamina "C", en productos naturales por el procedimiento mencionado. Además, es frecuente que una pequeña proporción de Vitamina "C" se halle en los productos naturales al estado de ácido de ácido dehidroascórbico. Este compuesto está dotado también de actividad antiescorbútica, pero no reacciona con el 2,6 diclorofenol-indofenol y no puede valorarse, por tanto, si no se convierte previamente en ácido ascórbico.

Por todas estas razones, se han realizado múltiples intentos para modificar el análisis del ácido ascórbico total mediante la valoración con 2,6 diclorofenol-indofenol, de tal

modo se consiguiera determinar exclusivamente el contenido en Vitamina "C". Se han sugerido un gran número de métodos para aislar el ácido ascórbico de las otras sustancias reductoras interferentes. La mayoría de estos procedimientos han sido concebidos para la determinación de la Vitamina "C" en materiales naturales concretos y no son de aplicación general. Cuanto más compleja sea la muestra o menor el contenido en ácido ascórbico, mayor es el peligro de pérdidas durante los tratamientos de purificación.

Otros Métodos para el Análisis de Vitamina "C".

El método de STROHECKER HEIMANN Y MATT, ha demostrado ser muy adecuado para el análisis de Vitamina "C" en alimentos. El ácido ascórbico se identifica y aísla mediante cromatografía sobre papel antes de proceder a su valoración oxidimétrica.

Existen otros métodos muy sensibles que, si bien no son tan específicos como el de STROHECKER, HEIMANN Y MATT, son sin embargo, más apropiados que los métodos clásicos que emplean diclorofenolindofenol. Consideramos oportuno destacar el análisis fotométrico con 2-nitroanilina-diazada (MOHR) y con 2,4 dinitrofenil-hidrazina (RDE Y KUE---THER). Estos procedimientos son también apropiados para la determinación de Vitamina "C", en alimentos especialmente en zumos colorados, que son muy difíciles de valorar cuando se emplea diclorofenol-indofenol.

Métodos.

Los siguientes métodos son de gran aplicación práctica para la valoración de Vitamina "C".

- 1o. Valoración con cloramina-"T" 0.1 N (sólo para preparados farmacéuticos que no contengan otras sustancias oxidables).
- 2o. Valoración con solución de 2,6-diclorofenol-indofenol preparada a partir de comprimidos de este producto (apropiada para determinaciones -- aproximadas en la preparación de zumos vegetales; aplicable al control de producción de zumos. Siempre que no se requiera una gran exactitud).
- 3o. Valoración con solución de 2,6 diclorofenol-indofenol previo aislamiento del ácido ascórbico por cromatografía sobre papel, según STROHECKER HEIMANN Y MATT por ejemplo en alimentos).
- 4o. Valoración del ácido ascórbico en presencia de ácido sulfuroso. En vinos con solución de yodo (KIELHOFER Y AUMANN).
- 5o. Determinación fotométrica con 2 nitroanilina - diazoada, según MOHR (en alimentos y muestras biológicas).
- 6o. Determinación fotométrica del ácido ascórbico - total (ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico) por el método de la dinitrofenilhidrazina (aplicable a alimentos y muestras biológicas).
- 7o. Análisis de la Vitamina "C" total por purifica-

ción de la 2,4 dinitrofenil-hidrazona del ácido dehidroascórbico por cromatografía en capa fina (en caso de alimentos con alto contenido azucarado).

8o. Valoración polarográfica del ácido ascórbico , (15).

Ascorbigeno.

En los materiales vegetales el ácido ascórbico se halla presente, en determinada proporción, en formas combinadas (Ascorbigeno). Es probable que esta forma no pueda ser empleada directamente por el organismo. No se detecta por los métodos habituales de análisis de Vitamina "C", si no se hidroliza previamente a ácido ascórbico (Por ejemplo, hirviendo con una solución de ácido oxálico durante quince minutos).

Análisis de la Vitamina "C" en Preparaciones Farmacéuticas por Valoración con Cloramina "T" 0.1 N (Con Yodo 0.1 N).

Reactivos.

Cloramina-"T" 0.1 N: 14,085 gr. de cloramina-TG.R. se disuelven hasta 100 ml. en agua.

Yodo 0.1 N

Solución de yoduro de zinc-almidón G.R.

Acido clorhídrico min-25 por ciento ($d= 1.122-1.124$) G.R.

Almidón soluble G. R.

En el caso de preparaciones líquidas, tales como inyectables, gotas y jarabes, se pipetea en un erlenmeyer de 200 ml. un volumen exactamente medido que contenga alrededor de 100 a 200 mg. de ácido ascórbico y se diluye con agua hasta 80 ml. aproximadamente. Se añade 1 ml. de ácido clorhídrico ($d=1.122-1.124$) y 5 ml. de la solución de yoduro de zinc-almidón (indicar), y la mezcla se valora con la solución de cloramina-T 0.1 N hasta aparición de color azul.

También puede valorarse tal como se ha indicado, pero empleando solución de yodo 0.1 N en lugar de cloramina T y añadiendo unas gotas de solución de almidón al 1 % como indicador.

Un ml. de cloramina T 0.1 N (o de yodo 0.1 N) -- equivale a 8.806 mg. de ácido ascórbico, (6 - 15).

Para soluciones concentradas de Vitamina "C" soluciones inyectables de Vitamina "C" o extracto de comprimidos que contengan esta vitamina los reactivos oxidimétricos empleados son la solución de Yodo 0.1 N o la solución de cloramina "T" 0.1 N. Ambas soluciones oxidan cuantitativamente el ácido ascórbico a dehidroascórbico.

La solución de cloramina "T", retiene su título mejor que la solución de Yodo. Otras desventajas de la so-

lución de yodo consiste en que la solución de almidón, demora la reacción con el ácido ascórbico, de tal modo que la volumetría se afecta y también el punto final de la valoración se se emplea variamine blue, como indicador en lugar de la solución de almidón se obtiene un punto final de la valoración con yodo bien definido.

Valoración en Materiales Secos.

En el caso de preparaciones secas (comprimidos y grageas), debe procederse, en primer lugar, a pulverizar finamente la muestra en un mortero. El polvo obtenido se mezcla con un poco de agua, en el mismo mortero y la suspensión obtenida se traslada, con los oportunos lavados, a un matríz Erlenmeyer, empleando 60-80 ml. de agua en total. Se acidifica la muestra con 1 ml. de ácido clorhídrico ($d = 1.122 - 1.124$) se agita vigorosamente y se valora, (15).

Valoración en Cápsulas.

Las cápsulas que contienen una suspensión oleosa del ácido ascórbico junto con otras vitaminas (cápsulas polivitamínicas) se abren a lo largo de la línea de unión empleando una cuchilla apropiada (de afeitar) por ejemplo. Las dos mitades obtenidas y su contenido se transfieren cuantitativamente a un embudo de separación, lavando cuidadosamente la cuchilla empleada con éter de petróleo y adicionando directamente al embudo de separación los líquidos de la-

vado. La mezcla se reparte entre las fases acuosa y etérea. La capa acuosa se recoge en un matraz Erlenmeyer y la capa de éter de petróleo se agita otras dos veces con agua. Las fases acuosas de lavado se combinan con el primer extracto acuoso, se acidifica con ácido clorhídrico (1 ml.) y se valora como se ha descrito anteriormente, (15).

Presencia de Otras Sustancias.

En general, no importa que la preparación o extracto contenga otras vitaminas, además de ácido ascórbico. Los excipientes habituales, tales como almidón lactosa y talco no interfieren con la valoración y no es necesario eliminarlos por filtración, en el caso de que sean insolubles. Si la concentración de vitamina "C" es muy baja es mejor valorar con cloramina-T 0.01 N empleando una microbureta.

Valoración de la Vitamina "C" con Comprimidos de 2,6-Dicloro fenol-Indofenol.

Aplicaciones.

Este procedimiento de valoración puede emplearse para determinaciones aproximadas de la concentración de vitamina "C". Dada su sencillez operacional, este método es especialmente apropiado para los análisis de rutina en la obtenición de zumos de frutas. Puede emplearse así mismo para determinar vitamina "C" en vegetales y en extractos acuosos

de alimentos secos, siempre que no se requiera una gran precisión.

Reactivos.

Acido Oxálico G. R.

Comprimidos de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico de 1,65 mg. (equivalentes a 1 mg. de ácido ascórbico).

Solución de 2,6 diclorofenol-indofenol: se disuelven cinco comprimidos de diclorofenol-indofenol en 20-30 ml. de agua en un matraz aforado de 50 ml. calentando sobre baño de vapor y con frecuente agitación rotacional del matraz. - Cuando se observa que han desaparecido las partículas en suspensión, se enfría la solución a la temperatura ambiente, se diluye con agua hasta la señal de aforo y se mezcla, 1 ml. - de esta solución equivale a 0,1 mg. de ácido ascórbico.

Eter Dietílico G. R.

Acido L (+) - ascórbico G. R.

Método.

Un volumen exactamente medido de la solución problema de vitamina "C" que contenga de 0.2 a 1.0 mg. de ácido ascórbico, se pipetea en un Erlenmeyer de 100 ml. de capacidad y se diluye hasta 20-30 ml. con agua destilada reciente -

mente hervida y enfriada rápidamente. Se añade un poco de ácido oxálico y se agita la solución. Acto seguido se procede a su valoración con solución de diclorofenol-indofenol contenida en un microbureta, hasta que se obtiene coloración débilmente rosada. El cambio de color suele ser de difícil o imposible observación debido a la coloración que posee la solución problema (como ocurre precisamente, en los zumos de frutas). En este caso, se añade 10 ml. de éter cuando se prevé que está a punto de alcanzar el punto final de la valoración. Se agita vigorosamente la muestra, se deja reposar y se presta atención a la coloración de la solución etérea. Si su tonalidad es violetarosada significa que la valoración ya se ha completado y que se halla presente un exceso de diclorofenol-indofenol. En cambio, si la solución tiene otro color o es incolora, se acidifica un volumen igual de la solución problema con el ácido oxálico y se trata con un volumen de la solución de diclorofenol-indofenol que excede en 1 ml. al empleado anteriormente. La mezcla obtenida se agita de nuevo con 10 ml. de éter. Si la coloración de la capa etérea es ahora violeta-rosácea, el punto final se halla comprendido entre las dos cifras de valoración (volúmenes empleados en los dos ensayos) y puede determinarse con bastante exactitud procediendo a la adición de volúmenes menores de la solución de diclorofenol-indofenol empleando en la segunda valoración 0.5 ml. en lugar de 1 ml.).

Frecuentemente, los zumos de frutas contienen pigmentos de tonalidad rojiza (por ejemplo: zumo de grosella) o amarillenta (por ejemplo: zumo de naranja) que son solubles de éter y dificultan la detección del exceso de diclorofenol-

indofenol en la capa etérea. En estos casos, la valoración puede facilitarse extrayendo con éter un volumen considerable de la solución problema, en un embudo de decantación. A continuación, se valoran con diclorofenol-indofenol diversas porciones de la capa acuosa.

Solución Testigo.

Otra forma de eliminar la interferencia producida por la presencia de pigmentos consiste en realizar simultáneamente un experimento en blanco (prueba testigo). Se diluye con agua, de la forma habitual, la misma cantidad de solución problema que se emplea en la determinación principal se acidifica con ácido oxálico y se añade un volumen de la solución de diclorofenol-indofenol que equivalga, aproximadamente, a la vitamina C, presente. Se adiciona un poco de ácido ascórbico, y la mezcla se extrae con 10 ml. de éter. Se repite la determinación principal y el punto final de la valoración se compara con la coloración de la capa etérea obtenida en la prueba testigo, hasta igualarla totalmente.

Si es muy baja la concentración en ácido ascórbico de la solución problema es preferible emplear una solución más diluida de diclorofenol-indofenol (por ejemplo: la solución que resulta al disolver un comprimido en 50 ml. de agua). En este caso 1 ml. de la solución de diclorofenol-indofenol equivale a 0.02 mg. de ácido ascórbico en la solución problema.

Cuando existen dificultades para detectar la variación desde la solución incolora (o coloración muy débil de la solución problema) hasta la tonalidad rosada, es más fácil, con frecuencia emplear la valoración inversa; se valora una cantidad fija de la solución diclorofenol-indofenol, con la solución problema o con la dilución apropiada de la misma. Este procedimiento es ventajoso únicamente cuando la solución problema es tan débilmente coloreada que no se precisa extraer con éter el exceso de colorante. Por ejemplo: se disuelve una tableta diclorofenol-indofenol (equivalente 1 mg. de ácido ascórbico) en 20 ml. de agua que contengan alrededor de 0.1 % de ácido oxálico, en un Erlenmeyer de 100 ml. y se valora. La solución problema o la dilución correspondiente de la misma contenida en la bureta se acidifica asimismo con ácido oxálico.

Comprobación de los Comprimidos de Diclorofenol-Indofenol.

Debe comprobarse periódicamente el poder oxidante de los comprimidos de diclorofenol-indofenol, que se conserva durante algún tiempo en el laboratorio. Si disuelve un comprimido en veinte mililitros de agua (20 ml.) se acidifica con ácido oxálico y se valora con una solución de calibración recientemente preparada que contenga una cantidad exactamente pesada de ácido ascórbico (es muy conveniente emplear por ejemplo 1 mg. X 20 ml.).

Los errores analíticos debidos al bajo título de los comprimidos pueden evitarse de la forma siguiente: se

añade a la solución problema un exceso de diclorofenol-indofenol (por ejemplo: 20 ml. de una solución de cinco comprimidos de diclorofenol-indofenol en 100 ml. de agua) y el exceso de diclorofenol-indofenol se valora con una solución de ácido ascórbico de concentración conocida. En un experimento en blanco o testigo, se determina el volumen de la solución de ácido ascórbico que equivale a 20 ml. de la solución de diclorofenol-indofenol. Si la concentración de la solución Patrón de ácido ascórbico empleada es de 0.05 Mcg. X ml. la concentración en vitamina C, de la muestra problema es: $(V_b - V_s) \times 0.05 = \text{mg. de ácido ascórbico en el volumen empleado de la solución problema.}$

Donde V_b = volumen de la solución de ácido ascórbico consumida en la valoración testigo y

V_s = volumen de la solución de ácido ascórbico -- utilizado en la valoración de la muestra.

Si el contenido en ácido ascórbico de la muestra es bajo, debe emplearse una solución de calibración de ácido ascórbico paralelamente diluída (por ejemplo: una solución que contenga 0.01 mg. de ácido ascórbico por ml.), (18.)

METODO MICROBIOLOGICO

Valoración Volumétrica de la Vitamina "C" después del Aislamiento de la misma por Cromatografía sobre Papel.

El ácido ascórbico se separa de otras sustancias reductoras acompañantes mediante cromatografía sobre papel. Se recorta la mancha correspondiente al ácido ascórbico, se extrae la pieza de papel con solución de agua-ácido oxálico y el ácido ascórbico aislado de esta manera se valora con diclorofenol-indofenol 0.001 N. Para determinación del contenido total en vitamina "C" se reduce con ácido sulfhídrico, antes de la valoración, el ácido dehidroascórbico que puede hallarse presente. Este método es específico para la vitamina "C" y por tanto es particularmente adecuado para su valoración en alimentos y otros productos que contienen una cantidad desconocida difícilmente determinable de sustancias reductoras interferentes. Pueden detectarse cantidades del orden de 2-3 Mcg. de ácido ascórbico. La cantidad más pequeña que puede determinarse cuantitativamente mediante este procedimiento es de alrededor de quince Mcg., (15).

Cromatografía en Capa Fina.

El ácido ascórbico también puede separarse de sustancias reductoras interferente por cromatografía sobre placas de silica-gel. Si se emplea agua como disolvente de desarrollo el valor de Rf del ácido ascórbico, es de 0.96. -- Cuando se emplea metanol como líquido de desarrollo el ácido dehidroascórbico puede separarse perfectamente del ácido as-

córbico, con unos valores de Rf, aproximados de 0.85 y 0.7 respectivamente. Sin embargo, la experiencia adquirida hasta la fecha ha demostrado que el método de cromatografía en capa fina no es apropiado para el análisis cuantitativo debido a que se pierde una cantidad muy apreciable de ácido - ascórbico en la cromatoplaca.

Reactivos.

Acido L (+) - Ascórbico G. R.

Acido oxálico G. R.

Solución de ácido oxálico al 1 %, 10 g. de ácido oxálico G. R. se disuelven en agua hasta 1000 ml.

Acetato sódico anhidro G. R.

Diastaza con una capacidad sacarificante (formadora de maltosa) de 1:250, como mínimo.

Papel de filtro Schleicher & Schull N° 2043.

1 butanol para cromatografía.

Cianuro potásico G. R.

Disolvente para cromatografía sobre papel: se disuelven 2 g. de ácido oxálico en 60 ml. de agua. La solución se agita con cuarenta ml. de butanol.

Una vez separada las dos capas la fase inferior (acuosa) se elimina. Se añade en la capa superior (orgánica) algunos gránulos (1-2 mg.) de cianuro potásico y el líquido obtenido se emplea como disolvente para el desarrollo cromatográfico.

Heptamolibdato amónico G. R.

Solución de hidróxido amónico al 1 %, 40 ml. de la solución de amoníaco min. 25 % (d= 0.910) G. R. se diluye con agua hasta un litro.

Solución madre de citrato: 21.014 g. de ácido cítrico se disuelven en agua en un matríz aforado de 1000 ml. se añade 200 ml. de hidróxido sódico 1 N y la solución se diluye hasta la señal de aforo con agua, Tampón ácido clorhídrico-citrato sódico pH 3.8: se mezcla 51.9 ml. de la solución madre de citrato con 48.1 ml. de ácido clorhídrico 0.1 N. Reactivo para el revelado (reacción coloreada) 150 g. de Heptamolibdato amónico se disuelven hasta un litro en solución de hidróxido amónico al 1 %.

Antes de su empleo, se mezclan 3 ml. de esta solución con 2 ml. de tampón ácido clorhídrico citrato sódico pH 3.8 y tres gotas de ácido sulfúrico 95-97 % (densidad = 1.84) G. R.

Solución de 2.6 diclorofenol-indofenol 0.001 N.: 145 mg. de 2.6 diclorofenol-indofenol G. R. se disuelven en 50 o 100 ml. de agua a 50 grados centígrados.

La solución se enfría y diluye hasta 1000 ml. en un matríz aforado. Se determina su factor empleando una solución recientemente preparada de ácido ascórbico.

Papel indicador especial pH. 0.5- 5.0-.

Método de Extracción.

Las muestras secas se extraen con la solución de ácido oxálico al 1 %. Las que contengan agua se disgregan en un homogenizador mecánico adicionando solución de ácido oxálico al 1 % o ácido oxálico sólido (en una proporción de alrededor del 0.1 %, en peso, de la muestra de partida). De este modo se consigue la extracción simultánea del material problema. Según la concentración de ácido ascórbico que se prevea contiene la muestra, se exprime una cantidad mayor o menor del homogenado obtenido (por ejemplo: a través de un paño de lino) o se diluye con agua en un matríz aforado hasta un volumen conocido y, finalmente, se filtra o centrifuga. La solución transparente obtenida que se aplicará al papel cromatográfico, debe contener alrededor de 15-40 mg. de ácido ascórbico en un volumen de 20-60 ml.

Ejemplo.

Para valorar la vitamina "C" en patatas cocidas, se aplastan y mezclan unos 300 g. de patatas todavía calientes. La masa obtenida se coloca en un mezclador mecánico, -

se añade un poco de ácido oxálico y 3 g. de diastasa y la mezcla se homogeniza durante un minuto, haciendo pasar una corriente de nitrógeno. La adición de diastasa produce una fuerte degradación del material, que puede expresarse después de dejar reposar la mezcla durante quince minutos. Los zumos obtenidos se centrifugan y se emplean directamente para la cromatografía sobre papel, (15).

Cromatografía Sobre Papel.

Se aplica el procedimiento de desarrollo descendente. Se sitúan en la línea de base 20-60 ml. del extracto oxálico preparado tal como se ha descrito. Puesto que la cromatografía sobre papel se emplea normalmente con fines cuantitativos, debe emplearse una jeringuilla micrométrica (por ejemplo: jeringuilla micrométrica "AGLA" BURROUGHS & Co. Londres Inglaterra) para aplicar las soluciones problema al papel cromatográfico.

Si la concentración en ácido ascórbico es muy baja, de tal modo que deben emplearse volúmenes mayores de los 60 ml. para que se cromatografíen de 15 a 40 mcg. de ácido ascórbico, es preferible aplicar la solución en banda de 3 a 4 cm. de longitud sobre la línea de partida. Se depositan gotitas de solución a lo largo de la banda, a intervalos regulares de unos 2 mm. Cuando de este modo, se ha completado la longitud total indicada, las gotitas se aplican, en una segunda ronda, comenzando de nuevo por el mismo extremo y situandólas en los espacios que han quedado vacíos en la

primera. Cuando se sigue este procedimiento no deben emplearse volúmenes mayores de 0.1 ml. de la solución problema. Como mancha de referencia se usan 20 ml. de ácido ascórbico al 0.1 % (= 20 mcg. de ácido ascórbico), que se aplican sobre la línea de partida a 3 cm., como mínimo, del lugar donde se ha depositado la solución problema, bien sea en banda o en punto.

Vitamina "C" Total.

Cuando se desee analizar el contenido total en vitamina "C", el ácido dehidroascórbico presente debe reducirse previamente a ácido ascórbico. Se añade acetato sódico cristalizado al extracto oxálico de la muestra, hasta que la solución tenga un pH de 3.5. A continuación, se hace pasar una corriente de ácido sulfhídrico durante quince minutos y se deja reposar la solución durante toda la noche (o durante doce horas, como mínimo) al resguardo de la luz se aplican a línea de partida, tal como se ha descrito anteriormente, entre 20 y 100 ml. de la solución resultante.

Si se desea conocer tanto el contenido en ácido ascórbico como en vitamina "C" total, pueden aplicarse directamente en el mismo papel cromatográfico las soluciones preparadas para el análisis de ácido ascórbico (sin reducción), vitamina "C" total (con reducción y la solución de referencia de ácido ascórbico al 0.1 %). Es aconsejable aplicar las tres soluciones a un segundo papel y desarrollar los dos cromatogramas simultáneamente en la misma cámara cromatográfica.

Con el fin de evitar pérdidas por descomposición - cuando las soluciones se conserven durante mucho tiempo, el extracto para el análisis de ácido ascórbico y la solución de referencia no deben prepararse hasta el día siguiente, - cuando pueden aplicarse sobre el papel al mismo tiempo que la muestra preparada para el análisis del contenido total - en vitamina "C", (es decir, después del tratamiento con ácido sulfhídrico).

Revelado.

Los cromatogramas se desarrollan durante cinco-cinco y media horas, aproximadamente, empleando la técnica de desarrollo descendente y los disolventes descritos en el apartado "REACTIVOS". El papel se seca en estufa a 100°C durante uno-dos minutos. La banda de referencia (que contiene el ácido ascórbico puro) se recorta, se pulveriza con el reactivo de heptamolibdato y se deseca de nuevo a 100°C hasta que aparece la mancha azul correspondiente al ácido ascórbico. Se recorta (n) la zona (s) de papel de la fracción no pulverizada del cromatograma que corresponda (n) a la mancha de ácido ascórbico detectada en la banda de referencia revelada. Si existe más de una línea de desarrollo en el papel (por haber aplicado varias muestras simultáneamente) debe prestarse una especial atención para que el área de las zonas recortadas sea exactamente igual.

Valoración.

Cada trozo de papel se recorta en trocitos pequeños que se situán en los respectivos matraces Erlenmeyer de poca capacidad, que contienen de 5 a 10 ml. de una solución acuosa de ácido oxálico al 0.1 %, aproximadamente.

Se hace pasar una corriente bastante fuerte de anhídrido carbónico y los matraces se agitan durante dos-tres minutos para extraer el ácido ascórbico del papel. Se lava el extremo del tubo empleado para el paso de la corriente de gas con un poco de la solución acuosa del ácido oxálico al 0.1 % y el extracto se valora en el mismo matríz con 2.6-diclorofenol-indofenol 0.001 N (dispuesto en una microbureta de 1 ml.) hasta alcanzar el punto final (coloración débilmente rosada). Los trocitos de papel permanecen en el matríz empleado para la valoración. Se recorta un trozo del papel empleado en la cromatografía, de idéntico tamaño que los anteriores, se extrae tal como se ha descrito y se valora con 2-6 diclorofenol-indofenol 0.001 N, con el fin de establecer un avalor testigo, que se sustrae de las determinaciones problema y patrón. El papel empleado para la prueba en blanco no debe contener, desde luego, sustancia alguna de la solución problema (Fig. 31)

Figura 31 valoración del ácido ascórbico por cromatografía sobre papel (diagrama).

St. : línea de partida.

Rs. : banda de referencia (se recorta y se revela).

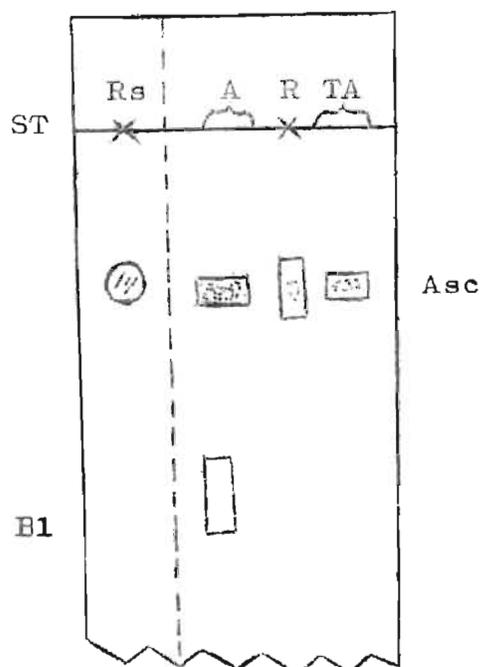


Figura 31

A, R, TA: cromatogramas de ácido ascórbico.

(A), solución de referencia (R) y ácido ascórbico total (TA). Las zonas se recortan, se eluyen y se valoran.

B1: área de papel que se recorta y valora en calidad de testigo.

1 ml. de 2-6 diclorofenol-indofenol 0.001 N., equivale a 0.088 mg. de ácido ascórbico.

Como comprobación adicional, la solución de referencia de ácido ascórbico puede aplicarse en dos puntos, distintos del papel cromatográfico. Una de las bandas se pulveriza y revela, y la otra se eluye y valora del mismo modo que la muestra, empleándose como referencia, (15).

Valoración del Acido Ascórbico en Presencia del Acido Sulfu -
roso en Vinos y Mostos.

Consideraciones Generales.

En los últimos años el ácido ascórbico se viene em-
pleando, de forma progresiva, como agente antioxidante en mos-
tos sin fermentar y vinos espumosos.

Era de interés, por tanto, poder disponer de un mé-
todo sencillo para el análisis del ácido ascórbico en presen-
cia de ácido sulfuroso libre. La principal dificultad estriba
en que la valoración oxidimétrica del ácido ascórbico propor-
ciona cifras demasiado elevadas en presencia de ácido sulfuro-
so libre. Aunque los métodos fotométricos son considerable -
mente más específicos, requieren el empleo de aparatos espe -
ciales (por ejemplo: fotómetro o colorímetro) y poder dispo -
ner de personal técnico capacitado en el análisis, lo cual ex -
cede, normalmente, de las dotaciones que para fines analíti -
cos existen en las bodegas de vino y mosto sin fermentar. Por
esta razón, los productores de vino precisan un método senci-
llo, tal como la valoración oxidimétrica.

Kielhofer y Aumann, valoran el ácido ascórbico con
yodo 0.02 N., reactivo que ha sido ampliamente utilizado para
la determinación volumétrica del dióxido de azufre. El ácido
sulfuroso se bloquea por adición de acetaldehído. De este mo-
do el volumen de yodo 0.02 N, consumido corresponde a la can-
tidad de ácido ascórbico y a otras sustancias reductoras. --
Aparte del ácido sulfuroso que se encuentran en el vino o mos-

to. El "valor residual de reducción", calculado como ácido ascórbico, es de alrededor de 10 mg./litro para el vino blanco y de 15 mg./litro aproximadamente para mostos de manzana y uva, valores que se sustraen de la cifra total obtenida en las valoraciones con y sin adición de acetaldehído.

El método ha sido mejorado por Schneyder y Kain, - que han reemplazado el empleo del acetaldehído volátil (p. - ebullición 21°-22° C.) por el de aldehído propiónico (p. ebullición, alrededor de 49° C.) de manejo mucho más sencillo.

Reactivos.

Solución de acetaldehído: se mezcla 1 ml. de acetaldehído recién destilado con 99 ml. de agua. Esta solución debe prepararse extemporáneamente. Solución de propionaldehído: se mezclan 10 ml. de aldehído propiónico recientemente destilado con 90 ml. de agua.

Acido sulfúrico diluído (2N aprox.): se añade 56 ml. de ácido sulfúrico 95-97 % ($d=1.84$) G. R. a 800 ml. de agua, enfriando y agitando.

La solución se diluye hasta un litro con agua.

Yodo 0.02 N: 100 ml. de yodo 0.1 N se disuelven hasta 500 ml. con agua en un matríz aforado. Esta solución de yodo aproximadamente 0.02 N, se comprueba y normaliza, de la forma habitual, con solución de tiosulfato sódico, solu -

ción de almidón: 1 g. de almidón soluble G. R. se hierve -
con 200 ml. de agua. Se añaden a la solución, en calidad -
de conservador, unos mg. de yoduro mercuríco.

Método.

Se añaden 5 ml. de la solución de acetaldehído o 2 ml. de la de aldehído propiónico a 50 ml. de vino o mosto - dispuestos en un matríz Erlenmeyer de 200 ml. de capacidad. Se mezcla imprimiendo al matríz un ligero movimiento rotato rio, pero, con el fin de evitar la absorción de oxígeno at- mosférico, debe realizarse de forma muy suave, sin agitación. Transcurridos diez minutos, la mezcla se acidifica con 2 ml. de ácido sulfúrico diluído, se añade 1 ml. de la solución de almidón y se procede a la valoración con yodo 0.02 N, hasta que la coloración azul persista durante medio a un minuto - (volumen empleado = a ml.).

Cálculo.

$35.2^a - 10 = \text{mg. de ácido ascórbico por litro de -}$
vino o mosto.

10 = valor residual de reducción en el caso del vi
no.

Determinación de "SO₂ Libre".

Para determinar el anhídrido sulfuroso libre, se -

añaden 2 ml. de ácido sulfúrico diluído y 1 ml. de la solución de almidón a otros 50 ml. de vino o mosto, que se valoran con yodo 0.02 N, tal como se ha descrito anteriormente - (volumen empleado = b ml.).

Cálculo.

$12.8 (b - a) - 4 = \text{mg. de SO}_2, \text{ libre por litro de vino o mosto.}$

4 = Valor residual de reducción en el vino.

Análisis Fotométrico del Acido Ascórbico con 2-Nitroanilina por el Procedimiento de "MOHR".

Fundamento.

El ácido ascórbico se convierte en la 2-nitrofenil hidrazina del ácido oxálico por tratamiento con 2-nitroanilina diazoada. En presencia de un exceso de solución de hidróxido sódico este compuesto forma una sal sódica de coloración rojiza-violeta. El máximo de absorción a 540 mm. se mide fotométricamente, (16).

Sensibilidad.

La sensibilidad y especificidad del método pueden incrementarse considerablemente extrayendo el producto de reacción de la solución ácida-con isobutanol y transfiriendo

la sal sódica desde la fase isobutanólica a la acuosa con solución de hidróxido sódico. Con esta modificación pueden analizarse cuantitativamente cantidades muy reducidas (del orden de 0.5 mg. de ácido ascórbico por ml.), mientras que si la reacción se realiza directamente sin extracción se precisa una concentración de 10 mg. de ácido ascórbico por ml. como mínimo.

Especificidad.

La presencia de otras vitaminas, compuestos sulfhi drílicos, ácido sulfuroso y otras sustancias que interfieren la valoración oxidimétrica, no influye cuando se practica el análisis fotométrico con 2- nitroanilina.

Aplicaciones.

El método es adecuado para el análisis de ácido ascórbico en frutos, zumos de fruta, alimentos pretratados su plementados con ácido ascórbico, etc., y en preparaciones far macéuticas. Aunque el procedimiento descrito por MOHR (ex -- tracción con isobutanol) es de aplicación general, puede em plearse el método simplificado (sin extracción) cuando las soluciones o extractos son transparentes, incoloros o, a lo su mo, de tonalidad débilmente amarillenta.

Vitamina "C" Total.

Para el análisis de la vitamina "C" total (ácido as-

córbico + ácido dehidroascórbico) el ácido dehidroascórbico presente debe reducirse previamente a ácido ascórbico con ácido sulfhídrico, ya que con este método se determina exclusivamente el derivado reducido. Sin embargo el análisis fotométrico que emplea 2,4 dinitrofenilhidrazina, es más apropiada para la determinación de la vitamina "C" total.

Reactivos.

Reactivo de 2-nitroanilina: 0.4 g. de 2-nitroanilina para la determinación fotométrica del ácido ascórbico se disuelven en 20 ml. de ácido acético glacial aprox. 96 % -- ($d = 1.055-1.064$) G. R. La solución obtenida se diluye hasta 250 ml. con ácido clorhídrico al 10 % (600 ml. de -- agua + 400 ml. de ácido clorhídrico min. 25 % y $d = 1.122-1.124$ G. R.). Esta solución se conserva durante largo tiempo.

Nitrito: se disuelven en 25 ml. de agua 0.02 g. de nitrito sódico G. R. en barritas.

Reactivo para Diazoación.

Se mezclan 5 ml. del reactivo de 2-nitroanilina con 5 ml. de la solución de nitrito y con 10 ml. de una mezcla de volúmenes iguales de isobutanol (empleado en el análisis de la vitamina B₁) y de etanol absoluto G. R.

Hidróxido Sódico 0.5 N.

Solución de hidróxido sódico al 10 %. Una parte, - en peso, de hidróxido sódico puro G. R. (lentejas) se disuelve en nueve partes de agua (volumen). Solución de ácido oxálico: 5 g. de ácido oxálico G. R. se disuelven en 1000 ml. - de agua.

Solución de ácido ascórbico. Exactamente 100.0 g. de ácido L (+)-ascórbico G. R. se disuelven en alrededor de 100 ml. de la solución de ácido oxálico al 0.5 % en un matríz aforado de 250 ml. Se diluye hasta la señal de aforo con la misma solución.

Etanol absoluto G. R.

Isobutanol (para el análisis de vitamina B₁).

2.6-diclorofenol-indofenol sódico G. R.

Eter de petróleo. Bencina de petróleo G. R. (intervalo de p.e = 40-70°C.).

Papel indicador universal de pH 1-10 con escala coloreada.

1o.) Procedimiento simplificado para el análisis de ácido ascórbico en soluciones transparentes, incoloras o débilmente amarillentas.

Las muestras sólidas se extraen con la cantidad suficiente de ácido oxálico al 0.5 % para proporcionar una con

centración de ácido ascórbico comprendida entre 0.2 y 2.0 - mg. en 5 ml. Las muestras líquidas se diluyen hasta la misma concentración de ácido ascórbico, adicionando ácido oxálico de tal modo que la concentración del mismo en la dilución final sea, aproximadamente, del 0.5 %.

Solución Problema.

Se pipetea, en un matríz aforado de 200 ml. de capacidad 2 ml. del reactivo de 2-nitroanilina y 2 ml. del reactivo de nitrito. Se mezclan las soluciones y transcurrido un minuto aproximadamente, se añade 75 ml. de etanol y 5 ml. de la solución problema de ácido oxálico diluido. Se mezclan inmediatamente. Después de cinco minutos se añaden 25 ml. de la solución de hidróxido sódico al 10 %. La mezcla se diluye hasta la señal de aforo con agua, se mezcla y se valora en una cubeta de fotómetro de 2 cm. a 540 mm. o empleando el filtro apropiado frente a un blanco que contiene 5 ml. de ácido oxálico al 0.5 % y todos los reactivos empleados en la determinación problema diluidos, igualmente hasta 200 ml. en un matríz aforado.

Solución de Referencia.

Al mismo tiempo, se prepara una solución de referencia que tenga aproximadamente la concentración de ácido ascórbico prevista en la solución problema. Se trata de forma idéntica a la descrita para la muestra. En lugar de

5 ml. de solución problema, pueden emplearse, por ejemplo: -
 0.5 ml. (= 200 mg.) 1 ml. (= 400 mg.), 2 ml. (= 800 mg.)
 ó 4 ml. (1.6 mg/.) de la solución de ácido ascórbico.

E. Muestra	X mgs. de ácido ascórbico en la solución referencia
E. Referencia	mgs. de ácido ascórbico en solución problema.

Curva de Calibración.

Si el método se aplica al análisis rutinario, es más conveniente construir una curva de calibración midiendo diversas soluciones de ácido ascórbico de concentración progresiva (por ejemplo: conteniendo 200, 500, 1.000 y 2.000 mg. de ácido ascórbico) en lugar de emplear una simple solución de referencia. Las medidas se realizan frente a la solución testigo o blanco. Los valores de extinción forman una línea recta, (15).

Bajas Concentraciones.

Si la solución (extracto) problema contiene menos de 40 mcg. (pero 10 mcg. mínimo) de ácido ascórbico por ml. deben añadirse de 10 ó 20 ml. de la misma en lugar de los 5 ml. empleados anteriormente a la mezcla del reactivo de 2-nitroanilina nitrito y etanol. A continuación se procede tal como se ha descrito. La concentración del ácido oxálico en la solución de referencia debe hacerse igual a la de la solución problema mediante la adecuada adición de solución de -

ácido oxálico al 0.5 %. Por ejemplo: si se emplea 30 ml. - de una solución problema que se espera contengan 200 mcg. - de ácido ascórbico, se añaden a la solución de referencia - 0.5 ml. de solución de ácido al 0.04% y 19.5 ml. de la solu- ción de ácido oxálico al 0.5 %.

Procedimiento General según MOHR.

Extracción.

Las muestras sólidas se extraen con un volúmen tal de la solución de ácido oxálico al 0.5 % que proporcionen - una solución cuyo contenido sea, como mínimo de 0.05 mg. de ácido ascórbico en un volúmen que no excede los 90 ml. de - solución. Las muestras líquidas (por ejemplo zumos de fru- tas) se tratan con la cantidad suficiente de ácido oxálico (sólido o en solución concentrada), para proporcionar una - concentración del 0.05 % en la solución empleada para el - análisis. Algunas veces es conveniente filtrar las solucio- nes que contienen ácido oxálico antes de realizar la deter- minación.

Valoración Aproximada, Determinación Principal, Testigos.

La concentración aproximada de ácido ascórbico se determina por valoración con 2.6 diclorofenol-indofenol, - por ejemplo: se miden con una pipeta 10 ml. de la solución problema y se valoran con diclorofenol-indofenol 0.001 N o

con una solución de un comprimido de diclorofenol-indofenol en 50 ml. de agua. De acuerdo con los datos proporcionados, se coloca en un matr az aforado de 100 ml. un volumen de la solución problema que equivalga a una concentración comprendida entre 50 mg. (como mínimo) y 500 mg. (como máximo) de ácido ascórbico. Si por ejemplo, la valoración aproximada de los 10 ml. de la solución ha indicado que contienen unos 80 mg. de vitamina C., la cantidad de solución que debe disponerse en el matr az aforado puede ser de 50 ml. (= 400 mg. de ácido ascórbico). En otros dos matraces aforados de 100 ml. se coloca el mismo volumen de la solución problema (50 ml. en el ejemplo dado) para la determinación aditiva (A: patrón interno) y para la prueba en blanco (B). La solución M se diluye hasta la señal de aforo, con agua. A la solución A se le añade el v lumen de la solución de ácido ascórbico que corresponda a la cantidad determinada en la valoración de tanteo inicial (en nuestro ejemplo 400 mg. = 1 ml. de la solución de ácido ascórbico). La solución B se trata con 5 ml. de una solución que contenga 0.2 g. de 2,6 diclorofenil-indofenol sódico en un litro de agua para oxidar el ácido ascórbico presente. A continuación, las soluciones A y B se diluyen asi mismo, hasta la señal de aforo con agua. A partir de este momento las tres soluciones se tratan del mismo modo. Se agitan y se vierten en los correspondientes embudos de separación (directamente, sin adicionar líquidos de lavado) y se extraen primeramente con 50 ml. de isobutanol y luego con 50 ml. de éter de petróleo. Se eliminan las capas orgánicas, 50 ml. de cada una de las fases acuosas se tratan con 2 ml. del reactivo de diazonio en otra serie de ampollas de decantación y se dejan reposar durante 5 minutos. Se extraen ahora con 30 ml. de isobutanol y 25 ml. de cada una de

las fases orgánicas se agitan con 5 ml. de hidróxido sódico 0.5 N., las extinciones de las capas acuosas de coloración rojizo-violeta procedentes de la determinación principal (M) y de la prueba aditiva (A) se mide a 540 nm., frente al blanco (B) en un espectrofotómetro o en un fotómetro con el filtro apropiado, (15, 16, 19).

Cálculo.

$$\frac{(A - E_m) \times C}{10 (EA - EM)} = \text{mg. por 100 de ácido ascórbico.}$$

donde A = ácido ascórbico añadido en mg.

E m= extinción del análisis principal (M)

EA = extinción de la prueba aditiva

C = número de gramos de la muestra que corresponden al volumen de la solución problema (extracto) del que se ha partido.

Observaciones.

E m. debe hallarse comprendida, en lo posible, dentro del intervalo de 4/10 a 6/10 de la extinción propia de la determinación aditiva. Si este requisito no se cumple totalmente, debe repetirse el análisis empleando una cantidad diferente de solución de ácido ascórbico o un volumen distinto de la solución problema.

Al extraer el producto de reacción de la fase isobutanólica con hidróxido sódico debe prestarse una especial atención, asegurándose de que el extracto acuoso es ciertamente alcalino. Si fuera ácido, no se lograría la completa extracción de la coloración rojizo-violeta. En este caso, se añade una gota de hidróxido sódico al 30 %, se agita la mezcla, se comprueba con papel indicador universal el pH resultante y se repite el tratamiento hasta que la fase acuosa sea alcalina.

Las soluciones finales acuosas y alcalinas (M, A y B) se enturbian con frecuencia después de su separación en las ampollas de decantación. Esta turbidez se debe a minúsculas gotas de isobutanol que se separan a partir de las soluciones saturadas en este disolvente como resultado de pequeños cambios en la temperatura (enfriamiento), y pueden evitarse o eliminarse añadiendo 1 ml. de etanol a cada una de las tres soluciones M, A y B.

Análisis Fotométrico de la Vitamina "C" con 2,4 Dinitrofenilhidrazina.

Fundamento.

El ácido dehidroascórbico reacciona con la 2,4 dinitrofenilhidrazina para formar la 2,4-nitrofenilhidrazina que se disuelve en un alto porcentaje de ácido sulfúrico originando una coloración rojiza. El máximo de absorción se halla a 520-525 nm. El ácido ascórbico reacciona únicamente -

después de su oxidación cuantitativa a ácido dehidroascórbico con un agente oxidante suave. Constituye un procedimiento comparativamente sencillo para determinar tanto el ácido dehidroascórbico como la vitamina "C" total.

El ácido 2.3 dioxo-L-gulónico, producto de oxidación desprovisto de actividad vitamínica C, de la misma reacción. La presencia de este compuesto puede determinarse aisladamente previa reducción con ácido sulfhídrico de todo el ácido dehidroascórbico presente en la muestra, sustrayéndose la cantidad resultante del contenido total en vitamina "C". La determinación del ácido 2-3 dioxo-L-gulónico es de poca importancia práctica, ya que su contenido en los productos naturales es normalmente muy pequeño en comparación con el ácido ascórbico. Por ello, no prestaremos más atención a este producto en el presente capítulo, (15, 16 y 19).

Oxidación a Acido Dehidroascórbico.

ROE y KUETHER tratan la solución problema con carbón activo (Norita) para convertir el ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico. También el bromo se emplea frecuentemente como agente oxidante. Nosotros hemos comprobado que el mejor reactivo que puede emplearse es el 2.6 diclorofenol-indofenol, un agente oxidante muy suave introducido inicialmente para el método de la dinitrofenilhidrazina por Bolin y Book.

Tiourea.

Para evitar la descomposición del ácido dehidroascórbico durante su condensación con la 2.4 dinitrofenilhidrazina, que requiere tres horas, se añade un poco de tiourea a la solución. De este modo se proporciona un medio débilmente reductor que, al mismo tiempo, impide la decoloración de la solución de 2.4-dinitrofenilhidrazina por cualquier producto de oxidación que pudiera formarse.

Condensación.

La velocidad de condensación entre el ácido dehidroascórbico y la 2.4 dinitrofenilhidrazina para dar la osaxona correspondiente se incrementa con la temperatura. Roe y Kuether realizan la reacción a 37°C. (tiempo: tres horas). Schaffert y Kingsley y Polk y colaboradores, la llevan a cabo sobre baño de agua hirviendo (tiempo: cinco-diez minutos). Sin embargo Ros, ha precisado que la glucosa, fructosa y ácido glucurónico reaccionan en proporción considerable a temperaturas que exceden los 37°C. de tal modo que se obtienen resultados anormalmente altos. Este error se produce incluso a 37°C., si la concentración de azúcares solubles es varias veces superior a la de vitamina C., tal como ocurre en jarabes, zumos de frutas, etc. Si las dinitrofenilhidrazonas de los azúcares solubles se separan de la del ácido dehidroascórbico por cromatografía en capa fina, deja de tener influencia la temperatura a la cual tiene lugar el proceso de condensación.

Aplicaciones.

El análisis fotométrico con 2,4 dinitrofenilhidrazina, es de aplicación general, siempre que la solución problema contenga como mínimo 2 mg. de vitamina C., por ml. Si la medida se realiza en microcubetas pueden determinarse, incluso, concentraciones menores. Sin embargo, dado que los métodos volumétricos, de más sencilla aplicación, proporcionan resultados satisfactorios en el caso de preparaciones farmacéuticas, el empleo del método de la dinitrofenilhidrazina se reduce, actualmente, el análisis de la vitamina C., en muestras biológicas. Puesto que el ácido ascórbico debe oxidarse siempre a dehidroascórbico antes de la reacción con dinitrofenilhidrazina este método es particularmente adecuado para el análisis de vitamina C., total en líquidos biológicos (sangre, orina) productos vegetales y alimentos piensos.

Reactivos.

Solución de ácido oxálico: 5 gr. de ácido oxálico se disuelven en agua hasta un litro.

Solución de ácido ascórbico: en un matraz aforado de 500 ml. se disuelven 50.0 mg. de ácido L (+)-ascórbico G. R. en 100 ml. aproximadamente, de la solución de ácido oxálico. La solución obtenida se diluye hasta la señal de aforo con el mismo disolvente. Una alícuota se diluye de nuevo hasta la concentración requerida para el ex-

perimento de referencia empleando la solución de ácido oxálico.

Solución de ácido tricloroacético: 12 gr. de ácido tricloroacético se disuelven en 100 ml. de agua.

Solución de tiourea: se disuelven 10 gr. de tiourea G. R. en 100 ml. de una mezcla de volúmenes iguales de etanol absoluto G. R. y agua.

Solución de 2,6 diclorofenol-indofenol: 0.25 gr. de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico G. R. se disuelven en 100 ml. de agua.

Eter dietílico G. R.

Solución de DNPH: se disuelven 2 mg. de 2,4-dinitrofenilhidrazina G. R. en 100 ml. de una mezcla de tres partes (v/v) de agua y una parte de ácido sulfúrico 95-97 % ($d=1,84$) G. R. La disolución se realiza cuando la mezcla está todavía caliente.

Acido sulfúrico al 85 %: se añaden cuidadosamente y con agitación, 85 gr. de ácido sulfúrico 95-97 % ($d=1,84$) G. R. a 15 ml. de agua, dispuestos en un recipiente enfriado en baño de hielo.

Método de Extracción.

Las muestras sólidas se extraen con solución de -

ácido oxálico mediante disgregación mecánica (por ejemplo en un disgregador-batidor eléctrico de cuchillas). En algunos casos, especialmente cuando se trata de materiales vegetales, es aconsejable hervir la solución de ácido oxálico (eliminando, de este modo, el aire disuelto) y emplearla cuando todavía está caliente. Las Proteínas se eliminan de los extractos vegetales y de la sangre (o suero) por adición de ácido tricloroacético. La solución de ácido oxálico se añade también a las muestras líquidas (por ejemplo: zumos de frutas) para estabilizar el ácido ascórbico. Si se espera que el contenido en vitamina C., sea bajo, puede añadirse a la muestra líquida la cantidad suficiente de ácido oxálico cristalizado para obtener una concentración final de ácido oxálico del 0.5 % aproximadamente. Una vez preparada para el análisis, la solución (o extracto) se diluye con la solución de ácido oxálico hasta que la concentración de vitamina C., se halle comprendida entre 5 y 50 mg. en 4 ml.

Oxidación.

Se añade un exceso de la solución de 2,6 diclorofenol-indofenol a un volumen no superior a los 50 ml. del problema en una ampolla de separación. Transcurridos dos minutos, el exceso de diclorofenol-indofenol se elimina por extracción con 50 ml. de éter. La capa acuosa se recoge en un matríz aforado de la capacidad adecuada (por ejemplo: 50 ml.) y la fase etérea se lava repetidamente con pequeñas porciones de la solución de ácido oxálico. Los líquidos de lavado se emplean para ir completando el volumen del matríz aforado.

Una vez se ha llegado hasta la señal de aforo-siempre con la solución de ácido oxálico se procede a filtrar si fuera necesario.

Condensación con Dinitrofenilhidrazina.

En dos matraces aforados de 10 ml. se pipetea un volumen comprendido entre 1-4 ml. de la solución de ácido de hidroascórbico, que contenga una cantidad prevista de 5-50 mg. de vitamina C. Si se emplea un volumen inferior a los 4 ml., las soluciones se llevan a este volúmen con la solución de ácido oxálico. Acto seguido, se añaden dos gotas de la solución de tiorea a cada uno de los matraces. Una de las dos soluciones (determinación principal, marcada con una S) se trata con 1 ml. de la solución DNPH y se agita: se mantiene en un termostato a 37°C., durante tres horas y finalmente se enfría en hielo durante diez minutos. La otra solución (determinación en blanco BI) se enfría también en hielo y se trata con 1 ml. de la solución de DNPH. Las dos soluciones se diluyen hasta la señal de aforo con ácido sulfúrico al 85 % - adicionado en porciones pequeñas y con agitación simultánea y se dejan reposar hasta la temperatura ambiente, (15 y 19).

Solución de Referencia.

La solución de referencia, conteniendo una cantidad de ácido ascórbico aproximadamente igual a la que se sos

pecha contiene la solución problema, se oxida con diclorofenol-indofenol y se condensa con la solución de DNPH de forma exactamente igual a la descrita en el párrafo anterior. El blanco de referencia se prepara de forma idéntica al blanco de la solución problema, añadiendo la solución de DNPH inmediatamente antes de la adición de ácido sulfúrico al 85 %.

Medida.

Las extinciones de las soluciones problema y de referencia se miden en cubetas de 2 cm. de un fotómetro adecuado en el máximo de absorción de 520-525 nm. (o se emplea el filtro apropiado) frente a las soluciones testigo correspondientes.

Cálculos.

$$\frac{E_s - E_{sBI}}{E_R - E_{rBI}} \times R \text{ (Mcg)} = \text{Mcg. de vitamina C., total en el volumen de la solución problema empleado para la condensación con DNPH.}$$

Acido Dehidroascórbico.

Si sólo interesa determinar el contenido en ácido-

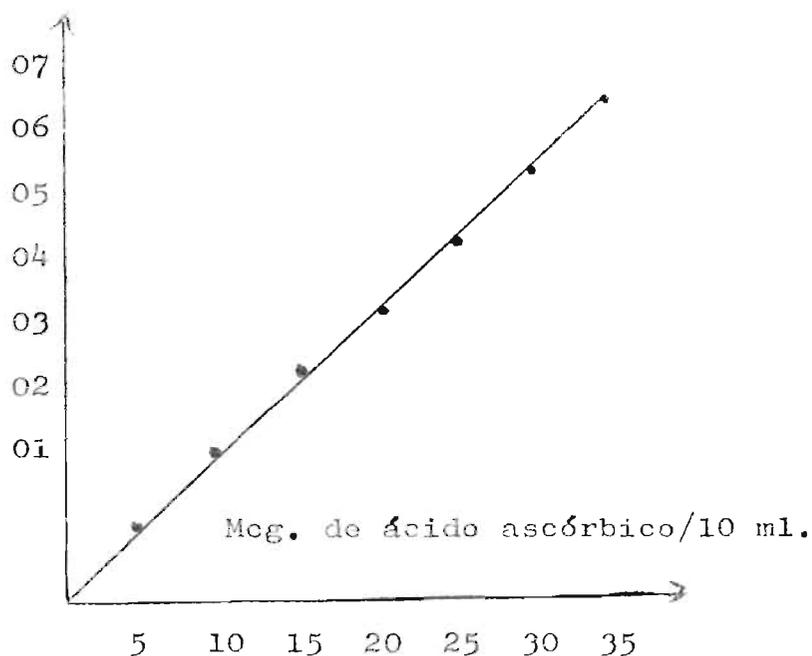
dehidroascórbico, se omite la oxidación inicial con 2,6-diclorofenol-indofenol. La diferencia entre el contenido total en vitamina "C" y el contenido en ácido dehidroascórbico da la cantidad de ácido ascórbico presente en la muestra.

Curva de Calibración.

Si este método se aplica al análisis rutinario de vitamina "C" es aconsejable construir una curva de calibración, siendo innecesario preparar una solución de referencia para cada ensayo, tal como se ha descrito anteriormente. Se oxidan con 2,6 diclorofenol-indofenol 10 ml. de una solución que contiene 250 Mcg. de ácido ascórbico y se extrae con éter. La capa acuosa se recoge y se diluye hasta la señal de aforo con los líquidos de lavado, empleando un matraz aforado de 25 ml. Se pipetea en matraces aforados de 10 ml. diversas porciones de la solución obtenida: 0,5 ml. (= 5 Mcg), 1,0 ml. (= 10 Mcg), 2,0 ml. (= 20 Mcg, 3,0 ml. (= 30 Mcg) y 4,0 ml. (= 40 Mcg) de ácido ascórbico. Las soluciones se disuelven hasta 4 ml. con la solución de ácido oxálico y se tratan a continuación, tal como se ha descrito anteriormente (condensación a 37°C., dilución con ácido sulfúrico al 85 %). Se miden las extinciones de estas soluciones en una cubeta de 2 cm. en el máximo de absorción de 520-525 nm. (o se emplea el filtro apropiado), frente a un blanco de reactivos (mezcla de 4 ml. de la solución de ácido oxálico, dos gotas de la solución de tiorea, 1 ml. de la solución de DNPH y 5 ml. de ácido sulfúrico al 85 %). Las extinciones se representan frente a los pesos correspon

dientes de ácido ascórbico en 10 ml. de la solución final.

Curvas de calibración para el análisis fotométrico de la vitamina C con 2,4 dinitrofenilhidrazina.



Análisis de Vitamina "C" en Alimentos de alto Contenido Azucarado.

Fundamento.

Los azúcares solubles interfieren con el análisis. En efecto, estos compuestos reaccionan con la dinitrofenilhidrazina formando osazonas amarillentas: aunque el máximo de absorción de estas osazonas se halla desplazado hacia menores longitudes de onda, absorben sin embargo, con la suficiente intensidad en la región de 520-525 nm. para proporcionar un valor erróneamente alto de la concentración en vitamina C., las osazonas interferentes pueden eliminarse por cromatografía en capa fina.

Reactivos.

Placas de silica-gel. Las placas de silica-gel se preparan empleando Silica-gel H o silica gel G para cromatografía en capa fina, según STAHL. Las cromatoplacas no se activan en estufa, sino que se dejan secar simplemente al aire.

Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol al 0.5 %: -
0.5 g. de 2,6-diclorofenol-indofenol G.R.: se disuelven en 100 ml. de agua.

Acido acético glacial aprox. 96 % ($d = 1.055-1.064$) G.R.

Cloroformo G. R. (que contiene alrededor del 1 % de etanol).

Acetato de etilo para cromatografía.

Acetona G. R.

Método.

En un matraz aforado de 100 ml. se pipetea de 50 a 90 ml. de la solución problema, que contengan de 2 a 20 mg. de vitamina C., se acidifican, si fuera necesario, con la solución de ácido oxálico. Se añade ahora, agitando, un exceso de la solución de 2,6-diclorofenol-indofenol al 0,5 %. La mezcla se diluye hasta la señal de aforo con agua, se agita varias veces y se deja reposar durante unos cinco minutos. -

Si el exceso de 2,6-diclorofenol-indofenol (ácido libre) se separa formando un precipitado cristalino, no requiere su eliminación por filtración.

Cuando se manejan soluciones y extractos fuertemente coloreados resulta a menudo difícil saber si se ha añadido o no un exceso de 2,6 diclorofenol indofenol. Dado que 1 ml. de la solución al 0,5 % puede oxidar alrededor de 3 mg. de ácido ascórbico, el volumen de 2,6 diclorofenol-indofenol que se requiere puede calcularse previamente de forma aproximada, siempre que se conozca el orden de magnitud de la concentración de vitamina C., existente en la muestra. Por ejemplo el zumo de uva (tinto) contiene normalmente de 200 a 250 mg. de vitamina C., por litro; deben emplearse alrededor de 75 ml. de zumo, acidificarse y oxidar el ácido ascórbico por adición de 15 ó 20 ml. de la solución de diclorofenol-indofenol (corresponde a un exceso del 100 % aproximadamente de agente oxidante).

Solución de Referencia.

Una alícuota de la solución de ácido ascórbico, con un contenido similar al de la cantidad de muestra empleada en el análisis, se diluye al mismo volumen inicial y se trata a continuación de forma exactamente igual (oxidación, etc.).

Condensación.

Se coloca en los respectivos tubos de ensayo un vo-

lumen no inferior a los 2 ml. ni superior a los 10 ml. de la muestra pretratada y de las soluciones de referencia, que contengan entre 100 y 1000 mcg. de vitamina C., para precipitar las osazonas se añaden 0,5 ml. de la solución de tiourea y un volumen de la solución de DNPH que equivalga aproximadamente a 1/5 del empleado (1-2 ml.). Se mezcla el contenido de cada uno de los tubos, se mantienen en un termostato a unos 70°C., durante tres horas y finalmente se enfrían en hielo durante diez minutos. Los precipitados rojos o pardo-rojizos que se forman se recogen en embuditos de placa filtrante (1 G3 ó 1 G4), se lavan con agua hasta que los filtrados son incoloros, y finalmente, se disuelven recuperándose del filtro con acetato de etilo caliente o acetona. Las soluciones de los precipitados respectivos se recogen en matraces de fondo redondo y se evaporan hasta sequedad a presión reducida. Los residuos se redisuelven en 5 ml. de acetona, exactamente medidos (empléese, pipeta aforada).

Cromatografía en Capa Fina.

Alícuotas iguales de la solución problema y de referencia cada una en volúmenes de 0.1 a 1,0 ml. y conteniendo osazonas que correspondan a 20-50 mg. aproximadamente, de ácido ascórbico se colocan "en banda" sobre la placa de sílica-gel, empleando pipetas graduadas (con banda de Schellbach) de 0,1. 0.2, 0.5 ó 1,0 ml. de capacidad. Tal como se muestra en lámina 6, las bandas de las soluciones de referencia y problema son de igual longitud. La placa se coloca en una cámara cromatográfica que contenga el disolvente de desarrollo -

cloroformo/ acetato de tilo/ácido acético, 60:35:5). El tiempo de desarrollo es de alrededor de una hora. Una vez retirada la cromatoplaca de la cámara cromatográfica, se recogen inmediatamente con una espátula las zonas, perfectamente definidas, de coloración rojo-ladrillo correspondiente a la muestra y referencia. El polvo obtenido se coloca en los respectivos tubos de centrifuga, tratándose a continuación con 5 ó 10 ml. (exactamente medidos con pipeta aforada) de ácido sulfúrico - hasta que se obtienen suspensiones homogéneas de coloración roja.

Las suspensiones se centrifugan y las soluciones transparentes que se obtienen se miden frente a agua en un fotómetro, empleando una longitud de onda de 520-525 nm. o el filtro de color apropiado, (15).

Cálculo.

$\frac{E_s}{E_r} \times R = \text{mg. de vitamina C., total en el volumen de la solución problema empleado,}$

donde E_s = extinción de la solución problema.

E_r = extinción de la solución de referencia.

R = cantidad (en mg.) de ácido ascórbico presente en el volumen de la solución de referencia - utilizado.

Observaciones.

Si la solución problema (o el extracto) contiene -

una concentración muy alta de sustancias disueltas (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, sales, etc.), ocurre con frecuencia que las dinitrofenilhidrazina no se separan en forma suficientemente cristalina, tal como lo hace la dinitrofenilhidrazina del ácido dehidroascórbico contenido en la solución de referencia. El precipitado formado puede ser tan fino - que pase a través del filtro o bloques sus poros. En estos casos, el producto de condensación debe dejarse reposar durante toda la noche a la temperatura ambiente, después de haber calentado a 45-50°C., durante dos horas. De este modo - el precipitado adquiere el tamaño de cristal adecuado y su filtración es mucho más fácil. También es aconsejable emplear un patrón interno, en el cual las condiciones de precipitación son idénticas a las de la solución problema. En este experimento paralelo se añade a la solución problema un volumen igual de ácido ascórbico al estado de la solución de ácido ascórbico, que contenga la cantidad prevista en el volumen de solución problema empleado. Esta adición se realiza antes de la oxidación con diclorofenol-indofenol. La mezcla se trata de formar exactamente igual a la solución problema a la que no se ha añadido ácido ascórbico. El contenido en vitamina C., se calcula como sigue:

$$\frac{Es}{Eist - Es} \times \text{cantidad añadida (mg.)} = \text{mg. de vitamina C., total en el volumen de solución problema empleado.}$$

donde Es = extinción de la solución problema

Eist = extinción del patrón interno.

Las dificultades que se presentan en la filtración del precipitado pueden eliminarse extrayendo las dinitrofenilhidrazina con 30 ml. de acetato de etilo. La extracción se repite con otros 20 ml. de acetato de etilo y los extractos combinados se evaporan hasta alcanzar un pequeño volumen de tal modo que pueda aplicarse a la placa de sílica-gel 1 ml. de la solución final correspondiente a unos 20-50 mcg. de ácido ascórbico.

La solución de referencia se trata de idéntica forma.

La separación cromatográfica de las dinitrofenilhidrazinas puede mejorarse a menudo, practicando un segundo desarrollo. En este caso, después de una hora, aproximadamente de desarrollo, cromatoplaca se retira de la cámara cromatográfica, se deja evaporar el disolvente y la placa se coloca de nuevo en la cámara cromatográfica. Después de este segundo desarrollo, la banda rojiza de la vitamina C., es suficientemente nítida y pura, en general, para proceder a su valoración cuantitativa.

ANALISIS POLAROGRAFICO DEL ACIDO ASCORBICO

Intervalo de pH.

El mejor intervalo de pH para el análisis polarográfico del ácido ascórbico es el comprendido entre 3 y 6. A mayores valores de pH el ácido ascórbico se oxida muy rápidamente. Por otra parte, en soluciones de mayor acidez la onda anódica presenta una curva poco aguda y, por tanto no puede determinarse con exactitud. La adición de oxalato sódico protege la oxidación.

Especificidad.

El ácido dehidroascórbico no se determina por polarografía. Interfieren otras "reductoras", pero las ondas correspondientes pueden ser eliminadas normalmente por adición de formal-dehído. Los haluros afectan notablemente la medida, especialmente cuando se trabaja a valores bajos de pH. Sin duda, el análisis polarográfico es menos exacto que la valoración oxidimétrica. Sin embargo, para el análisis de ácido ascórbico en fórmulas farmacéuticas complejas y en productos naturales la menor exactitud se contraresta por su mayor especificidad. Además la polarografía tiene la ventaja de una mayor sencillez de realización que los métodos fotométricos.

Concentración.

La mayor exactitud se consigue a concentraciones -

comprendidas entre 25 y 250 mg. de ácido ascórbico por ml. - Debe prestarse una especial atención al estado del electrodo de colomelanos ya que, si es deficiente, pueden producirse - alteraciones tanto en el orden de las ondas como en los po - tenciales de semi onda.

Para la valoración cuantitativa puede emplearse - bien sea una curva de calibración, construída para intervalo indicado (25-250) mcg./ml.) o bien puede realizarse una de - terminación aditiva (patrón interno).

Reactivos.

Acido acético 2 N: 125 g. de ácido acético glacial aprox. 96 % (d-1,055-1,064) G.R. se diluyen hasta un litro - con agua.

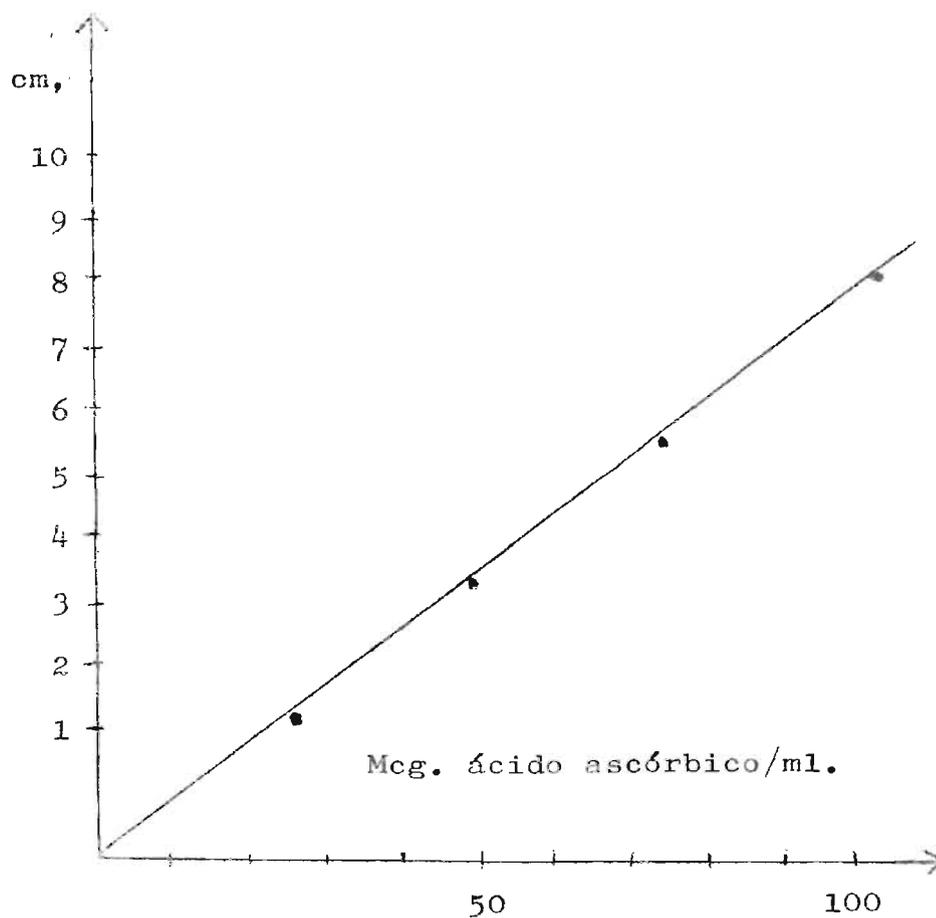
Acetato sódico 2 N: Se disuelven hasta un litro - con agua 272.2 g. de acetato sódico G. R. que no presente - reacción con permanganato potásico, según Reinitzer.

Solución de formaldehído al 35 % peso G.R.

Oxalato disódico G. R.

Eter de petróleo: Bencina de petróleo G. R. con - punto de ebullición de 40° C., aproximadamente, (15).

(Altura de onda)



Curva de calibración para la determinación polarográfica del ácido ascórbico.

Electrolito de Soporte.

Potencial de Semionda.

Se mezclan 75 ml. de ácido acético 2 N con 375 ml. de acetato sódico 2 N. en un matraz aforado de 500 ml. Se añaden 5 ml. de la solución de formaldehído y la mezcla resultante se diluye hasta la señal de aforo con agua.

La solución obtenida se satura con oxalato sódico y -

se filtra. El filtrado se emplea como electrolito de soporte y tiene un pH. de alrededor de 5.5. En esta solución de fondo el potencial de semionda del ácido ascórbico es de + 0,07 voltios aproximadamente, (15).

Método.

A continuación se dan algunos ejemplos para ilustrar el procedimiento experimental del análisis polarográfico.

Grageas.

a) Comprimidos polivitamínicos (contenido en vitamina C. 100 mg.). Se pulveriza en un mortero una gragea y el polvo se disgrega con una gota de ácido acético glacial y algunos ml. de agua. La suspensión resultante se diluye hasta 100 ml. en un matraz aforado y se filtra 10 ml. del filtrado se colocan en otro matraz aforado de 100 ml. y se diluyen hasta la señal de aforo con el electrolito de soporte. Se pasa corriente de nitrógeno a través de la solución, que se determina polarográficamente; (ánodo) desde 0,3 voltios. La altura de la onda se convierte en la cantidad de ácido ascórbico por ml. de la solución analizada mediante la oportuna curva de calibración. Multiplicando por 1.000 se obtiene el peso de ácido ascórbico por gragea.

Cápsulas.

b) Cápsulas polivitamínicas que contienen una pre-

paración oleosa (contenido indicado en vitamina C: 50 mg.). - Se abre una cápsula con una cuchilla de afeitar y su contenido se traslada cuantitativamente en un embudo de separación empleando 40-50 ml. de éter. Los restos de la cápsula se lavan con 20 ml. de agua a los cuales se ha añadido una gota de ácido acético glacial y los líquidos de lavado se adiciona a la ampolla de separación.

Se cierra el embudo con un tapón esmerilado y se agita vigorosamente durante un minuto. Cuando las fases se han separado completamente, la capa acuosa se recoge en un matraz aforado de 50 ml. y la capa etérea se lava con dos porciones de 10 ml. de agua. Los extractos acuosos combinados se diluyen hasta la señal de aforo (50 ml.) con agua 10 ml. de la solución resultante se diluyen hasta 100 ml. con el electrolito de soporte en un matraz aforado de 100 ml. La solución obtenida se determina polarográficamente tal como se ha descrito en grageas.

Zumo de uva (Tinto).

c) 10 ml. del mosto se diluyen con 10 ml. del electrolito de soporte. Si el pH de la mezcla es inferior a 5.5, se ajusta a este valor (emplear electrodo de vidrio) mediante la adición gota a gota, de una solución de hidróxido sódico. Se pasa una corriente de nitrógeno a través de la solución la cual se determina polarográficamente (anódicamente) a partir de 0.3 voltios. La medida exacta de la onda se consigne únicamente cuando existen altas concentraciones de ácido ascórbico.

Si el contenido en ácido ascórbico del zumo vegetal es menor de 25 mg/ml. es posible determinarlo cuantitativamente por polarografía siempre que se añada el electrolito de soporte una cantidad exactamente pesada de ácido ascórbico. De este modo se incrementa su concentración en la solución a valorar, obteniéndose ondas polarográficas que pueden servir para determinaciones cuantitativas. Para calcular la cantidad de vitamina presente originalmente en la muestra basta con sustraer de los resultados obtenidos el valor correspondiente al ácido ascórbico añadido.

Métodos Biológicos.

Los primeros análisis de vitaminas se hicieron empleando métodos biológicos. Los efectos específicos producidos por las vitaminas en animales de experimentación sirvieron de base para la (Valoración) cuantitativa de las mismas. Los métodos químicos, Físico-químicos y Microbiológicos se han ido desarrollando gradualmente. Todavía hoy, los métodos biológicos son a veces indispensables para la determinación de vitamina. Así, en la valoración de la Vitamina "D" solo se obtiene la adecuada especificidad empleando el ensayo biológico, puesto que los métodos químicos no son suficientemente específicos ni sensibles para las concentraciones de vitaminas "D" empleadas habitualmente en estos productos de nutrición animal. A pesar de la indiscutible ventaja que les proporciona su mayor selectividad, el empleo de los métodos biológicos se ha venido limitando sucesivamente, ya que requieren mayor tiempo para su ejecución, son normalmente caros y sus límites de -

error son con frecuencia muy amplios. La experimentación con animales ha quedado restringida por ello, a los casos en los que no pueden aplicarse los métodos químicos o físico-químicos a causa de que la concentración vitamínica es demasiado baja o porque lo imposibilitan algunos factores interferentes. También se recurre a los métodos biológicos cuando se quiere determinar la facilidad de absorción o liberación de las vitaminas presentes en preparaciones farmacéuticas.

Los métodos biológicos están basados en el examen directo del alimento, órgano o producto medicamentoso, como fuente de vitamina "C" para la cobaya en carencia. Las pruebas Biológicas pueden ser empleadas en dos formas diferentes: 1o.) Como prueba preventiva y 2o.) como curativa. El preventivo consiste en administrar a las cobayas sometida a una dieta sin vitamina "C" una cantidad conocida de ella y determinar la cantidad mínima que permite el crecimiento y consiguiente aumento de peso. La Prueba Curativa, por el contrario consiste en la cantidad necesaria para que el aumento de peso de crías en carencia de vitamina "C" vuelva a manifestarse. Otros autores en vez de estudiar la evolución ponderal en los animales, utilizan como testigo el estado de los dientes. Estas pruebas biológicas deben realizarse comparando la actividad antiescorbútica del preparado que se investiga con la de un producto patrón de composición fija y actividad conocida.

Estas comparaciones deben hacerse con el producto patrón internacional establecido en 1943 que está formado por ácido ascórbico levógiro cristalizado; para su empleo se di

suelve en agua destilada recientemente hervida y fría. La -
Unidad Internacional de esta vitamina es la actividad anties-
corbática de 0.05 mg. de este producto.

Valoración de la Vitamina "C" por el Método del Crecimiento -
Curativo.

Se utilizan cobayos de un peso aproximado de 250 gr. a los que se administra una dieta carente de vitamina C., hasta que empiezan a perder peso. Cuando han disminuído entre 10 y 20 gr. Se les administra la vitamina, para la valoración, se establecen grupos de unos 6 cobayos, uno de los cuales queda como control, sin recibir la vitamina C., los demás grupos recibirán dosis diferentes de ácido ascórbico standard y del preparado cuya actividad queremos determinar. La comparación del aumento de peso de los animales que han recibido el standard y el producto problema permite la determinación cuantitativa de éste.

Antes de administrar la dieta libre de vitamina C., es necesario tener a los animales que van a ser empleados, en las jaulas donde se realizará la experiencia, durante un tiempo suficiente para que se habitúen a las condiciones de ella, pues es muy frecuente que al colocar a los cobayos en las jaulas, empiezan a perder peso; por ello es recomendable hacerlo de la siguiente forma: grupos de 6 cobayos se colocan en jaulas, en el interior del Laboratorio y se empieza a administrar la dieta misma carente de vitamina que va a ser utilizada para la experiencia, pero adicionándole 15 a 20 gr. de verdura día

ria por animal. Cuando el aumento de peso se manifiesta uniforme y regular se suprime la adición de verdura o de ácido - ascórbico y se comienza el verdadero período de experimentación. Y a los 15 ó 20 días de tratamiento, empieza a aparecer los primeros síntomas de escorbuto y el peso comienza a - descender. Cuando el peso ha disminuído 10 ó 15 gr. se administra a los diferentes lotes dósís distintos del standard y del problema, anotándose cuidadosamente, los resultados de pesadas en una gráfica. A los 10 días de administración de los preparados, se interrumpe la experiencia reintegrando los cobayos al criadero y se dará dieta abundante de verdura. Los pesos de cada cobaya por lote, reúnen en una gráfica común y se comparan los resultados de los diferentes lotes, (2, 16).

Determinación de la Vitamina "C" por el Método del Crecimiento Profiláctico.

Se seleccionan tres lotes de 6 cobayos, de un peso aproximado de 250 gr. y se les somete a dieta comercial durante seis semanas. Desde el primer día de experiencia se administra a uno de los lotes, diariamente y por cabeza, 5 unidades internacionales del Standard; a otro lote 10 unidades internacionales del mismo producto y al tercer lote, una cantidad del producto problema que sospechamos se encuentra comprendido entre 5 y 10 unidades internacionales. Al cabo de 6 semanas se calcula la diferencia de peso de cada lote, en relación a su peso inicial y se construye la correspondiente -- gráfica, en la que se dispone en la ordenada, los aumentos de peso, y en la abscisa, los logaritmos de dosis.

Se traza una línea recta entre los dos puntos correspondiente a las dosis del standard y se calcula mediante ella, el valor a que corresponden el aumento de peso producido por el problema, (2, 12).

Determinación de la Vitamina "C" por el Método de los Dientes.

Algunos autores han propuesto para determinar cuantitativamente el grado de curación de los animales, en vez de emplear como criterio el aumento de peso, el estudio de las modificaciones histológicas de los dientes. Esta técnica ha sido modificada por diferentes autores y su exactitud es mayor que la de los métodos anteriormente descritos y el error máximo no suele sobrepasar al 10 %.

Método de Key y Elphick.

Estos autores adoptaron una escala, con la que pueden comparar las variaciones histológicas apreciadas lo que facilita la valoración. Para esta prueba se seleccionan varios grupos de 4 a 6 cobayos a los que se someten a una de las dietas escorbútigenas. A uno de los lotes se administra por día y animal 20 unidades internacionales de producto patrón y a otros grupos, dosis diferentes del producto problema en una proporción aproximada de 20 unidades a los 14 ó 21 días se sacrifica a los animales y se preparan los dientes para su examen histológico. Esta preparación de los dientes re -

quiere varias manipulaciones como: fijación, descalcificación, inclusión en parafina o gelatina, (2, 19).

Preparación de los Dientes.

Una vez sacrificado el animal se procede a la extracción de los dientes, lo que hará con mucho cuidado para que no se rompan. Por lo general se disecan y limpian bien sólo los maxilares inferiores de los distintos animales aunque hay autores que recomiendan emplear también los inferiores. El maxilar debe extraerse completo sin partir en las 2 mitades. El hueso limpio así extraído se deja en líquido de Bouin que se acabará de preparar. En este líquido se dejan los maxilares durante 2 ó 3 días, transcurrido este tiempo, se lavan bien, poniéndolos dentro de un cestillo de alambre que se introduce en un cristizador y se deja correr agua abundante durante 15 minutos. Una vez lavados, se introducen en: 1o.) alcohol de 95°, 2⁴ h., 2o.) agua; 3o.) ácido nítrico al 4 % (para decalcificar) 24 h.; 4o.) lavado abundante con agua durante 30 minutos; 5o.) sulfato de Na al 5 % 24 h.; 6o.) lavado con H₂O durante 2 h. poniéndose después las piezas en alcohol 35°, durante 30 minutos. Otros 30' en alcohol de 70° pasándolos durante igual tiempo en alcohol de 95° y dejándoles alcohol absoluto durante 24 h., más. Una vez descalcificados y deshidratados, se pasan al xilol benzol o cloroformo, donde permanecerán las piezas hasta que su transparencia confirma la completa penetración del reactivo; se escurren en 1 papel filtro y se ponen en parafina fundida durante cierto tiempo; que puede oscilar entre 1 y 24 h. Luego se escurre la pieza

y se vuelve a introducir en parafina de 1 punto de fusión - más elevado. Al cabo de 1 h. se forma el bloque orientando bien la pieza se deja enfriar y a la $\frac{1}{2}$ h. se quita la parafina sobrante procurando dejar la pieza en el centro y formar 1 cubo de caras planas que se colocará en el microtomo. Los cortes se harán muy finos de unos 5 u. próximos a la raíz y en dirección transversal al diente se coloca en placas de petri, preparados con agua caliente a 39° - 40° C, para que no se funda la parafina. Una vez extendidos los cortes se colocan en el portaobjetos y se dejan en estufa a temperatura de 40° C, durante 24-48 h. Se quita la parafina con xilol; el xilol con alcohol absoluto y se empieza a hidratar lentamente, primero con el alcohol rectificado y añadiendo después poco a poco agua.

Se tiñe por el procedimiento que se desee; generalmente hematoxilina eosina.

Las modificaciones histológicas producidas por la dieta se clasifica en 5 grados, ordenados del 0 al 4.

El grupo 0 representa el grado máximo del escorbuto y el # 4 del animal normal.

El cálculo de los resultados puede verificarse hallando la dosis que produce el mismo grado de prevención en ambos productos que se comparan.

También puede construirse una curva característica con el standard y determinar en ella la concentración corres

pondiente al grado de prevención hallado para cada animal del lote que recibió las 20 unidades del standard y se determina el valor medio para los animales de este grupo. Se repite lo mismo para los animales del otro grupo que han recibido el producto problema. Los 2 valores así obtenidos se llevan a la gráfica donde se puede apreciar la dosis diaria relativa a que corresponden. Estos nuevos valores se relacionan entre sí dividiendo el correspondiente al producto problema por el del standard y multiplicando el cociente así obtenido por 20. Este último producto representa el número de unidades internacionales que posee el producto problema por cada dosis diaria administrada.

Métodos Microbiológicos.

Los métodos microbiológicos han sido ampliamente utilizados en la determinación de las vitaminas del grupo B. Debido principalmente a su gran sensibilidad y alta especificidad, estos métodos son los preferidos en muchos laboratorios, especialmente para la investigación de vitaminas en materiales de origen natural. La especificidad y exactitud de los métodos MICROBIOLÓGICOS pueden incrementarse, con frecuencia, mediante la aplicación de métodos modernos de separación (CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO-IONICO CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, etc.).

Los métodos microbiológicos para determinación de vitamina se basa en la observación de que algunos microorganismos de características bien definidas, pueden multiplicar-

se y producir ciertos productos metabólicos únicamente en presencia de las vitaminas. Estos microorganismos se cultivan en un medio nutritivo óptimo. Si entonces se inoculan en un medio nutritivo que carecen de un compuesto vitamínico determinado, el crecimiento se inhibe totalmente. Cuando el substrato que contiene la vitamina en estudio se añade al medio inicialmente transparente por ausencia de crecimiento, la multiplicación del microorganismo causa una turbidez que puede ser medida fotométricamente. Además de la medida turbidimétrica, los productos metabólicos formados por el microorganismo pueden determinarse cuantitativamente; por ejemplo, puede valorarse volumétricamente la mezcla de ácido producido por algunos microorganismos a partir de la glucosa suplementada al medio. La valoración fotométrica de la reacción de crecimiento es más sencilla y puede llevarse a cabo con mayor rapidez. Si se añade cantidades crecientes de la muestra problema, la turbidez del medio, que refleja el mayor crecimiento, se incrementa gradualmente, y dentro de un cierto intervalo de concentración es directamente proporcional a la cantidad de vitamina presente. Dentro de este intervalo llamado de "requerimiento para un desarrollo equivalente a la mitad del máximo", pueden compararse con gran precisión los efectos causados por la adición de la muestra problema y de una solución de referencia que contiene la vitamina pura, (20).

C O N C L U S I O N E S

1o. Métodos Físicos.

El más usado es el espectrofotométrico.

2o. Métodos Químicos.

Estos métodos se basan en el gran poder reductor del ácido ascórbico. Entre los más empleados se encuentran: Soluciones de Yodo; de 2,6 - diclorofenolindofenol; siendo este último el más extendido hoy día.

3o. Métodos Bioquímicos.

El más usado es el de RANDOIN Y LEBLOND, basado en el hecho de que cuando se administra a Cobayos, raciones aportando cantidades diferentes de ácido ascórbico, se encuentra en los órganos de los animales, dosis de vitamina C., que están en relación con la ingerida en la alimentación.

4o. Métodos Biológicos.

Estos métodos son usados en las plantas de fa -

bricación de la vitamina C., y se emplean con igual intensidad, los preventivos y curativos.

B I B L I O G R A F I A

1. DEL POZO., Enciclopedia Farmacéutica.
2. Dr. JOSE RUIZ GIJON, Métodos Biológicos de Valoración de Medicamentos.
3. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XII
4. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XIII
5. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XIV
6. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XV
7. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XVI
8. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XVII
9. Farmacopea de Estados Unidos, Tomo XVIII
10. Formulario Nacional, Tomo IX
11. Formulario Nacional, Tomo X
12. Formulario Nacional, Tomo XI
13. Formulario Nacional, Tomo XII
14. Formulario Nacional, Tomo XIII

15. ROLF STROHECKER, Análisis de Vitaminas.
16. KIRK OTHMER, Enciclopedia de Tecnología Química, Tomo XIII.
17. Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemists, Tomo IX.
18. Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemists, Tomo X.
19. Font Over, Medicamenta, Tomo I.
20. MARTIN COOK, Farmacia Práctica de Remington.