

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) por HPLC”.**

**Disertación previa a la obtención del Título Licenciado en Ciencias Químicas,  
especialización en Química Analítica.**

**MARÍA FERNANDA MONTAÑO ALARCÓN**

**Quito 2011**

*“Todos los días Dios nos da un momento en que es posible cambiar todo lo que nos hace infelices. El instante mágico es el momento en que un sí o un no pueden cambiar toda nuestra existencia”*

Paulo Coelho

Certificación de la finalización de la disertación:

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, especialización Química Analítica, de la candidata María Fernanda Montaña Alarcón, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 31/03/11

---

Mgr. Pablo Pozo

## **DEDICATORIA**

Dedicó el presente trabajo a:

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período.

A mi familia por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes. En especial a mi mamá y a mi hermano Guido, por enseñarme que todo esfuerzo es al final recompensa.

A mis dos angelitos, Luisito y Matías, a mi esposo Daniel; porque gracias a ellos tuve la fortaleza para enfrentar los obstáculos y hacerlo todo por ellos y para ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento:

A La Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Escuela de Ciencias Químicas, sus autoridades, docentes y personal administrativo.

Laboratorio Centrocasal. Cia. Ltd, a sus directivos y trabajadores.

A mi director de tesis Mgtr. Pablo Pozo, por ser un gran apoyo y guía. A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todo las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría: David, Kari, Adrián, Tefa, Santy, Michelle, Raque, Gabi y Ale .

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I.....	7
1. ANTECEDENTES GENERALES .....	7
1.1. LA VITAMINA C .....	7
1.1.1. HISTORIA.....	7
1.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA .....	7
1.2. FUNCIONES .....	9
1.3. FUENTES DE VITAMINA C.....	10
1.3.1. CITRICOS. Naranja (Citrus aurantium), Limón (Citrus aurantifolia) y Mandarina (Citrus reticulata).....	12
1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	14
1.4.1. COMPONENTES DE HPLC .....	15
CAPITULO II.....	18
2. MATERIALES Y METODOS .....	18
2.1. EQUIPO .....	18

2.2. REACTIVOS .....	20
2.3. MATERIALES .....	20
2.4. SOLUCIONES PREPARADAS.....	20
2.5. ANALISIS Y CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	21
2.5.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	22
2.5.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	22
2.6. DESARROLLO DEL MÉTODO .....	23
CAPÍTULO III .....	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
3.1. MÉTODO DE ANÁLISIS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	24
3.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA .....	29
3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	35
3.4. DISCUSION .....	40
CAPÍTULO IV .....	42
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	42
4.1. CONCLUSIONES .....	42
4.2. RECOMENDACIONES .....	43
5. BIBLIOGRAFIA .....	44

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 CUADRO DE ALIMENTOS QUE CONTIENEN VITAMINA C .....	11
TABLA 1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA NARANJA, LIMÓN Y MANDARINA ...	13
TABLA 2.1 CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO A PARTIR DE LA SOLUCIÓN MADRE.....	21
TABLA 3.1 CONDICIONES OPTIMIZADAS PARA HPLC.....	27
TABLA 3.2 LECTURA DE LOS ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DEL DÍA 1.....	30
TABLA 3.3 LECTURA DE LOS ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DEL DÍA 2.....	31
TABLA 3.4 LECTURA DE LOS ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DEL DÍA 3.....	33
TABLA 3.5 RESUMEN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN, COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL, INTERCEPTOS, MEDIAS ARITMÉTICAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	34
TABLA 3.6 RESULTADOS DEL PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN POR TRIPLICADO PARA EL DÍA 1. ....	38

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 ESTRUCTURA DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO .....	8
FIGURA 1.2 OXIDACIÓN DEL ÁCIDO L- ASCÓRBICO .....	9
FIGURA 1.3 ESTABILIDAD DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO CON ÁCIDO METAFOSFÓRICO .....	9
FIGURA 1.4 NARANJA (CITRUS AURANTIUM), LIMÓN (CITRUS AURANTIFOLIA) Y MANDARINA (CITRUS RETICULATA).....	12
FIGURA 1.5 COMPONENTES DEL HPLC.....	15
FIGURA 2.1 EQUIPO.....	19
FIGURA 3.1 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS .....	28
FIGURA 3.2 GRÁFICO DE LA PRIMERA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	30
FIGURA 3.3 GRÁFICO DE LA SEGUNDA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	32
FIGURA 3.4 GRÁFICO DE LA TERCERA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	33
FIGURA 3.5 DIAGRAMA DE ANÁLISIS DE MUESTRAS POR DÍA. ....	36
FIGURA 3.6 CROMATOGRAMA DE ÁCIDO ASCÓRBICO. ....	37

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Certificado del estándar de Vitamina C (ácido ascórbico) marca Chemservice.

**Anexo 2.** Cromatogramas de las concentraciones de Vitamina C, utilizados para construir las curvas de calibración.

**Anexo 3.** Datos generales del análisis de muestras.

**Anexo 4.** Métodos de determinación de vitamina C de la OAC y USP.

## **ABREVIATURAS**

HPLC: en inglés, High Performance Liquid Chromatography.

UV-VIS: ultravioleta-visible.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

p.a: para análisis.

## RESUMEN

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio Centrocasal Cia. Ltda, donde se determinaron las condiciones analíticas adecuadas para cuantificar vitamina C en: naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*), por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta – visible (HPLC UV-VIS), utilizando para la extracción ácido metafosfórico al 6%.

El método consistió en determinar las condiciones óptimas para cuantificar la concentración de vitamina C, ya que ésta es inestable y fotosensible, por ello, fue importante conocer los parámetros que eviten las pérdidas del analito. Estos parámetros fueron: cantidad de muestra, eluyente y tiempo de análisis. Se optimizaron las condiciones cromatográficas para HPLC con una columna C18, marca Waters, 5  $\mu\text{m}$  de partícula, 150 x 3,9 mm de diámetro, las condiciones establecidas fueron: fase móvil metanol:agua con una elusión isocrática de 90:10, cantidad de muestra de 20 $\mu\text{L}$ , flujo 1.2mL/min, longitud de onda 245nm y se trabajó a temperatura ambiente, evitando siempre la presencia de luz solar.

Se determinó la cantidad de vitamina C en los frutos cítricos a partir de la elaboración de tres curvas de calibración para cada día de análisis, utilizando un estándar de ácido ascórbico certificado; dando como resultado que la naranja (*Citrus aurantium*) contiene 56.46 mg/g, limón (*Citrus aurantifolia*) 41.57 mg/g y mandarina (*Citrus reticulata*) 32.75 mg/g.

**Palabras Claves.** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, vitamina C, extracción, fotosensible.

## ABSTRACT

This Study was developed in the laboratory Centrocasal Cia. Ltda, where the proper analytical conditions to quantify vitamin C in: orange (*Citrus aurantium*), lemon (*Citrus aurantifolia*) and tangerine (*Citrus reticulata*), by high performance liquid chromatography with ultraviolet – visible detector (HPLC UV-VIS), using an extraction with 6% metaphosphoric acid solution.

The application of this method was to try the optimum conditions to determine the concentration of vitamin C, because this is unstable and photosensible, for that, it was important to know the circumstances that evaded analyte loss. These circumstances were: sample amount, eluent and analysis time. The chromatographic conditions were optimized to HPLC with a C18 column, brand Waters, 5 µm of particle diameter, 150 x 3,9 mm diameter, the established conditions were: mobile phase methanol : water with an isocratic elution of 90:10, sample amount of 20 µL, 1.2mL/min flow, wavelength 245nm and room temperature, always evading sunlight presence.

Vitamin C in citric fruits was determined from the elaboration of 3 calibration curves for the day of analysis, using a certified ascorbic acid standard; giving results that in orange we have 56.46 mg/g, lemon, 41.57 mg/g and tangerine 32.75 mg/g

**Keywords.**High Performance Liquid Chromatography, vitamin C, extraction, photosensible.

## INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas que mantienen el funcionamiento metabólico, no son sintetizadas en el organismo y por tanto se deben obtener de fuentes externas. Las vitaminas son sensibles a diferentes agentes físicos y químicos, la más sensible es la vitamina C que se degrada fácilmente por cambios de temperatura, exposición a la luz solar y concentración de oxígeno [1]. La vitamina C es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en forma natural en varias frutas y verduras.

Debido a que la vitamina C es termolábil se puede tener una variación en la concentración con el paso del tiempo, por esto, es importante establecer los mecanismos que afectan a su estabilidad y que influyen en el tiempo de vida útil. Por su inestabilidad se utilizó una técnica sensible y rápida que permitió evaluar su concentración [2] [3].

Para este estudio se tomó como variable tres frutos cítricos, considerados de mayor consumo, como son: naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*).

La toma de muestras se realizó en tres lugares de expendio de frutas; se recolectaron 10 muestras diarias.

El objetivo de este trabajo fue aplicar un método analítico para la extracción, identificación y cuantificación de vitamina C en naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*), considerando la inestabilidad de esta vitamina. Además, la comparación entre la concentración de vitamina C presente en los frutos mencionados anteriormente.

Para la cuantificación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector (UV-VIS), columna C18, flujo 2mL/min. y tiempo de análisis de 5min. Técnica que ofrece las siguientes ventajas:

- **Tiempo:** el tiempo de análisis es menor ya que la técnica es automatizada y evita métodos volumétricos o tradicionales.
- **Estabilidad de la vitamina C:** al aplicar un extractante como es el ácido metafosfórico al 6%, permite estabilizar al ácido L-ascórbico y así poderlo cuantificar por HPLC. (ver Fig. 1.2)

El Capítulo I contiene la parte teórica, donde se describe conceptos y principios, los cuales fundamentan este estudio. Se detalla la matriz, el analito, la solución extractante y técnicas analíticas que contribuyen al análisis químico para la determinación de vitamina C en naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*).

El Capítulo II, contiene la parte experimental, donde se describen los materiales, reactivos, equipos utilizados y la metodología de análisis.

En el Capítulo III, se presentan los resultados obtenidos mediante tablas para un mejor entendimiento con su respectiva discusión.

El Capítulo IV, contienen las conclusiones y recomendaciones obtenidas en base al estudio realizado.

# CAPÍTULO I

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1. LA VITAMINA C

#### 1.1.1. HISTORIA

La vitamina C fue denominada la vitamina antiescorbútica porque previene y cura el escorbuto, de ahí su nombre técnico ácido ascórbico. Fue una de las primeras vitaminas que se descubrió en 1928, se la caracterizó estructuralmente en 1933 y se sintetizó por primera vez en el laboratorio en 1938 [4].

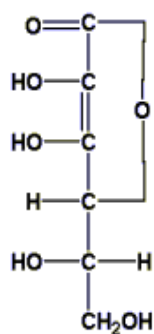
#### 1.1.2. ESTUCTURA QUÍMICA

La vitamina C es muy soluble en agua, medianamente soluble en alcohol e insoluble en solventes orgánicos; poco estable en medio alcalino, es termolábil pero resistente a la congelación estas propiedades se deben a su estructura. [5]

La fórmula química de la vitamina C es  $C_6H_8O_6$  y tiene un peso molecular de 176,13 g/mol y posee 4 formas estructurales, el ácido D-ascórbico, L-ascórbico, D-isoascórbico y el ácido L-isoascórbico; pero sólo el ácido L-ascórbico posee actividad antiescorbútica [6] [7].

Se puede apreciar al ácido L-ascórbico en la figura 1.1.

**Figura 1.1 Estructura del Ácido L-Ascórbico**

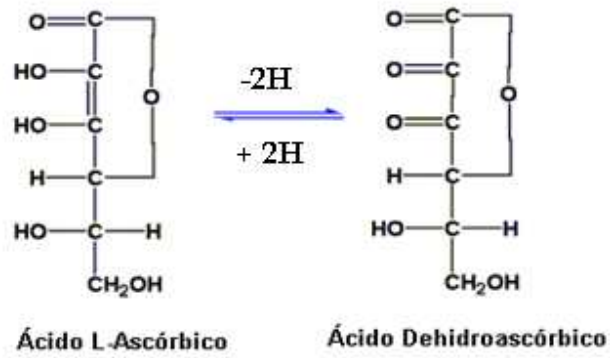


**Ácido L-Ascórbico**

Fuente. [www.nutrinfo.com.ar](http://www.nutrinfo.com.ar) 26 de mayo del 2000.

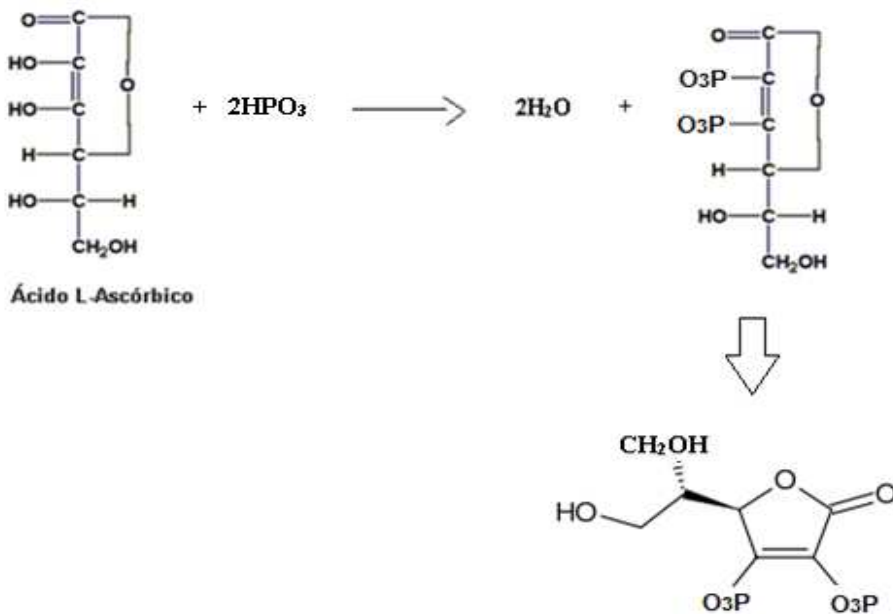
El ácido L-ascórbico posee varios elementos estructurales que ayudan a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. La estructura endiol es la cualidad antioxidante, ya que los endioles pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas.

Finalmente, el ácido L-ascórbico puede reaccionar fácilmente con radicales libres actuando como antioxidante y pasando el mismo a ser un radical ascorbilo, que rápidamente se descompone para producir ácido dehidroascórbido [6] [7]. Mediante estas reacciones, el ácido L-ascórbico, captura radicales libres potencialmente tóxicos como son los hidroxilos.



**Figura 1.2 Oxidación del Ácido L- Ascórbico**

Fuente: John W. Baynes, Marek H. Dominiczak, (2005), *Biomédica Médica*, Segunda edición, España.



Fuente. Propia

**Figura 1.3 Estabilidad del ácido L-ascórbico con ácido metafosfórico**

## **1.2. FUNCIONES**

Las funciones metabólicas y biológicas de la vitamina C, están basadas en sus propiedades de oxido-reducción entre ellas se destacan:

- Síntesis del colágeno, siendo esta quizá la función principal de la vitamina C.
- Interviene en la síntesis de constituyentes orgánicos de la matriz intercelular, en tejidos como los dientes, huesos y endotelio.
- Evita el envejecimiento prematuro.
- Facilita la absorción de otras vitaminas y minerales.
- Es antioxidante.
- Evita la proliferación de tumores cancerígenos
- Evita las enfermedades cardíacas [8][9]

## **1.3. FUENTES DE VITAMINA C**

Al ser una vitamina que se destruye fácilmente por oxidación, y más aún en presencia de álcalis y calor; su contenido en los alimentos disminuye. [10][11] Los alimentos de origen animal no contienen vitamina C, pero la gran mayoría de las frutas y verduras si, siendo los pimientos, los cítricos, las coles, la coliflor, espinacas, papas, frutas como el plátano, los mangos, la manzana, frutilla, naranja, limón, mandarina, kiwi, piña y melón los que tienen mayores concentraciones de ésta. [12]

En la tabla 1.1 se presenta la lista de algunos alimentos que contienen vitamina C [13] [14].

**Tabla 1.1 Cuadro de alimentos que contienen Vitamina C**

<b>Fuente</b>	<b>Vitamina C (mg/100 g)</b>
Guayaba	300
Grosella negra	200
Pimiento rojo	190
Perejil	130
Kiwi	90
Brócoli	80
Grosella	80
Coles de Bruselas	80
Papaya	60
Fresa	60
Naranja	60
Limón	50
Melón	40
Coliflor	40
Frambuesa	30
Mandarina	35
Espinacas	30
Mango	28
Lima	20

Fuente: <http://vitaminas.org.es/vitamina-c-alimentos>. Octubre 2010.

1.3.1. CITRICOS. Naranja (*Citrus aurantium*), Limón (*Citrus aurantifolia*) y Mandarina (*Citrus reticulata*).

El limón (*Citrus aurantifolia*), la naranja (*Citrus Aurantium*) y la mandarina (*Citrus reticulata*) son alimentos ricos en vitamina C que tiene estupendas propiedades antiescorbúticas y mineralizantes. Así como también, contiene importantes cantidades de potasio y calcio [15] [16].



**Figura 1.4** Naranja (*Citrus aurantium*), Limón (*Citrus aurantifolia*) y Mandarina (*Citrus reticulata*).

Poseen nutrientes importantes entre ellos: azúcares, aminoácidos y sales minerales; entre las vitaminas, se analizará vitamina C en naranja (*Citrus aurantium*) que en la literatura se conoce que posee un aporte de 60 mg por cada 100 g, limón (*Citrus aurantifolia*) 50mg y la mandarina (*Citrus reticulata*) que posee 35 mg [17]. A continuación se presenta una tabla donde se detalla la composición química de los tres frutos en estudio.

**Tabla 1.2 Composición química de la naranja, limón y mandarina**

	Agua (%)	Calorías (cal)	Proteína (g)	Grasa (g)	Vit. C (mg)	Ac. Fólico (mg)	Ca (mg)	Mg (mg)	K (mg)	Carotenos (mg)
Naranja	88	35 - 50	0.8-1	0.1	60	35	40	15	200	50
Limón	82.8	29	0.8-1	0.1	50	11	26	8	137	3.4
Mandarina	88.3	37	0.8-1	0.1	35	21	36	11	185	1600

Existen una gran variedad de técnicas para la determinación analítica tanto cuantitativa como cualitativa de ácido ascórbico, que abarca métodos tan simples, como puede ser una titulación, hasta la determinación espectrofotométrica. Se utiliza más las técnicas espectrofotométricas en la determinación del ácido ascórbico pero, el principal inconveniente de la aplicación de este tipo de técnicas es la presencia de impurezas, que pueden enmascarar los resultados; en cuanto a métodos de titulación la desventaja es, que la apreciación del color no es la misma con cada analista y en ambos casos la gran cantidad de solventes que se utiliza para la extracción es mayor. Por ello, se aplicó el método de cromatografía líquida de alta eficiencia para determinar ácido ascórbico.

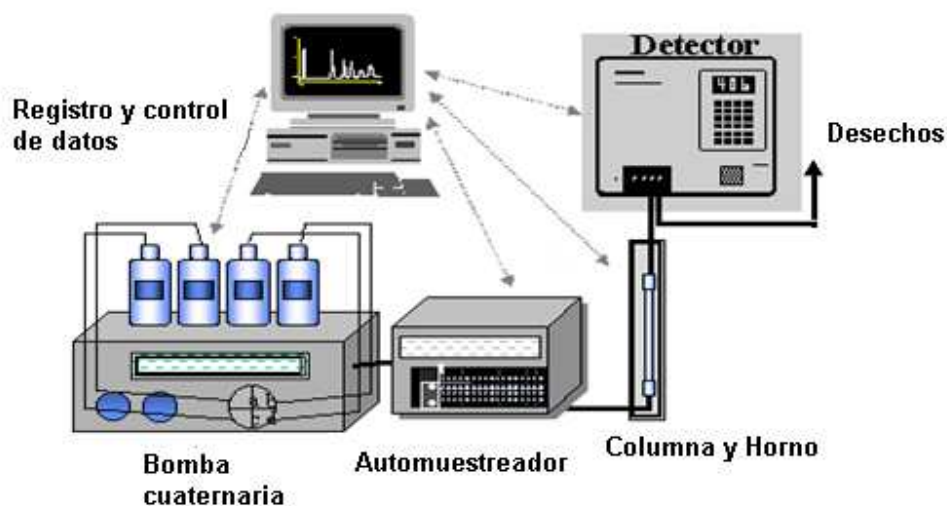
#### **1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

La Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es un método físico de separación, consiste en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y otra móvil que es un líquido que fluye a través de una columna a alta presión hacia la fase estacionaria [18]. La muestra se introduce manual o automáticamente antes de la columna, inyectándola en cantidades muy pequeñas (10 a 50  $\mu\text{L}$ ). El tiempo que tardan en salir los componentes a través de la columna se conoce como tiempo de retención y se considera una propiedad significativa del compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria [19]. El uso de alta presión mejora la resolución de la separación debido a que se aumenta la velocidad lineal de los componentes de la muestra, disminuyendo la difusión. [20]

La eficacia de la separación en HPLC depende de la columna que se vaya a utilizar. Mientras menor sea el diámetro de las partículas de relleno de fase estacionaria, mayor será la eficacia. Existe un ensanchamiento de bandas no deseable fuera de la columna, debido a la diferencia de diámetro en las tuberías del sistema, se debe evitar en lo posible esto para conseguir mayor eficacia. Además un tamaño excesivo de muestra no es favorable para la separación, porque es más difícil transportar los compuestos dentro de la columna [21].

#### 1.4.1. COMPONENTES DE HPLC

El HPLC consta de los siguientes componentes como se describe en la figura 1.4



**Figura 1.5 Componentes del HPLC**

Fuente: [www.forumsci.co.il/HPLC/system](http://www.forumsci.co.il/HPLC/system). 20 de diciembre de 2010

A continuación se describe brevemente cada uno de sus componentes:

- **Bomba:** una bomba para HPLC es de material inerte a los disolventes empleados. La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible [22]. La bomba trabaja con gradiente de elusión dependiendo del método a utilizar.
- **Fase móvil:** los solventes que se pueden utilizar en HPLC son varios principalmente

(metanol, propanol y acetonitrilo), además de agua y soluciones amortiguadoras acuosas, también se utilizan solventes no acuosos de baja viscosidad, los solventes con viscosidad alta se evitan ya que el tiempo para pasar a través de la columna es mayor; lo cual provoca ensanchamiento de los picos. Utilizar solventes de grado HPLC es un condicionante, ya que las interferencias por solventes tienden a tapar la columna y producen falsos picos en el detector.

- **Gradiente de elusión:** cuando el solvente se mantiene constante en toda la separación, el proceso se llama elusión isocrática. Pero, si la relación de los solventes cambian a determinado tiempo dependiendo del proceso de análisis, se conoce como gradiente de elusión que se utiliza cuando se separan mezclas que tienen varias características. [22]
- **Columnas:** son hechas de acero inoxidable y tiene un empaquetamiento compacto, ya que requieren que soporten presiones muy altas.
- **Detector:** está ubicado al final de la columna y la señal se transforma en una gráfica en función del tiempo, llamado cromatograma, que consta de una serie de picos simétricos. Los picos sobre el eje de los tiempos se emplean para identificar tanto cualitativa (posición en el eje) como cuantitativamente (área bajo los picos) los componentes de la muestra. [22]

En esta técnica se utilizó el detector de absorción ultravioleta-visible, consiste en medir la intensidad del color o en este caso la radiación absorbida en el UV a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Para tener esta relación se emplea la Ley de Beer,

que establece que para una misma especie absorbente, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.

La vitamina C posee enlaces conjugados y transición de electrones que son características que presentan señal en el espectro UV-VIS. Este detector se puede emplear en la determinación de alimentos, aditivos, pesticidas y medicinas con grupos funcionales  $-C=C-$ ,  $-C=O$ ,  $-N=O$  y  $-N=N-$ , los cuales absorben radiación UV [23].

## **CAPITULO II**

### **2. MATERIALES Y METODOS**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es en la actualidad la más utilizada para la determinación del ácido ascórbico por su sensibilidad, precisión, exactitud y reproducibilidad [24], la cual utiliza como soporte más habitual el aminado y fase móvil más frecuente una mezcla de disolución de fosfato o citrato con un disolvente orgánico. El tipo de detector más utilizado es el UV de 240 a 290 nm. [25] [26].

El método utilizado en esta investigación consistió en la extracción del ácido ascórbico, con reactivos y condiciones que eviten al máximo su deterioro. Esto se logró utilizando una solución extractora de ácido metafosfórico al 6% que ayuda a la estabilidad del ácido ascórbico y lo protege de la oxidación por el aire y la luz. El extracto fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución. La cuantificación e identificación del ácido ascórbico se realizó inyectando patrones de concentración conocida.

#### **2.1. EQUIPO**

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Shimadzu LC – 10 AD.
- Detector espectrofotométrico UV-Visible Shimadzu SPD-10 AV.
- Bomba Shimadzu FCV-10AL.
- Horno de columna CTO – 10 A.

- Columna C18, marca Waters, 5  $\mu\text{m}$  de partícula, de 150 x 3,9 mm de diámetro.
- Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.
- Equipo para microfiltración de la fase móvil marca Sartorius, para usar con filtros para solventes acuosos de 47 mm.
- Microfiltros 45  $\mu\text{m}$  marca Millipore, aptos para filtración de fase acuosa.
- Baño de ultrasonido para la desgasificación de la fase móvil.
- Vortex para agitación durante la extracción.
- Refractómetro.
- Extractor eléctrico.



**Figura 2.1 Equipo**

## 2.2. REACTIVOS

- Solvente de extracción ácido metafosfórico p.a.
- Metanol grado HPLC utilizado para preparar la fase móvil marca Fisher.
- Agua grado HPLC para preparar la fase móvil.
- Estándar de ácido ascórbico certificado chemservice lote # 383-66, catálogo # F2157AS, o similar.

## 2.3. MATERIALES

- Balones aforados clase A de 100, 50 y 25 mL calibrados.
- Pipetas volumétricas clase A de 0.5, 1, 2 y 5 mL calibradas.
- Vasos de precipitación.
- Erlenmeyer.
- Espátulas metálicas

## 2.4. SOLUCIONES PREPARADAS

**Solución de trabajo:** a partir del estándar de ácido ascórbico chemservice con pureza del 100%, se preparó una solución patrón de 1000 mg/L (se pesa 0,1g de ácido ascórbico en 100

mL de ácido metafosfórico al 6%), esta solución se preparó para cada día de comparación, se la utiliza para elaborar las curvas de calibración, y para identificar la concentración de ácido ascórbico.

**Ácido metafosfórico al 6%:** se pesa 60g del ácido y se afora a 1L de agua destilada para HPLC.

**Tabla 2.1 Concentración de soluciones de calibración de Ácido Ascórbico a partir de la solución madre.**

Nivel	Alícuota	Volumen de aforo	Concentración
1	0.5 mL	50 mL	10 mg/L
2	2 mL	50 mL	40 mg/L
3	2 mL	25 mL	80 mg/L
4	5 mL	50 mL	100 mg/L
5	4 mL	25 mL	160 mg/L

## **2.5. ANALISIS Y CONDICIONES CROMATOGRAFICAS**

Con la solución patrón de ácido ascórbico de 1000mg/L en ácido metafosfórico al 6% y teniendo en cuenta las condiciones de cuantificación en jugos y frutas, se probó la fase móvil y la longitud de onda del detector (240-290 nm) para obtener la mayor sensibilidad y resolución del sistema cromatográfico. Para esto se realizaron ensayos con las siguientes fases móviles:

- Metanol: Agua (70:30); (80:20); (90:10)
- Acetonitrilo: Agua (80:20)
- Acetonitrilo: Agua con solución reguladora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03M, pH 2.5 (90:10)

La fase móvil que presenta mayor resolución es metanol: agua (90:10), a una longitud de onda de 245 nm, usando un detector UV-VIS; luego de realizar las pruebas de flujo de 1 a 2 mL/min, se definió el flujo de 1.2 mL/min. El tiempo de análisis del equipo fue de 5 min.

Las extracciones y estándares se inyectaron por triplicado para evaluar la precisión del método.

#### 2.5.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de naranja, limón y mandarina se obtuvieron de manera aleatoria en tres lugares de expendio de frutas, durante todas las etapas del proceso, se protegió tanto a los estándares como a las muestras de la luz para evitar el deterioro de la vitamina C, recubriendo a los balones con papel aluminio y realizando el análisis de las muestras de manera inmediata.

#### 2.5.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez tomadas las frutas se lavan y se rebanan en mitades para obtener el jugo mediante un extractor eléctrico. Se miden los sólidos solubles totales (grados Brix) del jugo de cada fruta

utilizando un refractómetro, para determinar el punto óptimo de consumo. Los grados Brix° recomendados en cítricos fluctúan entre (9 – 12 grados) [27].

Después de constatar su punto óptimo se procede a evaluar el jugo de la fruta inmediatamente extraído, para evitar principalmente la oxidación de vitamina C.

Se pesa por triplicado 5g de la muestra y se afora a 50mL con ácido metafosfórico al 6%. Para determinar la concentración de vitamina C, se realizaron curvas de calibración mediante estándares de concentración que van en un rango de 10 a 160 mg/L, ya que según reportes bibliográficos la concentración en cítricos es alrededor de 60mg/100g de muestra. Se filtra con un poro de 45µm para evitar que los compuestos sólidos de partícula grande pueda taponar la columna de HPLC.

## **2.6. DESARROLLO DEL MÉTODO**

La cuantificación e identificación del ácido ascórbico se realiza inyectando patrones de concentración conocida que se utilizan con una doble finalidad: para la identificación de los tiempos de retención y para la calibración del equipo en cuanto a medir concentraciones.

Se analizan por triplicado y por tres días en las mismas condiciones cromatográficas teniendo así las curvas de calibración respectivas.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio da como resultado un método para la determinación de ácido L-ascórbico en cítricos, naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*), que es aplicable a dichas matrices según la metodología aplicada. A continuación se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo del método, aplicación a muestras reales.

#### 3.1. MÉTODO DE ANÁLISIS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

A continuación se presentan los resultados de las pruebas que se realizaron para determinar las condiciones apropiadas del método de separación y cuantificación de ácido L-ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia.

**Determinación de la fase móvil apropiada:** las combinaciones de fases móviles recomendadas para la determinación de ácido L-ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia son: fosfato diácido de potasio-agua, metanol – agua, acetonitrilo – agua. Se

probaron las fases inyectando un estándar por triplicado para cada una. Al analizar los cromatogramas se encontró que existe una mejor resolución de los picos de los analitos con la fase metanol – agua, además el tiempo disminuye a 5 minutos. Por lo tanto se escogió la fase móvil metanol – agua para el análisis de ácido L-ascórbico.

**Determinación del uso de gradiente:** inicialmente se probó una separación isocrática de agua 50 %: metanol 50 %, dando como resultado una corrida excesivamente larga (20 minutos). Al probar con metanol 10%: agua 90% el tiempo disminuyó considerablemente y el pico de ácido L-ascórbico estaba 100% definido, sin problemas de colas o ensanchamiento, como fue en el caso de las otras mezclas de fase móvil a diferente gradiente.

Se deben controlar otras variables para mejorar la separación y resolución en cromatografía líquida, como: flujo de fase móvil, volumen de inyección, temperatura de la columna y longitud de onda de detección.

**Flujo de fase móvil:** se probó 5 diferentes flujos de fase móvil, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mL/min. Con el flujo de 1.0 y 1.1 mL/min se obtuvo mayor tiempo de separación y existe la presencia de colas en los picos. El flujo de 1.2 mL/min dio buena resolución en un tiempo adecuado. Finalmente el flujo de 1.3-1.5 mL/min presentó un tiempo de separación menor pero sacrificando la resolución de los picos. El flujo de 1.2 mL/min es el escogido para la determinación.

**Volumen de inyección:** no se probó volúmenes de inyección porque el equipo trabaja con un volumen de 20 $\mu$ L.

**Temperatura de la columna:** la temperatura de la columna no presentó mayor influencia en los cromatogramas, la resolución fue ligeramente mejor a los 25°C que a los 30°C. Por lo tanto se escoge la temperatura de 25°C, se optó por determinar la temperatura ya que el equipo posee un horno de columna y tratando de evitar pérdidas del ácido L-ascórbico.

**Longitud de onda de detección:** se probaron las longitudes de 240 y 245 nm, según recomendaciones bibliográficas. La sensibilidad es considerablemente mejor en la longitud de onda de 245nm, mientras que con la longitud de 240 nm, la altura del pico es menor.

A continuación la tabla 3.1 muestra un resumen de las condiciones cromatográficas optimizadas para la determinación de compuestos fenólicos por HPLC.

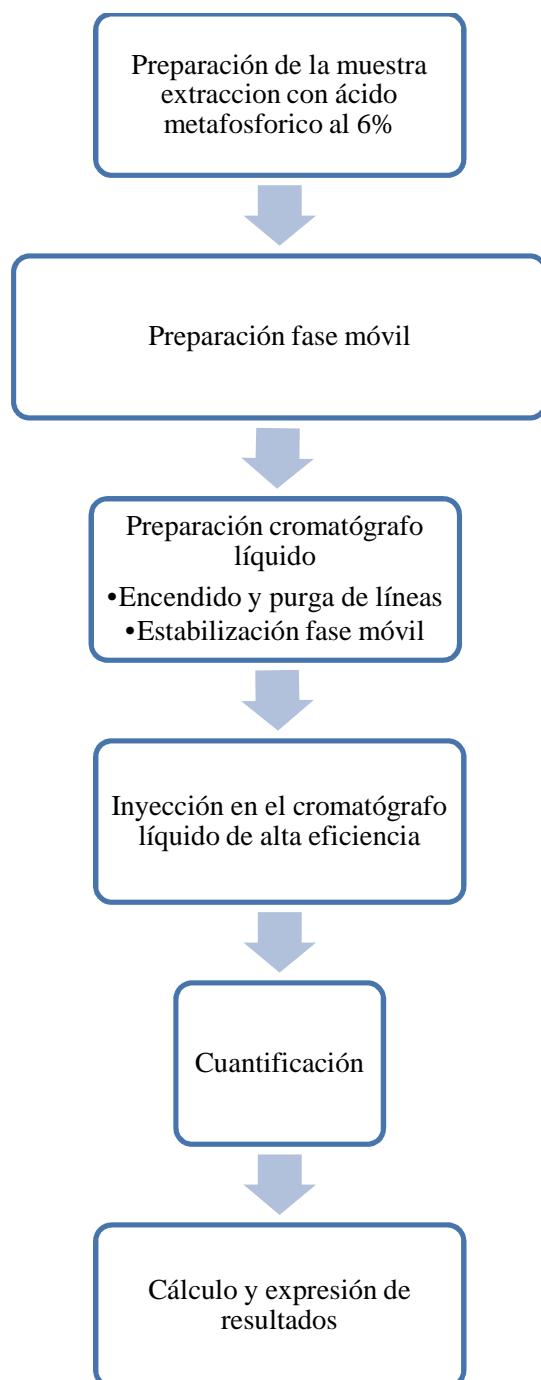
**Tabla 3.1 Condiciones optimizadas para HPLC**

<b>Parámetro</b>	<b>Condición optimizada</b>
Fase móvil	A: metanol B: agua
Gradiente	A 90 %, B 10 %
Volumen de inyección	2.0 mL/min
Temperatura de columna	25 °C
Longitud de onda de detección	245 nm

Una vez determinadas las condiciones cromatográficas adecuadas para la determinación de ácido L-ascórbico, se realizaron soluciones de concentración conocida y se determinó su tiempo de retención. La selectividad del método se ve reflejada en la tolerancia de los tiempos de retención del analito y se relacionó la concentración con el área integrada de los picos cromatográficos.

A continuación se detalla un esquema del procedimiento de análisis para determinar ácido L-ascórbico en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus*

*reticulata*) por HPLC.



**Figura 3.1 Esquema del procedimiento de analisis**

La figura 3.1 describe detalladamente el procedimiento que se utilizó para la extracción y la cromatografía líquida de alta eficiencia. A continuación se define la cuantificación y tratamiento de resultados.

### **Cuantificación**

La cuantificación de ácido L-ascórbico se realizó utilizando curvas de calibración. Se contempla una función lineal:

$$y = m x + b$$

### **Cálculo y expresión de resultados**

El software CHROMELEON que posee el equipo es muy amigable con el usuario, ya permite introducir datos como son: peso de la muestra, volumen de aforo y volumen de inyección, con lo cuales nos da directamente la concentración de las muestras analizadas.

## **3.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

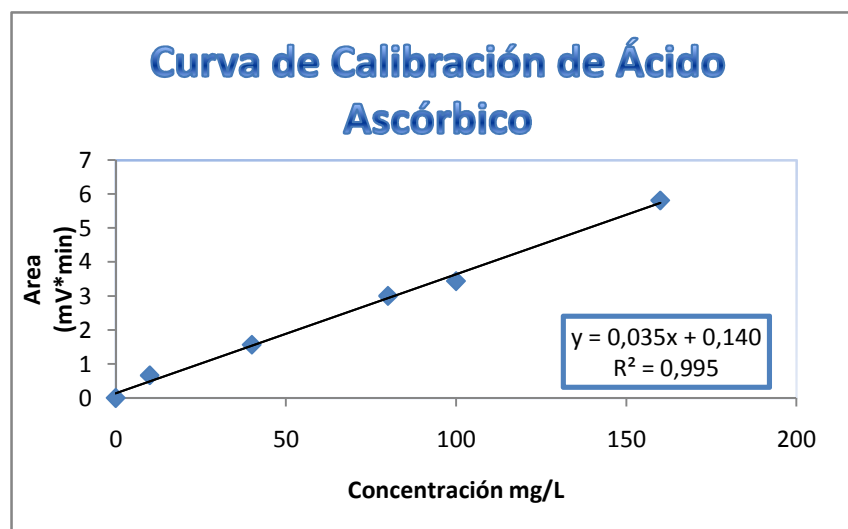
Las curvas de calibración se realizaron para cuantificar y analizar las muestras, con el fin de comparar la concentración de ácido L-ascórbico entre ellas.

Para el cálculo de la concentración de ácido L-ascórbico se tomó como base la relación entre la concentración conocida del estándar y el área del pico correspondiente; así, conociendo el

área del pico de cada muestra de ácido L-ascórbico, se pudo calcular la concentración respectiva.

**Tabla 3.2 Lectura de los estándares de calibración para el análisis de las muestras del día 1.**

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN (mg/L)	Área (mV*min)
Estándar 1	0 mg/L	0
Estándar 2	10 mg/L	0,7
Estándar 3	40 mg/L	1,6
Estándar 4	80 mg/L	3,0
Estándar 5	100 mg/L	3,4
Estándar 6	160 mg/L	5,8



**Figura 3.2 Gráfico de la primera curva de calibración.**

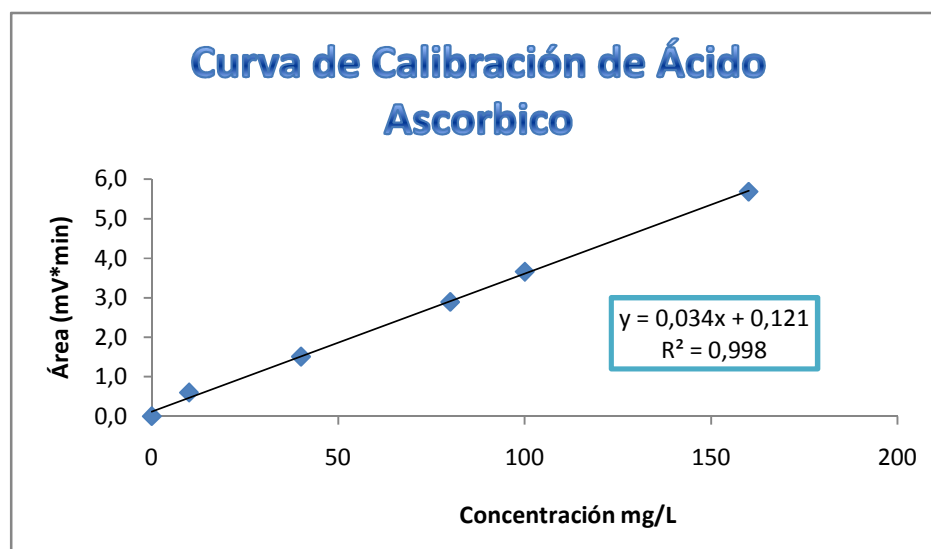
De la primera curva de calibración (Fig. 3.1) se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9956 con un rango lineal de 0 a 160 mg/L, que presenta la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 0,035x + 0,1404$$

La tabla 3.2 presenta los datos con los que fue construida la curva de calibración que corresponde al día dos, figura 3.2.

**Tabla 3.3 Lectura de los estándares de calibración para el análisis de las muestras del día 2.**

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN (mg/L)	Área (mV*min)
Estándar 1	0 mg/L	0
Estándar 2	10 mg/L	0,6
Estándar 3	40 mg/L	1,5
Estándar 4	80 mg/L	2,9
Estándar 5	100 mg/L	3,7
Estándar 6	160 mg/L	5,7



**Figura 3.3 Gráfico de la segunda curva de calibración**

De la segunda curva de calibración (Fig. 3.2) se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9984 con un rango lineal de 0 a 160 mg/L, que presenta la siguiente ecuación de la recta.

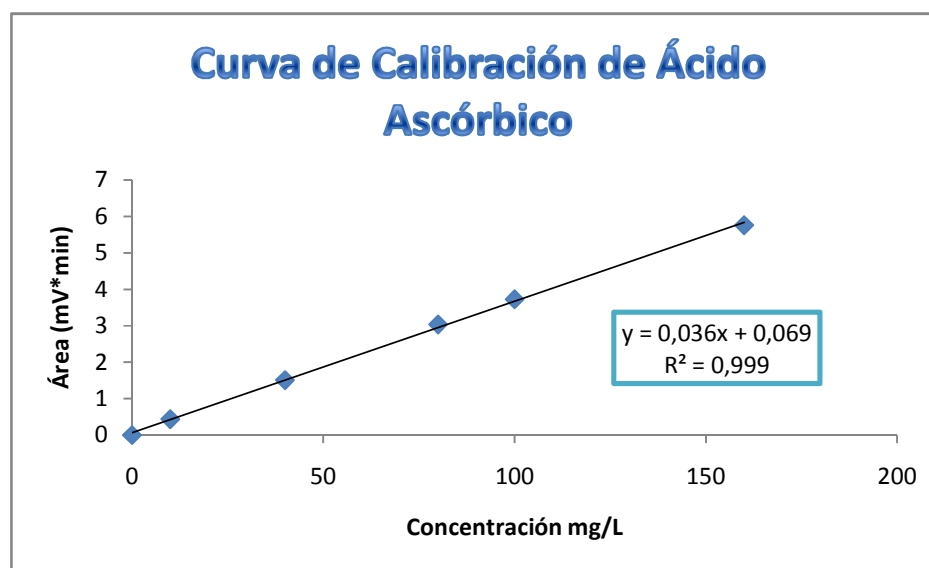
$$Y = 003494x + 0,1215$$

La tabla 3.3 presenta los datos con los que fue construida la curva de calibración de la figura 3.3 que corresponde al día tres.

**Tabla 3.4 Lectura de los estándares de calibración para el análisis de las muestras del día**

3.

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN (mg/L)	Área (mV*min)
Estándar 1	0 mg/L	0
Estándar 2	10 mg/L	0,6
Estándar 3	40 mg/L	1,5
Estándar 4	80 mg/L	2,9
Estándar 5	100 mg/L	3,7
Estándar 6	160 mg/L	5,7



**Figura 3.4 Gráfico de la tercera curva de calibración**

De la tercera curva de calibración (Fig. 3.3) se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9991 con un rango lineal de 0 a 160 mg/L, que presenta la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 0,036x + 0,0693$$

Después de obtener los resultados de las tres curvas de calibración, se procede a calcular la media y la desviación estándar de los coeficientes de correlación lineal, las pendientes y los interceptos, que se presenta en la tabla 3.4.

**Tabla 3.5 Resumen de las curvas de calibración, coeficiente de correlación lineal, interceptos, medias aritméticas y desviación estándar.**

<b>Curva</b>	<b>Coefficiente de Correlación Lineal (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Pendiente (m)</b>	<b>Intercepto (b)</b>
Día 1	0,9956	0,0350	0,1404
Día 2	0,9984	0,0349	0,1215
Día 3	0,9991	0,0360	0,0693
Medias (x)	-	0,0353	0,1104
Desviación estándar (s)	-	0,0006	0,0368
Límite inferior (x-3s)	-	0,0335	0,0000
Límite Superior (x+3s)	-	0,0371	0,2209

Con los datos de la tabla 3.4 se puede definir límites de aceptación o rechazo que sirve para determinar parámetros de control en análisis futuros, además se demuestra la robustez del método al generar curvas reproducibles.

Los coeficientes de correlación para el ajuste de las curvas de calibración se puede observar que son mayores a 0.99. Lo que demuestra que el ajuste a una función lineal es válido para la relación respuesta – concentración.

### **3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS**

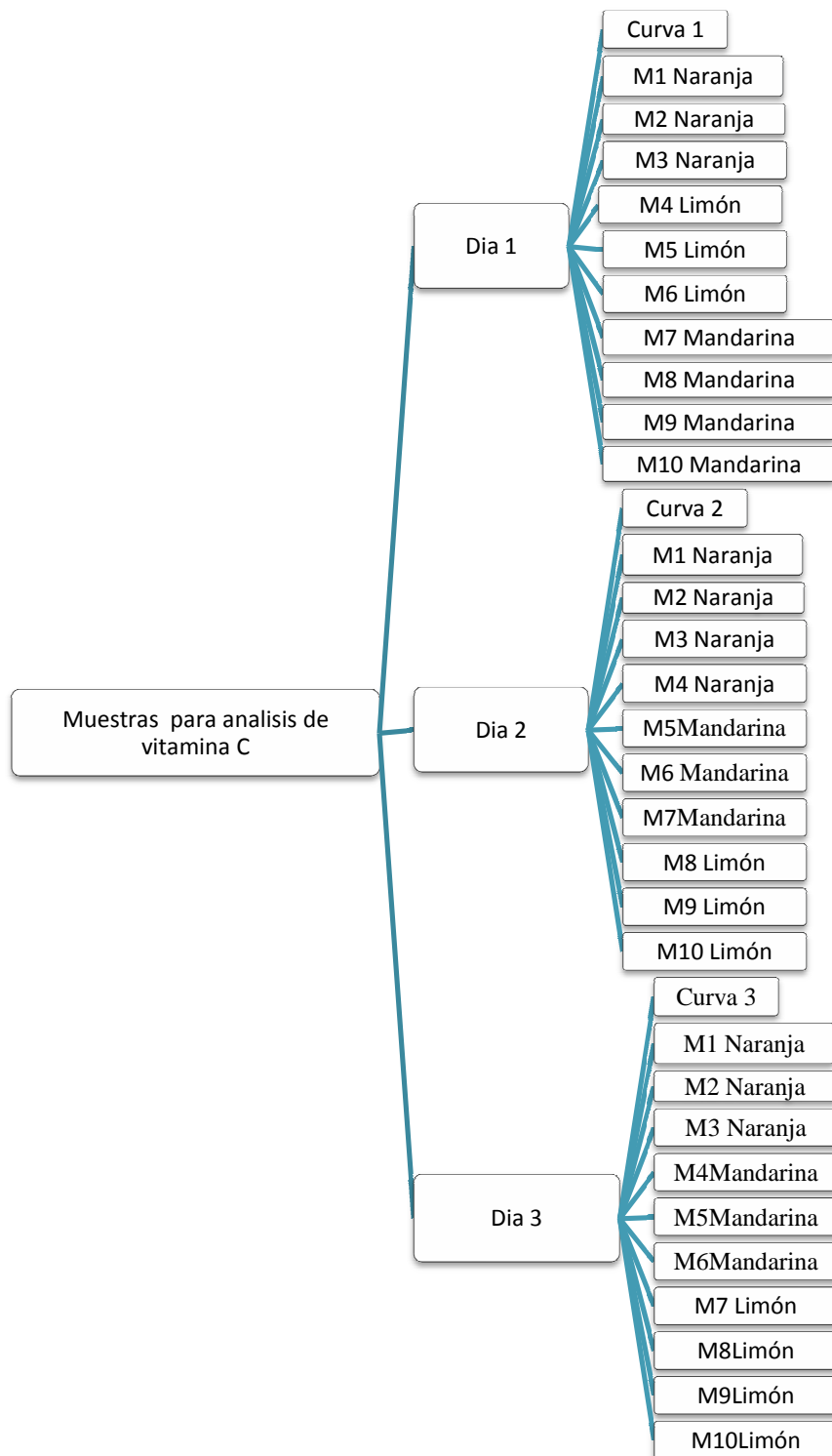
El análisis de las muestras se realizó en tres días, en cada uno de los cuales se analizó un total de 10 muestras, distribuidas de la siguiente manera:

Primer día: curva, 3 muestras de naranja, 3 muestras de limón y 4 muestras de mandarina.

Segundo día: curva, 4 muestras de naranja, 3 muestras de limón y 3 muestras de mandarina.

Tercer día: curva, 3 muestras de naranja, 4 de limón y 3 de mandarina.

Esto se puede visualizar en la figura 4.4



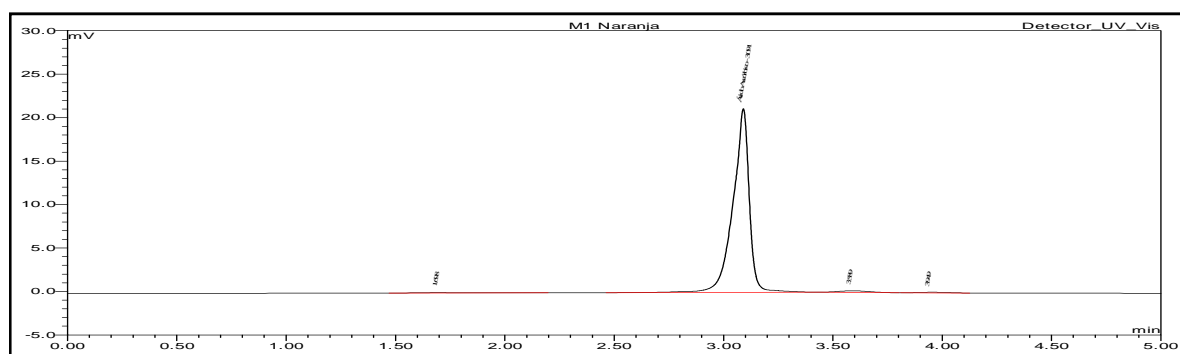
**Figura 3.5 Diagrama de análisis de muestras por día.**

En el diagrama se utiliza la abreviatura M para identificar las muestras, de cada M se realiza tres determinaciones o lecturas. Por lo tanto se tendrá 30 resultados al día para realizar el respectivo tratamiento.

### 3.3 CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS

El análisis de cada grupo de muestras, posee su respectivo cromatograma, se presenta un cromatograma para visualizar el pico de ácido ascórbico.

Nombre de la muestra **M1 Naranja**  
 Programa instrumental: VITAMINA C  
 Método de cuantificación: VITAMINA C  
 Tiempo de corrida (min): 5,00



No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	21	1,83488	97,197634	50,275	BMb

**Figura 3.6 Cromatograma de ácido ascórbico.**

En las tablas 3.6, 3.7 y 3.8 se pueden observar las medias aritméticas de la concentración de vitamina C, para la naranja, limón y mandarina.

**Tabla 3.6 Resultados del promedio de la concentración por triplicado para los tres días de análisis.**

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/L)		
	Día 1	Día 2	Día 3
Naranja	56.20	56.93	56.25
Mandarina	32.90	32.69	32.67
Limón	41.31	41.75	41.64

La tabla 3.6 corresponde a los resultados de las concentraciones de las muestras para los tres días de análisis. Un total de 10 muestras por triplicado con un peso aproximado de 5g.

El resultado de la concentración de ácido ascórbico presente en el jugo de los tres cítricos analizados, es: mayor concentración la naranja con un resultado de 56,46mg/g, seguido del limón con 41,57mg/g y por último la mandarina con 32,75mg/g; Según la composición química de los cítricos el resultado obtenido por este método no varía significativamente y mantiene las proporciones de los datos teóricos.

Para verificar estadísticamente si los resultados presentaron variaciones significativas se realizó un prueba estadística conocida como ANOVA de un factor; a continuación se puede observar el cuadro descriptivo de la prueba realizada.

## ANOVA de un factor

### Descriptivos

Muestras /Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Naranja	1	9	56.2011	10.97176	3.65725	47.7675	64.6348	47.96	71.36
	2	9	56.9322	6.37101	2.12367	52.0350	61.8294	51.16	65.58
	3	12	56.2542	3.25633	.94002	54.1852	58.3231	52.09	62.19
	Total	30	56.4417	6.96668	1.27194	53.8403	59.0431	47.96	71.36
Mandarina	1	9	32,6678	,60369	,20123	32,2037	33,1318	31,87	33,40
	2	9	32,6844	2,79377	,93126	30,5370	34,8319	29,16	35,84
	3	12	32,9042	1,86829	,53933	31,7171	34,0912	29,43	34,66
	Total	30	32,7673	1,89490	,34596	32,0598	33,4749	29,16	35,84
Limón	1	9	41,3078	3,34935	1,11645	38,7332	43,8823	38,04	46,04
	2	9	41,6411	,73974	,24658	41,0725	42,2097	40,43	42,72
	3	12	41,7525	1,53695	,44368	40,7760	42,7290	39,52	43,69
	Total	30	41,5857	2,04403	,37319	40,8224	42,3489	38,04	46,04

### ANOVA

Muestra		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naranja	Entre días	3,108	2	1,554	,030	,971
	Dentro de días	1404,396	27	52,015		
	Total	1407,504	29			
Mandarina	Entre días	,376	2	,188	,049	,952
	Dentro de días	103,753	27	3,843		
	Total	104,128	29			
Limón	Entre días	1,057	2	,528	,119	,888
	Dentro de días	120,107	27	4,448		
	Total	121,164	29			

Al realizar ANOVA de un factor se puede demostrar que los valores de los resultados entre días de análisis no varían significativamente ya que el día 1 es igual al 2 y al 3 por lo tanto se acepta la hipótesis nula, otro factor para aceptar esta hipótesis es que al analizar las media no hay diferencia sobre la variación de cada grupo.

### DISCUSION

La concentración de vitamina C en cítricos de la literatura no está bien definida, sin embargo existe un promedio de 60 mg al día que es suficiente para mantener una concentración total en el organismo humano [28]. Según éste estudio para lograr la concentración de la dieta recomendada se debería consumir 91.10 g de jugo de naranja, 54.58 g de jugo de mandarina y 69.28 g de jugo de limón por día.

El método de extracción utilizado en esta investigación es adecuado porque presenta recuperaciones similares a las obtenidas en otros estudios realizados [29] [30], no existe pérdidas de la cantidad de vitamina C y los picos obtenidos en la separación cromatográfica no presentan ninguna interferencia, son fácilmente cuantificables.

El jugo se produce exprimiendo directamente la fruta y no se aplica ningún tratamiento o proceso posterior, el análisis se realiza de manera inmediata; no existe almacenamiento de muestra, ya que la estabilidad de la vitamina C varía con el transcurso del tiempo y la temperatura. Al añadir el ácido metafosfórico al 6% se logra extraer la vitamina C y al mismo tiempo estabilizarla; existen otras alternativas para lograr la estabilidad de la vitamina C utilizando sustancias como: ácido cítrico, ácido benzoico, benzoato de sodio y sorbato de potasio [31].

Se escogió la fase móvil metanol:agua (90:10) para la determinación de vitamina C por cromatografía líquida de alta eficiencia debido a que, luego de las pruebas realizadas, dicha fase logró una mejor separación del pico de vitamina C (mayor resolución) y permitió acortar el tiempo de corrida de 20 minutos a 5.

La optimización del método se realizó probando diferentes columnas citadas en la bibliografía [23,31], la columna que dio mejor resultado es la utilizada en este método (Columna C18, marca Waters, *5 μm de tamaño de partícula y de diámetro 150 x 3,9 mm*), debido a que los picos tienen una óptima resolución como se puede observar en la figura 3.6.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. CONCLUSIONES

- El método utilizado para el análisis de la vitamina C en los frutos cítricos naranja (*citrus aurantium*), mandarina (*citrus reticulata*) y limón (*citrus aurantifolia*), mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, logra el aislamiento, extracción, separación de interferencias, detección y cuantificación adecuada de dichos compuestos en un rango de 10 a 160 mg/100g.
- El proceso de determinación de ácido L-ascórbico utilizado nos permite estabilizarlo y tener una adecuada cuantificación, debido a que es muy inestable y termolábil.
- Según el método analítico utilizado en la determinación de la concentración de vitamina C, se determinó que en la naranja (*citrus aurantium*) existe 56.46 mg/g, limón (*citrus aurantifolia*) 41.57 mg/g y mandarina (*citrus reticulata*) 32.75 mg/g.
- Mediante este método analítico, es posible cuantificar ácido L-ascórbico en corto tiempo (5 minutos por muestra) y usando pequeñas cantidades de muestra 20 µl.

- Las muestras fueron analizadas en tres días, para ello se realizó una curva de calibración por cada día de análisis; con el fin de asegurar la concentración del estándar de vitamina C.

#### **4.2. RECOMENDACIONES**

- La muestra y los estándares utilizados para la determinación de vitamina C deben protegerse de la luz y la temperatura, evitándose la luz solar directa. El proceso podría realizarse en material de vidrio cubierto de papel aluminio para prevenir la degradación de la vitamina analizada.
- Realizar el análisis de vitamina C inmediatamente para evitar pérdidas significativas en la concentración y cuantificación de la misma.
- El método es aplicable para determinar vitamina C en cítricos, pero sería bueno que se pruebe este mismo método para analizar vitamina C en todo tipo de matrices.

## 5. BIBLIOGRAFIA

[1] Ferreira A, (2005) *ABC de las Vitaminas*, Santiago de Chile - Chile.

[2] Serra Marcelo Horacio, (2007) *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*, Buenos Aires – Argentina.

[3] McGee W. Fuentes de Vitamina C.

[http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp\\_imagepages/18109.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18109.htm) 27 de agosto del 2010.

[4] IQB. <http://www.iqb.es/nutricion/vitaminac/vitaminac.htm>. 3 de diciembre del 2010.

[5] Natural Stándar Monograph.

<http://www.naturalstandard.com/monographs/foreignlanguage/herbssupplements/patient-tangerine-sp.asp> . 14 de diciembre de 2010.

[6] Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M. Fernández-Arias, J. López-Hernández., (2009). “A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks.

- [7] Nutrinfo. [www.nutrinfo.com.ar](http://www.nutrinfo.com.ar), 15 de diciembre de 2010.
- [8] Aguilar P. [http://ec.globoedia.com/funciones-de-la-vitamina C](http://ec.globoedia.com/funciones-de-la-vitamina-C). 02 de septiembre del 2010.
- [9] Vitaminas. <http://vitaminas.org.es/vitamina-c-alimentos>. Octubre 2010.
- [10] Murillo E., Carrasquilla L., (2000) *Actividad Antioxidante en Frutas Tropicales*.  
Rev. Lat. Quím.
- [11] Sun F., et al.(2000) *Antioxidative Activity of Propolis Evaluated by the Interaction with Vitamins C and E and the Level of Lipid Hydroperoxides in Rats* *J.Agric. Food Chem.* USA.
- [12] Potter N., Hofchkisj J. (1995), *Ciencias de los Alimentos*. España.
- [13] Latham Michael C., (2004). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*,  
<http://www.fao.org>, consultado el 16 de abril de 2010.
- [13] Arnau J. <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=1511> 25 de agosto 2010.

[14] Muñoz de Chávez Miriam y Ledesma Ángel José (2002), *Los alimentos y sus nutrientes. Tablas de valor nutritivo de alimentos.*

[15] Acido Ascórbico. [www.acidoascorbico.com](http://www.acidoascorbico.com) 19 de octubre del 2010.

[16] Vitaminas. <http://vitaminas.org.es/vitamina-c-alimentos>. Octubre 2010.

[17] Becerra, W. (1997). *Adaptación de algunos cultivares de cítricos, en su tercera temporada de crecimiento en una zona agroecológica de la Octava Región (Portezuelo). 30 p. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.*

[18] RELAQ. Cromatografía Líquida de alta eficiencia. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Tipos> . 20 de noviembre de 2010.

[19] Skoog, D., Holler, J., Nieman, T., (2001) *Principios de Análisis instrumental*, quinta edición, McGraw Hill, España.

[20] Rubinson K., Rubinson K., (2000). *Análisis Instrumental*, Prentice Hall, Pearson Educación, S.A., Madrid, España.

[21] Quattrocchi, O.A.; Abelaira, S. L. and Laba, (1992) *Introducción a la técnica de HPLC; Aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina.

- [22] Rounds, M. A. y J. F. Gregory. 2003. High Performance Liquid Chromatography. En: S. S.
- [23] Macrae. R.,(1988). *HPLC in Food Analysis*, 2da edición. United States.
- [24] Aditivos para Alimentos. <http://www.geocities.com/grupoindustrialaisa>. 17 de agosto de 2010.
- [25] Gao X., *et al.* *Changes in Antioxidant Effects an their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) during maturation.* }
- [26] Nutrición, Vitamina C-Acido Ascórbico. <http://www.zonadiet.com/nutricion/vit-c.htm>. 22 de marzo de 2011.
- [27] Roig, M; Rivera, Z. y Kennedy, (1998), *Journal Food Science Nutrition*, España.
- [28] Sán román, L., Martin, M. y Montero M. (1993): *Vitaminas y vitámeros. "Farmacología"*. España.
- [29] U.S. (1995), Pharmacopeia National Formulary 23 NF 18, United States.
- [30] AOAC, (2005), Official Methods Of Analysis of Aoac International, 18<sup>TH</sup> edition, United States.
- [31] Cantarow, A. y Schepartz, B.(1964). *Las vitaminas "Bioquímica"*. Tercera Edición, editorial Interoamericana, México.

Anexo 1: Certificado del Estándar de Vitamina C (Ácido  
Ascórbico): CHEMSERVICE



680 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599  
1-800-452-9994 • 1-610-692-3028 • Fax 1-610-682-8729  
info@chemservice.com • www.chemservice.com

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

INVOICE #: CS314805  
PO #: PO-02-2010

CATALOG #: F2157AS

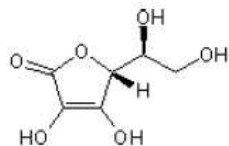
DESCRIPTION: ASCORBIC ACID

LOT #: 383-66

EXPIRATION DATE: 05-12

### 1. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Batch Molecular Formula:	$C_6H_8O_6$
Batch Molecular Weight:	176.12
CAS No:	[50-81-7]
Physical Appearance:	White solid
Solubility:	water to 500 mM
Storage:	Store at RT
Batch Molecular Structure:	



### 2. ANALYTICAL DATA

HPLC:	Shows 100% purity
<sup>1</sup> H NMR:	Consistent with structure
Microanalysis	
	Carbon Hydrogen Nitrogen
Theoretical	40.92 4.58
Found	40.94 4.63

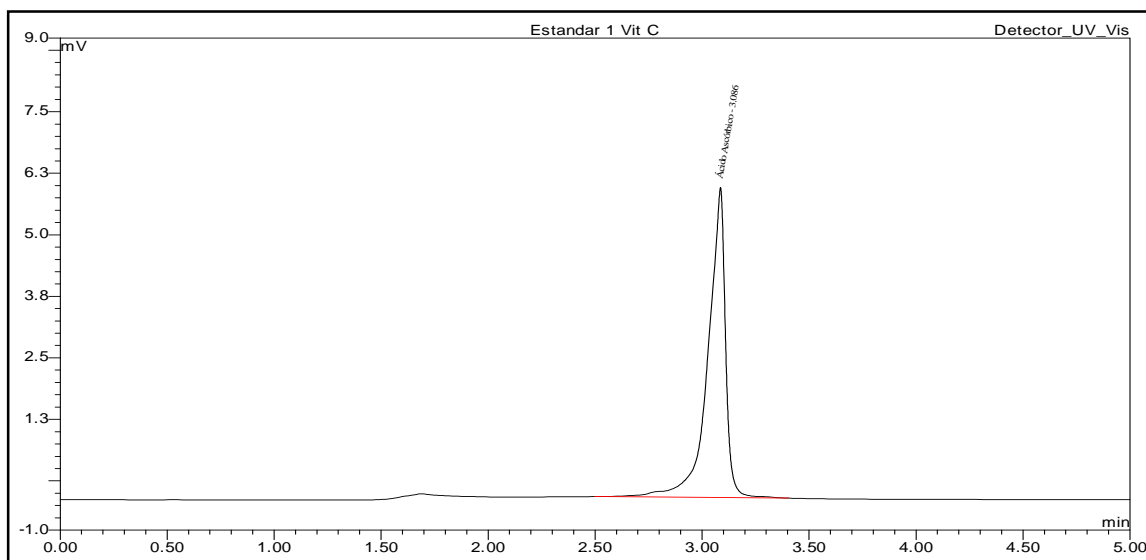
Certified By:

John Conrad  
CSM/TC



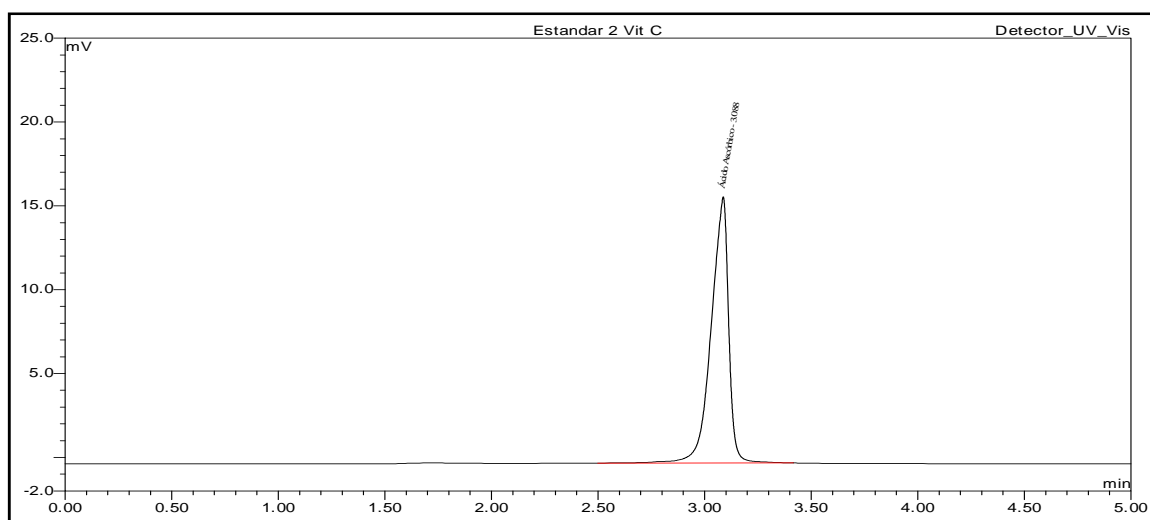
Anexo 2: Cromatogramas de las concentraciones de vitamina C utilizados para construir las curvas de calibración.

Estándar de 10mg/l de Vitamina C día 1.



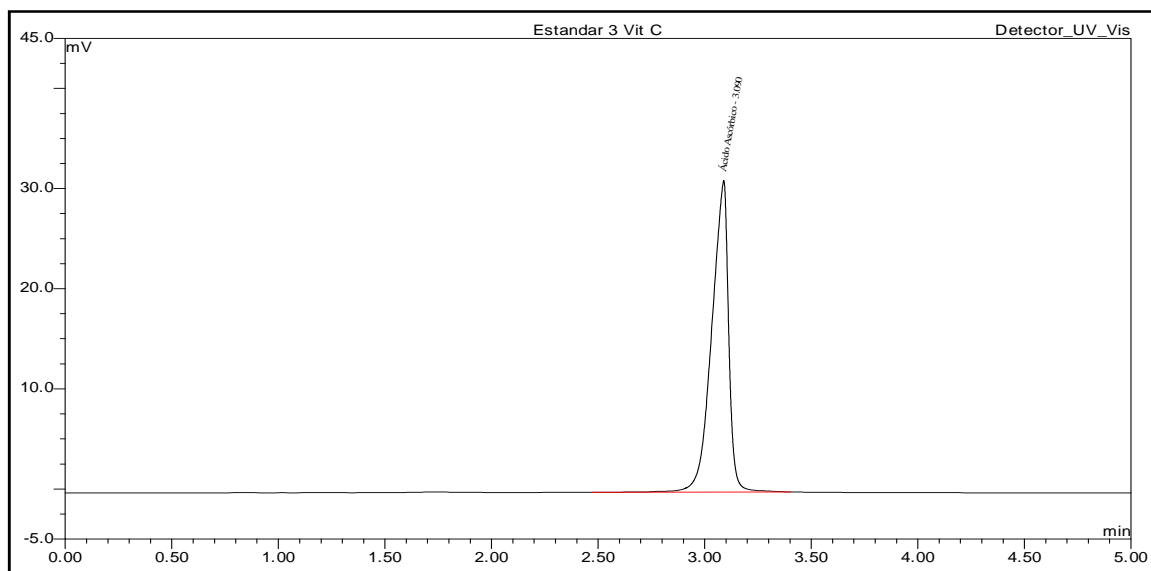
No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	6	0,60249	100	16,812	BMB

Estándar de 40 mg/l de vitamina C día 1.



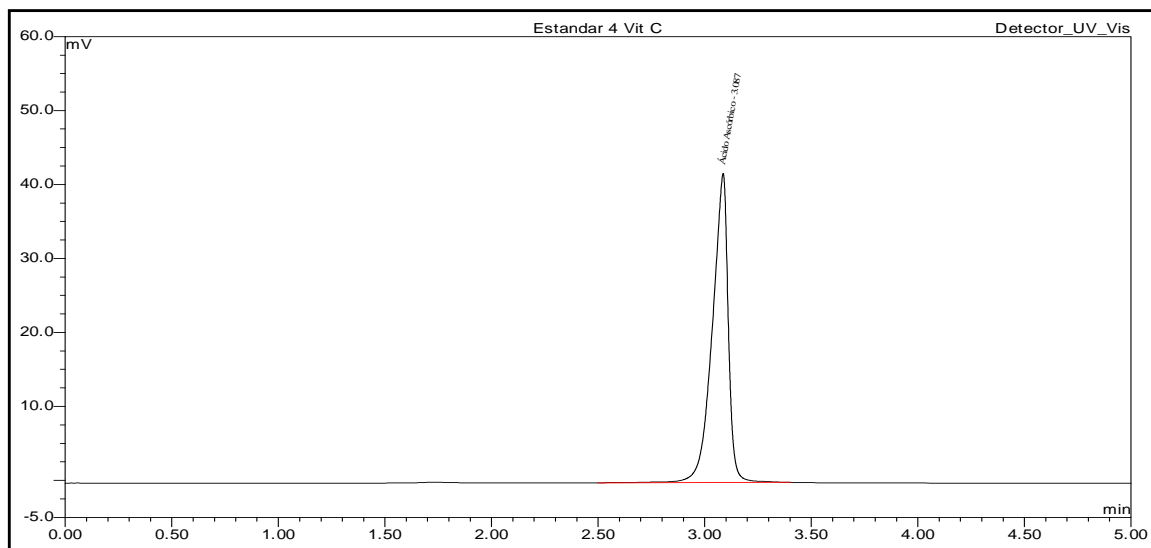
No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	16	1,50973	100	42,128	BMB

Estándar de 80 mg/L de vitamina C día 1



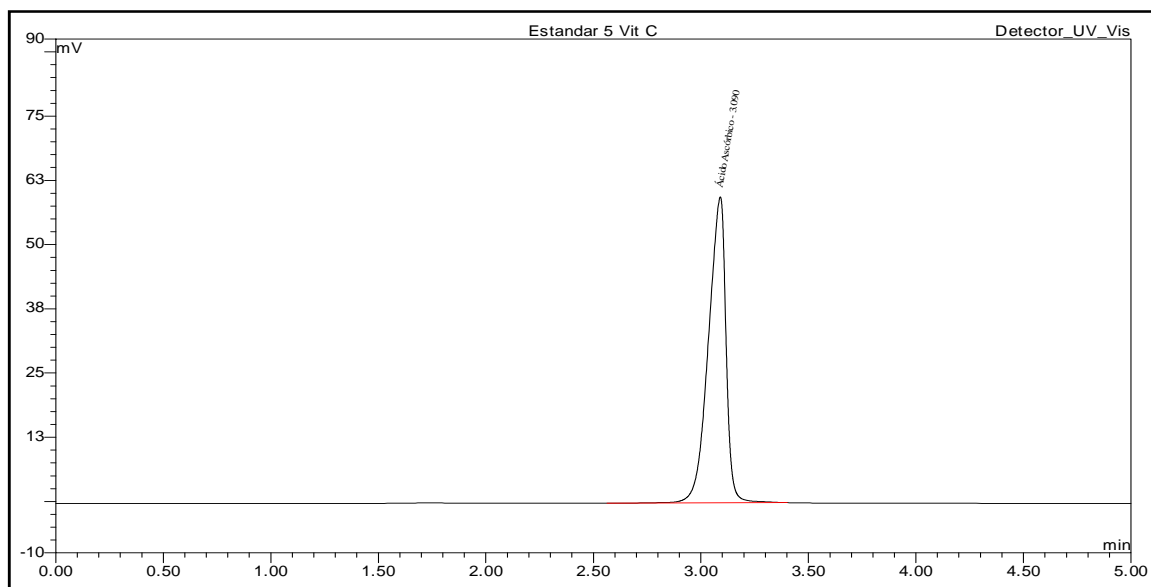
No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	31	2,86339	100	79,900	BMB

Estándar de 100 mg/L de vitamina C día 1.



No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3,09	Ácido Ascórbico	42	3,63355	100	101,391	BMB

Estándar de 160mg/L de vitamina C día 1.



No.	Ret.Time min	NOMBRE	Height mV	Area mV	Rel.Area %	Conc. g/100g	Type
1	3.09	Ácido Ascórbico	60	5,65712	100	157,857	BMB

Anexo 3:

**METODOS DE DETERMINACION DE VITAMINA  
C DE LA AOAC Y USP**

(c) *o*-Phenylenediamine solution.—For each 100 mL solution required, weigh 20 mg *o*-phenylenediamine-2HCl (Aldrich-Sigma, No. P1526, or equivalent). Dilute to volume with H<sub>2</sub>O immediately before use.

(d) *Thymol blue pH indicator*.—Prepare as in 967.21B(d) (see 45.1.14).

(e) *Sodium acetate solution*.—Dissolve 500 g NaCH<sub>3</sub>COO·3H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O and dilute to 1 L.

(f) *Boric acid-sodium acetate solution*.—Dissolve 3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 mL NaCH<sub>3</sub>COO solution. Prepare fresh for each assay.

(g) *Acid-washed Norit*.—Add 1 L HCl (1 + 9) to 200 g Norit Neutral (Fisher Scientific Co., Carbon, decolorizing, C-170), heat to bp, and filter with vacuum. Remove cake to large beaker. Add 1 L H<sub>2</sub>O, stir, and filter. Repeat washing with H<sub>2</sub>O and filtering. Dry overnight at 110°–120°C.

#### C. Apparatus

(a) *Automatic pipetting machine*.—Brewer, Scientific Equipment Products (SEPCO; www.sepco.cc), or equivalent. Calibrate to deliver 5 mL aliquots.

(b) *Vortex mixer*.—Scientific Industries, Inc. (70 Orville Dr, Bohemia, NY 11716, USA), or equivalent.

(c) *Fluorometer*.—Aminco Fluoro-Microphotometer (SLM Instruments Inc., 810 W. Anthony Dr, Urbana, IL 61801, USA) with lamp F4T4/BL and cuvet adapter B12-63019 to accept 18 × 150 mm test tubes, or equivalent. Use as primary filter Kopp Glass Co. Nos. C7380 and C5860 and as secondary filter Kopp Nos. C5113 and C3389 (C.S. No. 3-73), or equivalent.

(d) *Fluorescence reading tubes*.—Standardized 18 × 150 mm test tubes.

#### D. Preliminary Test for Appreciable Amount of Basic Substances

Proceed as in 967.21C (see 45.1.14).

#### E. Preparation of Test Solution

(a) *For dry products containing no appreciable amount of basic substances*.—Proceed as in 967.21D(a) (see 45.1.14). Dilute with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH solution, 967.21B(a)(1) (see 45.1.14), to ca 100 µg ascorbic acid/mL. Designate this volume as *V* mL. Filter solutions containing large amounts of suspended solids through Whatman No. 12 paper, or equivalent. Designate as test solution.

(b) *For dry products containing appreciable amounts of basic substances*.—Proceed as in 967.21D(b) (see 45.1.14). Then proceed as in (a), beginning "Dilute with..."

(c) *For liquid products*.—Proceed as in 967.21D(c) (see 45.1.14). Then proceed as in (a), beginning "Dilute with..."

(d) *For gelatin-encapsulated pharmaceutical products*.—Place test portion in small beaker and heat gently with enough proper extracting solution, 967.21B(a)(1) or (2) (see 45.1.14), to cover. If capsules do not disintegrate readily, crush with glass rod. Cool rapidly to room temperature. If appreciable amounts of basic substances are present, adjust pH to ca 1.2 with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution, 967.21B(a)(2) (see 45.1.14). Proceed as in (a), beginning "Dilute with..."

[Note: For products difficult to filter, proceed as in applicable section, (a), (b), (c), or (d), except dilute test solution with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH solution to ca 50 µg ascorbic acid/mL. Compare with standard solution prepared by diluting 5 mL ascorbic acid standard solution, 967.21D(b) (see 45.1.14), to 100 mL with H<sub>2</sub>O.]

#### F. Determination

Following steps must be performed consecutively without delay. Transfer 100 mL standard and test solutions to 300 mL Erlenmeyers. Add 2 g acid-washed Norit, shake vigorously, filter through Whatman No. 12 paper, or equivalent, discarding a few mL. Transfer 5 mL each filtrate to separate 100 mL volumetric flasks, containing 5 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOAc solution. Let stand 15 min swirling occasionally. Designate as standard or test blank solution respectively.

During 15 min period, transfer 5 mL of each filtrate to separate 100 mL volumetric flasks containing 5 mL CH<sub>3</sub>COONa solution and ca 75 mL H<sub>2</sub>O. Dilute to volume with H<sub>2</sub>O. Transfer 2 mL of each solution to each of 3 fluorescence reading tubes. Designate standard or test solution tubes, respectively.

At appropriate time, dilute blank solutions to volume with H<sub>2</sub>O. Transfer 2 mL of these solutions to each of 3 fluorescence reading tubes. Designate as standard or test solution blank tubes, respectively.

Using automatic pipetting machine, add 5 µL *o*-phenylenediamine solution to all tubes. Use Vortex mixer to swirl tubes. Protect from light and let stand 35 min at room temperature.

#### G. Fluorometry

Measure fluorescence of standard tube (*C*), standard blank tube (*B*), test solution tube (*X*), and test solution blank tube (*D*).

$$\text{mg Ascorbic acid/g, tablet, mL, etc.} = \frac{\text{average } X - \text{average } D}{\text{average } C - \text{average } B} \times (20 \times S \times V/E)$$

where *V* = initial test solution volume, *E* = number of g, tablets, mL, etc., and *S* = concentration of standard in mg/mL added to reading tube. References: *JAOAC* 48, 1248(1965); 50, 798(1967).

CAS-50-81-7 (ascorbic acid)

#### 45.1.16

### AOAC Official Method 984.26 Vitamin C (Total) in Food Semiautomated Fluorometric Method First Action 1984 Final Action 1985

(Applicable to all food products in the absence of erythorbate.)

#### A. Apparatus

(a) *Automatic analyzer*.—AutoAnalyzer II system equipped with flow scheme shown in Figure 984.26 (Pulse Instrumentation (1992) Ltd.).

(b) *Fluorometer*.—Aminco fluorocolorimeter equipped with flow cell and 4 watt lamp (SLM Instrument Inc., 810 W. Anthony Dr, Urbana, IL 61801, USA), or equivalent.

(c) *Fluorometer filter*.—Primary 7-60, band pass 70% *T* at 356 nm; secondary Technicon No. 126-0077-01, band pass 40% *T* at 440 nm, or equivalent.

(d) *Pipet*.—Pipetman, Model P-5000 (Rainin Instrument Co., Inc.), or equivalent.

(e) *Collection funnels*.—DisPo No. F-7501 (Scientific Products, Inc.), or equivalent.

(c) *o*-Phenylenediamine solution.—For each 100 mL solution required, weigh 20 mg *o*-phenylenediamine-2HCl (Aldrich-Sigma, No. P1526, or equivalent). Dilute to volume with H<sub>2</sub>O immediately before use.

(d) *Thymol blue pH indicator*.—Prepare as in 967.21B(d) (see 45.1.14).

(e) *Sodium acetate solution*.—Dissolve 500 g NaCH<sub>3</sub>COO·3H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O and dilute to 1 L.

(f) *Boric acid-sodium acetate solution*.—Dissolve 3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 mL NaCH<sub>3</sub>COO solution. Prepare fresh for each assay.

(g) *Acid-washed Norit*.—Add 1 L HCl (1 + 9) to 200 g Norit Neutral (Fisher Scientific Co., Carbon, decolorizing, C-170), heat to bp, and filter with vacuum. Remove cake to large beaker. Add 1 L H<sub>2</sub>O, stir, and filter. Repeat washing with H<sub>2</sub>O and filtering. Dry overnight at 110°–120°C.

#### C. Apparatus

(a) *Automatic pipetting machine*.—Brewer, Scientific Equipment Products (SEPCO; www.sepco.cc), or equivalent. Calibrate to deliver 5 mL aliquots.

(b) *Vortex mixer*.—Scientific Industries, Inc. (70 Orville Dr, Bohemia, NY 11716, USA), or equivalent.

(c) *Fluorometer*.—Aminco Fluoro-Microphotometer (SLM Instruments Inc., 810 W. Anthony Dr, Urbana, IL 61801, USA) with lamp F4T4/BL and cuvet adapter B12-63019 to accept 18 × 150 mm test tubes, or equivalent. Use as primary filter Kopp Glass Co. Nos. C7380 and C5860 and as secondary filter Kopp Nos. C5113 and C3389 (C.S. No. 3-73), or equivalent.

(d) *Fluorescence reading tubes*.—Standardized 18 × 150 mm test tubes.

#### D. Preliminary Test for Appreciable Amount of Basic Substances

Proceed as in 967.21C (see 45.1.14).

#### E. Preparation of Test Solution

(a) *For dry products containing no appreciable amount of basic substances*.—Proceed as in 967.21D(a) (see 45.1.14). Dilute with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH solution, 967.21B(a)(1) (see 45.1.14), to ca 100 µg ascorbic acid/mL. Designate this volume as *V* mL. Filter solutions containing large amounts of suspended solids through Whatman No. 12 paper, or equivalent. Designate as test solution.

(b) *For dry products containing appreciable amounts of basic substances*.—Proceed as in 967.21D(b) (see 45.1.14). Then proceed as in (a), beginning "Dilute with...".

(c) *For liquid products*.—Proceed as in 967.21D(c) (see 45.1.14). Then proceed as in (a), beginning "Dilute with...".

(d) *For gelatin-encapsulated pharmaceutical products*.—Place test portion in small beaker and heat gently with enough proper extracting solution, 967.21B(a)(1) or (2) (see 45.1.14), to cover. If capsules do not disintegrate readily, crush with glass rod. Cool rapidly to room temperature. If appreciable amounts of basic substances are present, adjust pH to ca 1.2 with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution, 967.21B(a)(2) (see 45.1.14). Proceed as in (a), beginning "Dilute with...".

[Note: For products difficult to filter, proceed as in applicable section, (a), (b), (c), or (d), except dilute test solution with HPO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH solution to ca 50 µg ascorbic acid/mL. Compare with standard solution prepared by diluting 5 mL ascorbic acid standard solution, 967.21B(b) (see 45.1.14), to 100 mL with H<sub>2</sub>O.]

#### F. Determination

Following steps must be performed consecutively without d

Transfer 100 mL standard and test solutions to 300 mL Erlenmeyers. Add 2 g acid-washed Norit, shake vigorously, filter through Whatman No. 12 paper, or equivalent, discarding a few mL. Transfer 5 mL each filtrate to separate 100 mL volumetric flasks, containing 5 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOAc solution. Let stand 15 min swirling occasionally. Designate as standard or test blank solution respectively.

During 15 min period, transfer 5 mL of each filtrate to separate 100 mL volumetric flasks containing 5 mL CH<sub>3</sub>COONa solution and ca 75 mL H<sub>2</sub>O. Dilute to volume with H<sub>2</sub>O. Transfer 2 mL of ea solution to each of 3 fluorescence reading tubes. Designate standard or test solution tubes, respectively.

At appropriate time, dilute blank solutions to volume with H<sub>2</sub>O. Transfer 2 mL of these solutions to each of 3 fluorescence reading tubes. Designate as standard or test solution blank tubes, respectively.

Using automatic pipetting machine, add 5 µL *o*-phenylenediamine solution to all tubes. Use Vortex mixer to swirl tubes. Protect from light and let stand 35 min at room temperature.

#### G. Fluorometry

Measure fluorescence of standard tube (C), standard blank tube (B), test solution tube (X), and test solution blank tube (D).

$$\text{mg Ascorbic acid/g, tablet, mL, etc.} = \frac{\text{average } X - \text{average } D}{\text{average } C - \text{average } B} \times (20 \times S \times V/E)$$

where *V* = initial test solution volume, *E* = number of g, tablets, mL etc., and *S* = concentration of standard in mg/mL added to reading tube

References: *JAOAC* 48, 1248(1965); 50, 798(1967).

CAS-50-81-7 (ascorbic acid)

#### 45.1.16

#### AOAC Official Method 984.26 Vitamin C (Total) in Food Semiautomated Fluorometric Method First Action 1984 Final Action 1985

(Applicable to all food products in the absence of erythorbate.)

#### A. Apparatus

(a) *Automatic analyzer*.—AutoAnalyzer II system equipped with flow scheme shown in Figure 984.26 (Pulse Instrumentation (1992) Ltd.).

(b) *Fluorometer*.—Aminco fluorocolorimeter equipped with flow cell and 4 watt lamp (SLM Instrument Inc., 810 W. Anthony Dr, Urbana, IL 61801, USA), or equivalent.

(c) *Fluorometer filter*.—Primary 7-60, band pass 70% *T* at 356 nm; secondary Technicon No. 126-0077-01, band pass 40% *T* at 440 nm, or equivalent.

(d) *Pipet*.—Pipetman, Model P-5000 (Rainin Instrument Co., Inc.), or equivalent.

(e) *Collection funnels*.—DisPo No. F-7501 (Scientific Products, Inc.), or equivalent.

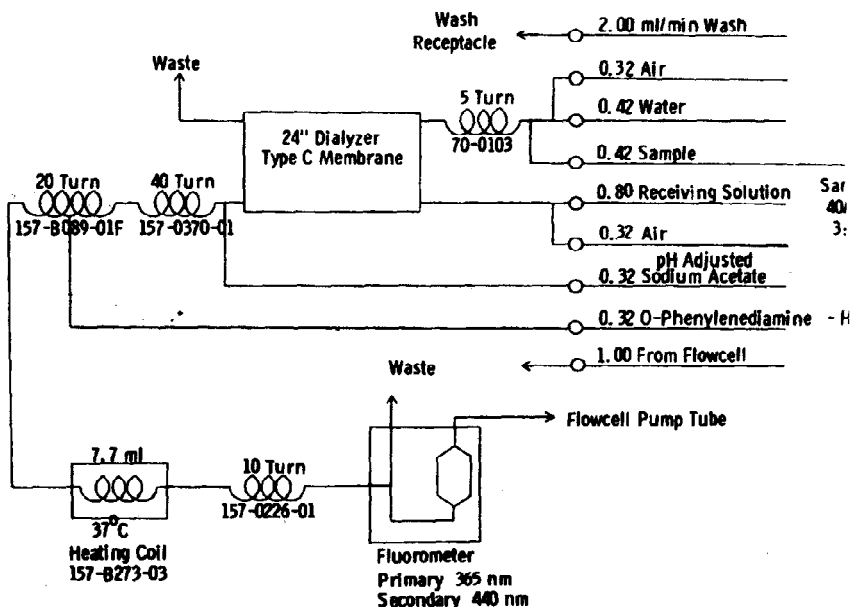


Figure 984.26. Flow scheme for semiautomated method of analysis for total vitamin C.

(g) *Osterizer blender*.—Pulsematic 16 (Scientific Products, Inc.), or equivalent.

(h) *Magnetic stirrer*.—Thermolyne (Scientific Products, Inc.), or equivalent.

(i) *Mechanical shaker*.—Wrist-action shaker (Burrell Corp.), or equivalent.

(j) *Dispensing pipet*.—Kimax No. 37075-F (Fisher Scientific Co.), or equivalent.

**B. Reagents**

(a) *Brij solution*.—35% Brij in H<sub>2</sub>O.

(b) *Extraction solvent*.—4.0% metaphosphoric acid-methanol (3 + 1, pH 2.1). Prepare fresh weekly.

(c) *Wash solution*.—Add 1.5 mL Brij solution to 1 L extraction solvent, and filter.

(d) *Dialysate receiving solution*.—1.5 mL Brij solution/L H<sub>2</sub>O.

(e) *Sodium acetate solutions*.—(1) Dissolve 302 g anhydrous sodium acetate in H<sub>2</sub>O; dilute to 1 L with H<sub>2</sub>O. Add 1.5 mL Brij solution, and filter. (2) Prepare solution as in (1); adjust pH to that of boric acid solution below (ca 6.9) with HCl.

(f) *Boric acid*.—Dissolve 5 g boric acid in 100 mL sodium acetate solution (1). Prepare fresh daily.

(g) *o-Phenylenediamine hydrochloride*.—0.5 mg/mL. Dissolve 50 mg o-phenylenediamine-HCl and dilute to 100 mL with H<sub>2</sub>O. Prepare fresh daily.

(h) *Acid-washed Norit*.—Add 1 L 10% HCl (1 + 9) to 200 g Norit Neutral (Fisher Scientific Co., carbon, decolorizing, C-170), heat to bp, and filter with vacuum. Remove cake to large beaker. Add 1 L H<sub>2</sub>O, stir, and filter. Repeat washing with H<sub>2</sub>O and filtering. Dry overnight at 110°–120°C.

(i) *Norit slurry*.—Add 20 g acid-washed Norit to extraction solvent and dilute to 100 mL. Transfer slurry to 125 mL Erlenmeyer equipped with magnetic stirrer apparatus. Mix slurry at rate to

(j) *Ascorbic acid standards*.—(1) 1. weigh 100 mg ascorbic acid (stored in volumetric flask, dissolve, and dilute to solvent. (2) 100 µg/mL.—Pipet 10 mL of at volumetric flask and dilute to volume with 10, 25 µg/mL.—Pipet 2, 10, and 25 mL separate 100 mL volumetric flasks, dilute to solvent.

**C. Standard Curve**

Add 1 mL (pipet) Norit slurry (0.2 g standard solution (2, 10, 25 µg/mL). Shake each volumetric flask to plastic cups at 10 min. Filter mixture (Whatman 2V), imm from DisPo funnels to AutoAnalyzer sam instrument. Adjust recorder so 25 µg/mL s peak. Pump other standard solutions throu

**D. Preparation of Test Solution**

(a) *Low moisture products*.—Grind to Accurately weigh test portion (maximum ca 1.5 mg ascorbic acid into plastic cup extraction solvent. Add 1 mL Norit slurry, Filter and pump filtrate through AutoAnaly introduced by moisture in product.

(b) *High moisture products (fruits and ve sample in blender. Weigh test portion of sl 5 g) containing ca 1.5 mg ascorbic acid into 1 and dilute to volume with extraction solvent. cap, shake, and transfer contents to cup. beginning "...cap, and shake 10 min."*

(d) *Blank determination.*—Replace pH-adjusted sodium acetate line with boric acid solution. Pump standards and test solutions through flow scheme to obtain blank values.

#### E. Calculations

Plot peak height of standard minus blank vs concentration. Obtain test portion concentration in  $\mu\text{g/mL}$  by comparing blank-corrected peak heights for each test solution with standard curve. No error is introduced by omitting 1 mL dilution from Norit slurry if it is omitted in both test portion and standard calculations. Calculate total vitamin C or dehydroascorbic acid level in original test sample as follows:

$$\text{Vitamin C, mg/100 g} = (C/W) \times 10$$

where  $C$  = concentration,  $\mu\text{g/mL}$ , of ascorbic or dehydroascorbic acid from calibration curve;  $W$  = test portion weight, g; and 10 is a combined factor taking into account 100 mL extract, level reported per 100 g, and conversion of  $\mu\text{g}$  to mg.

Reference: *JAOAC* 66, 1371(1983).

#### 45.1.17

### AOAC Official Method 975.42

#### Vitamin D in Vitamin Preparations

Colorimetric Method  
First Action 1975  
Final Action 1977

(Avoid exposure of solutions to actinic light throughout entire determination.)

#### A. Principle

Specific steps required depend upon whether preparation contains oils or not, if other fat-soluble vitamins are present, and concentration of vitamin D, as shown in Table 975.42.

(a) *Vitamin D concentrates without other vitamins.*—Preparation is saponified and extracted, and unsaponifiable material is treated with maleic anhydride to remove trans-isomers; however, certain other antirachitic-inactive isomers such as isotachysterol, if present, are not removed and are included in result. (Resin is treated directly with maleic anhydride without previous saponification and extraction.) After maleic anhydride treatment, solution is reacted with  $\text{SbCl}_3$  and  $A$  is determined at 500 nm. By confirmation test,  $K$ , values  $\leq 5\%$  are considered negative for isotachysterol. (Any appropriate technique for identification of isotachysterol may be used.) Vitamin D concentrates include vitamin D resins containing  $\geq 20\,000\,000$  IU/g,

vitamin D in oily solutions containing  $\geq 100\,000$  IU/g, in powders and aqueous dispersions containing  $\geq 25\,000$  IU/g.

(b) *Vitamin D in multivitamin preparations.*—Unsaponified and extracted, and unsaponifiable chromatographed successively on phosphate-treated silica to remove tocopherols, carotene, and BHT, if present. Purified test solution is treated with maleic anhydride to remove biologically inactive trans-isomer. Vitamin A, if present, is determined colorimetrically by  $\text{SbCl}_3$  reaction, modified to avoid interfering decomposition products of vitamin A in final solution.

#### B. Reagents

(a) *Solvents.*— $\geq 95\%$  Acetic anhydride, alcohol-free benzene, peroxide- and acid-free ether, acid-free peroxide- and acid-free polyethylene glycol 600, toluene.

(b) *Petroleum ether.*—bp  $40^\circ$ – $60^\circ\text{C}$ .

(c) *Ethyl ether–petroleum ether eluants.*—8 and 10 parts petroleum ether.

(d) *Ethylene dichloride.*—Spectrophotometrically equivalent.

(e) *Acetyl chloride.*—Available in ampules. See monograph and freshly redistilled.

(f) *Column chromatography materials.*—(1) *Alumina, hydrogen phosphate.*— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . (3) *Fluorescent earth.*—Acid-washed Chromosorb W, 80–100 mesh (1) *Granular filler's earth.*—Florex-XXS (Floridin Co.), 150–250  $\mu\text{m}$  fraction.

(g) *Color-inhibiting solution.*—Isooctane–acetic anhydride (1 + 1 + 1).

(h) *Sodium ascorbate solution.*—20%. Dissolve 20 g acid in 20 mL 1M NaOH. Prepare fresh daily.

(i) *Potassium hydroxide solutions.*—3, 6, and 50%.

(j) *Pyrogallol solution.*—20%. Dissolve 20 g dilute to 100 mL with alcohol.

(k) *Sodium sulfide solution.*—10%. Dissolve 12 g in 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  and dilute to 100 mL with 87% glycerol.

(l)  $\beta$ -Carotene solution.—0.01% in isooctane.

(m) *Maleic anhydride solutions.*—(1) *Stock solution.* Dissolve 10 g maleic anhydride (distilled, bp  $196^\circ\text{C}$ ) in 100 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (clear solution, stable ca 1 month). (2) *Working solution.* before use, dilute aliquot with toluene to obtain 1% solution.

(n) *Color reagent.*—(Caution:  $\text{SbCl}_3$  is toxic.) Avoid contact with skin and eyes and breathing

Table 975.42. Scheme for analysis of preparations of vitamin D with and without other fat-soluble vitamins<sup>a</sup>

Preparations	IU/g	Steps for preparations without other vitamins	Steps for preparation with vitamin A and other vitamins
Oily solutions	500–100 000	A + E + I	A + E + I
	$\geq 100\,000$	A + I	A + I
Powders, capsules, tablets, and aqueous dispersions	200–25 000	B + E + I	B + E + I
	$\geq 25\,000$	B + I	B + I
Vitamin D concentrates	$> 20\,000\,000$	C + G + I	C + G + I

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Fernanda Montaña Alarcón, C I.171941762-6, autor del trabajo de graduación intitulado “Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) por HPLC” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS en la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a al SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 21 de septiembre de 2011

Sra. Fernanda Montaña

C.I.171941762-6