

Optimización de la determinación por polarografía diferencial de impulsos de ácido ascórbico en fórmulas para lactantes

Optimization of a differential pulse polarography determination of ascorbic acid in infant formulas

MANGLANO P, FARRÉ R, FRIGOLA A, LAGARDA MJ

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina legal. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100- Burjassot. E-mail: m.j.lagarda@uv.es

Este trabajo forma parte del proyecto financiado por FEDER + ID (Ref. 1FD97-0284). Pilar Manglano disfrutó de una beca y posteriormente de un contrato durante la realización del proyecto

RESUMEN

El objeto del estudio es la selección de las condiciones adecuadas para la preparación de la muestra y las instrumentales para la determinación de ácido ascórbico en fórmulas de base láctea para lactantes por polarografía diferencial de impulsos. La bondad del método se estima determinando los parámetros analíticos. Se obtiene un límite de detección equivalente a 15 mg de ácido ascórbico por 100 g de fórmula, una respuesta lineal en el intervalo de 15 a 550 mg de ácido ascórbico por 100g de muestra, una precisión inter día del 4,33% y una recuperación del 95%, valores que indican la bondad del método para el fin propuesto.

PALABRAS CLAVE: Ácido ascórbico. Fórmulas para lactantes. Polarografía diferencial de impulsos.

ABSTRACT

The aim of the study was to select the adequate sample treatment and instrumental conditions to measure, by means of differential pulse polarography, ascorbic acid content in milk-based infant formulas. Once selected the quality of the method was estimated through the analytical parameters. A detection limit equivalent to 15 mg of ascorbic acid per 100g formula, a linear response in the range from 15 to 550 mg of ascorbic acid per 100g sample, an intra day precision of 4.33% and an a recovery of 95%, indicated the method was appropriate for achieving the purpose mentioned.

KEY WORDS: Ascorbic acid. Infant formulas. Differential pulse polarography.

INTRODUCCIÓN

En la elaboración de fórmulas para lactantes se adiciona vitamina C en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades durante las primeras etapas de la vida y para cumplir con los requisitos legales. Según la legislación vigente¹ los contenidos de vitamina C de las fórmulas deben hallarse en el intervalo comprendido entre los 8 y 25 mg/ 100kcal, lo que equivale a 41,84 y 130,75 mg/ 100g, respectivamente.

INTRODUCTION

In the manufacture of infant formula preparations, vitamin C is added in sufficient quantities to satisfy infant needs throughout the first stages of life, and to comply with established legal requirements. According to current legislation¹, the Vitamin C content in such formulas should fall within the range of 8 to 25mg/100kcal, this being equivalent of 41.84 & 130mg/100g respectively.

Los métodos propuestos para la determinación de ácido ascórbico en los alimentos son numerosos y variados. En el caso de las fórmulas para lactantes los métodos basados en procesos de oxidación-reducción son poco específicos debido a la presencia de lactosa en el medio. El método fluorimétrico basado en la formación de un compuesto fluorescente entre el ácido dehidroascórbico y la orto-fenilendiamina es laborioso, y los métodos por cromatografía líquida de alta resolución tienen interés cuando se pretende determinar simultáneamente los ácidos ascórbico, dehidroascórbico e isoascórbico. Dado que en nuestro departamento la polarografía se ha utilizado ampliamente para la determinación de ácido ascórbico en vegetales^{2,3,4}; se pensó que dicha técnica podía aplicarse a la determinación de ácido ascórbico en fórmulas para lactantes, considerando que a las fórmulas se les adiciona dicho ácido y que la polarografía permite su determinación de forma específica.

Pero, al aplicar a fórmulas lácteas el método por polarografía diferencial de impulsos propuesto por Lau et al.⁵ para vegetales se obtiene una onda polarográfica mal definida, y contenidos variables de ácido ascórbico en función de las condiciones de extracción. Por lo que, el objeto del presente trabajo es la selección de las condiciones adecuadas para optimizar la extracción, mejorar la definición de las ondas polarográficas e incrementar la reproducibilidad del método.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aparato: Polarógrafo VA Trace Analyzer, Metrohm con módulo básico 74 VA Stand, electrodo de gota de mercurio, electrodo de referencia de calomelanos y electrodo auxiliar de platino.

Reactivos: acetato sódico anhidro, ácido L (+)-ascórbico, ácido oxálico 2-hidrato, ácido tricloroacético, sulfato sódico anhidro. Todos ellos Panreac calidad para análisis. Agua desionizada sistema Millipore Milli-Q.

Muestra certificada de referencia (fórmula de base láctea anhidra, en polvo, para lactantes) SRM1846, NBS, NIST de los EE.UU.

Disolución patrón de ácido ascórbico (1mg/mL): Se pesan 0.01g de ácido ascórbico y se disuelven en ácido oxálico al 1% completando el volumen a 10 mL.

Numerous and varying methods for the determination of ascorbic acid content in foodstuffs have been proposed. In the case of infant formulas, methods based on oxidation-reduction processes are not sufficiently specific, due to the presence of lactose within the medium. The fluorimetric method, based on the formation of a fluorescent compound between dehydroascorbic acid and ortho-phenyldiamine is laborious. High resolution liquid chromatography methods are of greater interest when ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acids are to be determined simultaneously. In our department, polarography has been extensively used for the determination of ascorbic acid in vegetables^{2,3,4}. As a result, it was thought that this technique could be of value in the determination of ascorbic acid in infant formulas, given that this acid is added to these formulas, and the polarograph permits its specific determination.

However, on applying the method to milk fat preparations, the differential pulse polarography method proposed by Lau et al.⁵ for vegetables, gives a poorly defined wavelength and a variable ascorbic acid content that is dependent upon the extraction conditions involved. Consequently, the objective of the present study is to select the appropriate conditions to optimise extraction, improve polarographic wavelengths and to increase the reproducibility of the method.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus: Polarograph VA Trace Analyzer, Metrohm basic 74 VA stand module, mercury droplet electrode, calomel reference electrode and auxiliary platinum electrode.

Reagents: Sodium acetate anhydrous, L(+)-ascorbic acid, oxalic acid 2-hydrate, trichloroacetic acid and sodium sulphate anhydrous. All of which were of Panreac analysis quality. Deionized water Millipore Milli-Q system.

Certified reference sample (anhydrous powdered milk formula, for infants) SRM1846, NBS, NIST from the USA.

Standard ascorbic acid solution (1mg/mL): 0.01g of ascorbic acid were weighed and dissolved into oxalic acid at 1% bringing to a volume of 10mL.

Extraction solution: Trichloroacetic acid at 2%, oxalic acid at 1% and sodium sulphate anhydrous at 1%. The solution was subsequently dissolved

Disolución de extracción: contiene ácido tricloroacético al 2%, ácido oxálico al 1% y sulfato sódico anhidro al 1%. Para prepararla se disuelve en agua destilada 10g de ácido tricloroacético, 7,09g de ácido oxálico y 5g de sulfato sódico anhidro completando a 500 mL con agua.

Disolución amortiguadora: acetato 2.5M/ ácido acético 2M (pH 4,8): Se pesan 20,5075g de acetato sódico, se disuelven en unos 30-40mL de agua y se añaden 11,5mL de ácido acético, se agita en placa hasta completa disolución y se enrasa a 100 mL. Se comprueba el pH.

Muestra: Fórmula adaptada de base láctea para lactantes. Valor energético y contenidos de nutrientes por 100g: energía 523 kcal; proteínas 11,2 g; hidratos de carbono 54,2 g; grasas 29,0 g; hierro 6.3 mg; vitamina C 52,9 mg; vitamina E 7,8 mg.

Extracción: A 0,5g de muestra se le añade 25 mL de la disolución de extracción, se agita para facilitar la extracción y se filtra.

Para optimizar la determinación se procede a seleccionar las condiciones adecuadas de extracción, tiempo de agitación y tamaño de muestra.

Determinación polarográfica: Se introduce en la cubeta del polarógrafo 1 mL del extracto filtrado, se añaden 9 mL de ácido oxálico al 1% y 2 mL de la disolución de acético/acetato (pH 4,8) que actúa como disolución amortiguadora y electrolito de soporte. Para la determinación cuantitativa se aplica el método de la adición de patrón.

Condiciones instrumentales: Modo- DME (electrodo de gotas de mercurio); amplitud de impulso 50mV; barrido de potencial de -0.10 a +0.20V; velocidad de barrido 5mV/s, tamaño de gota medio; tiempo de goteo 1s/gota; amortiguación 0; velocidad del papel 100 mV/cm y tiempo de desaireación: al principio de la determinación 9 minutos de agitación y 1 minuto de reposo, y, entre medida y medida, 1 minuto de agitación y 1 minuto de reposo; electrodo de referencia de calomelano.

PARÁMETRO ANALÍTICOS

Para evaluar la calidad del método y comprobar su utilidad para la determinación de ácido ascórbico se determinan los parámetros analíticos del método: linealidad, límite de detección, precisión y exactitud.

into distilled water, 10g of trichloroacetic acid, 7.09g of oxalic acid and 5g of sodium sulphate anhydrous, bringing to 500mL with water.

Buffer solution: 2.5M acetate/acetic acid 2M (pH 4.8): 20.5075g of sodium acetate were weighed and dissolved into 30-40mL of water, to which 11.5mL of acetic acid were added. The mixture was stirred on a plate stirrer until complete dissolution, and was levelled at 100mL. pH was checked.

Sample: Adapted milk based infant formula. Energetic value and nutrient content per 100g: energy 523Kcal, proteins 11.2g, carbohydrates 54.2g, fats 29.0g, iron 6.3mg, vitamin C 52.9mg, vitamin E 7.8mg.

Extraction: 25mL of extraction solution was added to 0.5g of sample, the mixture was stirred, in order to facilitate the extraction process, and was finally filtered.

So as to optimise the determination process, the appropriate extraction conditions, stir time and size of the sample were chosen.

Polarographic determination: 1mL of filtered extract was introduced into the polarograph cell to which 9ml of oxalic acid at 1% and 2mL of acetic/acetate solution (pH 4.9), acting as a buffer solution and supporting electrolyte, were added. For quantitative determination, the method of addition of standard was applied.

Instrumental conditions: Mode-DME (drop mercury electrode), pulse width 50V/s, scanning of potential of -0.10 to +0.20V, scanning speed 5mV/s, medium-sized droplet, drop rate of 1s/drop, buffering 0, paper velocity 100mV/cm and de-aeration time: on beginning of determination, 9 minutes of stirring and 1 minute left to stand, and, between one measurement and another, 1 minute of stirring and 1 minute left to stand, calomel reference electrode.

ANALYTICAL PARAMETERS

In order to evaluate the quality of the method and to check its usefulness as a means for determining ascorbic acid, the analytical parameters of the method were measured as: lineality, detection limit, precision and accuracy.

The detection limit was considered as the minimum quantity of ascorbic acid required to produce a signal that could be differentiated from the base line.

El límite de detección se estima determinando la mínima cantidad de ácido ascórbico que proporciona una señal que se diferencia de la línea de base.

La linealidad se determina adicionando alícuotas de 10 µg de ácido ascórbico a la cubeta del polarógrafo, que contiene 1 mL de la disolución de extracción, 9mL de ácido oxálico al 1% y 2 mL de disolución amortiguadora de acetato sódico anhidro-ácido acético.

La exactitud se evalúa mediante ensayos de recuperación de patrón adicionado a la matriz (120 mg/ 100g de fórmula) y el análisis de una muestra patrón de referencia (fórmula en polvo de base láctea anhidra para lactantes) SRM1846, NBS, NIST de los EE.UU.

RESULTADOS

Como ya se ha indicado en la introducción, cuando el método de Lau et al.⁵ se aplica a la determinación de ácido ascórbico en fórmulas lácteas se obtienen ondas polarográficas mal definidas. En ensayos preliminares se comprueba que la definición de dichas ondas mejora cuando no se agita de forma continua durante la extracción, pero entonces disminuye el rendimiento de ésta. Se observa asimismo que la eliminación del aire, por desplazamiento con nitrógeno durante la extracción mejora el rendimiento de la misma.

Tiempo de agitación- se analizan doce alícuotas de una misma muestra, en dos días distintos. Se elimina el aire por borboteo de nitrógeno y se aplica una agitación lenta. Dos alícuotas se someten a agitación de un 1 minuto, otras dos a 2 minutos y las dos restantes se agitan durante 5 minutos. El ensayo se repite al día siguiente con las seis alícuotas restantes. Los resultados obtenidos, expresados en contenido medio de ácido ascórbico (mg/ 100g de muestra) se indican en el cuadro nº 1.

Lineality was determined by adding aliquots of 10µg of ascorbic acid to the polarograph cell containing; 1mL of extraction solution, 9mL of oxalic acid at 1% and 2mL of sodium acetate anhydrous-acetic acid buffer solution.

Accuracy was evaluated by means of recovery tests of standard added to the matrix (120 mg/ 100g of formula) and the analysis of a reference standard sample (anhydrous milk based infant formula in powdered form) SRM1846, NBS, NIST (USA).

RESULTS

As mentioned in the introduction, when the Lau et al.⁵ method was applied to ascorbic acid determination in milk formulae, poor polarographic wavelengths were obtained. In preliminary tests, an improvement of such wavelengths can be observed, if the solution is not stirred continuously during the extraction process. However, in this case the extraction yield decreases. It was also observed, on the other hand, that the elimination of air, through displacement with nitrogen during extraction, improves yield.

Stirring time- twelve aliquots of the same sample were analysed, on two different days. Air was eliminated through the bubbling of nitrogen and slow stirring was applied. Two aliquots were subjected to stirring for a period of 1 minute, another two for 2 minutes, and the remaining two for 5 minutes. The test was repeated the following day with the other set of six aliquots. The results obtained, expressed in terms of average ascorbic acid content (mg/100g of sample), are shown in table no.1.

CUADRO 1. Contenidos de ácido ascórbico (mg/100g) obtenidos con 1, 2 y 5 minutos de agitación.

Ensayo intradía	1 minuto	2 minutos	5 minutos
X ± DE	44,86 ± 0,43	52,09 ± 1,67	50,60 ± 5,18
CV %	0,95	3,21	10,23
Ensayo interdía			
X ± DE	42,32 ± 3,89	54,59 ± 3,07	49,90 ± 3,65
CV %	9,19	5,63	7,32

X = contenido medio; DE = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación

TABLE 1. Ascorbic acid content (mg/100g) obtained from stir periods of 1, 2, and 5 minutes.

Intraday tests	1 minute	2 minutes	5 minutes
X ± SD	44.86 ± 0.43	52.09 ± 1.67	50.60 ± 5.18
CV (%)	0.95	3.21	10.23
Intraday tests			
X ± SD	42.32 ± 3.89	54.59 ± 3.07	49.90 ± 3.65
CV (%)	9.19	5.63	7.32

X = average content, SD = Standard deviation, CV = Coefficient of variation.

El mayor contenido y el menor coeficiente de variación en ensayos interdía corresponden a un tiempo de agitación de 2 minutos.

Dada la labilidad del ácido ascórbico frente a la exposición a los rayos UV se repite el ensayo, con cuatro tiempos de agitación (1, 2, 3 y 5 minutos), protegiendo al ácido ascórbico frente a la acción de la luz, mediante recubrimiento externo de las paredes del recipiente en el que se realiza la extracción. Además, para favorecer la precipitación de las proteínas se ensaya un tiempo de reposo de 5 minutos tras la agitación. En el cuadro n° 2 se indican los contenidos medios, desviación estándar y coeficiente de variación, de ácido ascórbico obtenidos para los cuatro tiempos de agitación ensayados.

The highest content and the lowest variation coefficient were obtained in the tests with stir periods of 2 minutes.

Due to the lability of ascorbic acid on exposure to UV rays, the test was repeated with four different stir time periods (1, 2, 3 & 5 minutes), where the ascorbic acid was protected from the effect of daylight by covering the external walls of the container in which extraction was carried out. Furthermore, so as to facilitate the precipitation of proteins, a standing time of 5 minutes after stirring was tested. In table no.2 average content, standard deviation and coefficient of variation are shown for ascorbic acid obtained from the four stir time periods tested.

CUADRO 2. Contenidos de ácido ascórbico (mg/100g) obtenidos con 1, 2 y 5 minutos de agitación y 5 minutos de reposo tras la extracción.

Contenidos mg/100g	1 minuto	2 minutos	3 minutos	5 minutos
X ± DE	41,43 ± 2,55	50,70 ± 1,40	46,74 ± 3,82	48,80 ± 5,58
CV %	6,16	2,76	8,17	11,44

X = contenido medio; DE = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación

TABLE 2. Ascorbic acid content (mg/100g) obtained from stir periods of 1, 2, and 5 minutes and left to stand for a 5 minute period after extraction.

Contents mg/100g	1 minute	2 minutes	3 minutes	5 minutes
X ± SD	41.43 ± 2.55	50.70 ± 1.40	46.74 ± 3.82	48.80 ± 5.58
CV (%)	6.16	2.76	8.17	11.44

X = average content, SD = Standard deviation, CV = Coefficient of variation.

Tras este ensayo se comprueba que 1 minuto de agitación es insuficiente, siendo 2 minutos de agitación, en este caso seguidos de 5 minutos de reposo, el tiempo de extracción más adecuado. Se comprueba asimismo que la protección frente a la luz reduce la variabilidad.

After this test, it was observed that a 1 minute stir period was insufficient. A stir period of 2 minutes, followed by 5 minutes standing time, was found to be the most appropriate extraction time. Similarly, the protection measures taken against daylight were found to reduce variability.

Selección del tamaño de muestra.

Para confirmar el tamaño más adecuado de muestra para la extracción se analizan por triplicado, aplicando las condiciones seleccionadas, alícuotas de 0,5; 0,6 y 0,7 g de una muestra de fórmula para lactantes. Se calcula el coeficiente de variación de los contenidos que se indican en el cuadro nº 3.

Selection of sample size.

In order to confirm the most suitable sample size for extraction, analyses in triplicate, applying the selected conditions, were carried out on aliquots of 0.5; 0.6 & 0.7g of infant formula samples. The coefficient of variation of the contents were calculated and are shown in table no.3.

CUADRO 3. Influencia del tamaño de muestra en la variabilidad- Coeficientes de variación obtenidos con alícuotas de 0,5, 0,6 y 0,7 g de una muestra de fórmula para lactantes.

Muestra	0,5 g	0,6 g	0,7 g
CV %	4.74	6.99	4.61

CV = Coeficiente de variación

TABLE 3. The influence of sample size on variability- Coefficients of variation obtained from aliquots of 0.5, 0.6 & 0.7g of infant formula sample.

Sample	0.5 g	0.6 g	0.7g
CV (%)	4.74	6.99	4.61

CV = Coefficient of variation

De los ensayos realizados se concluye que las condiciones adecuadas para el proceso de extracción son: 0,5g de muestra, extracción en recipiente protegido frente a la acción de la luz (papel de aluminio) y agitación lenta en atmósfera de nitrógeno durante 2 minutos, seguida de un tiempo de reposo de 5 minutos.

Aplicando estas condiciones de extracción y las de determinación polarográfica mencionadas

The results of the tests carried out concluded that the most suitable conditions for the extraction process are as follows: 0.5g of sample, extraction carried out in a light protected container (aluminium foil) and slow stirring in an atmosphere of nitrogen for a period of 2 minutes, followed by a standing time of 5 minutes.

In the case of infant formula, with the application of these conditions for extraction, as well

en el apartado material y métodos a una fórmula para lactantes se obtienen polarogramas como el representado en la figura 1.

as those previously mentioned in the materials and methods section for polarographic determination, polarograms as shown in figure 1 may be obtained.

FIGURA 1. Polarogramas correspondientes a la determinación de ácido ascórbico en la muestra de fórmula de base láctea. Adiciones de 10 μg de ácido ascórbico.

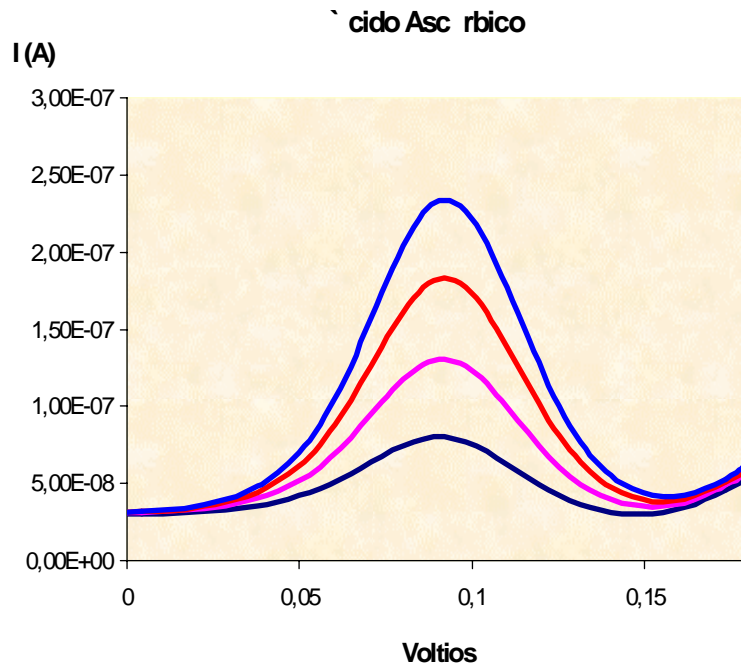
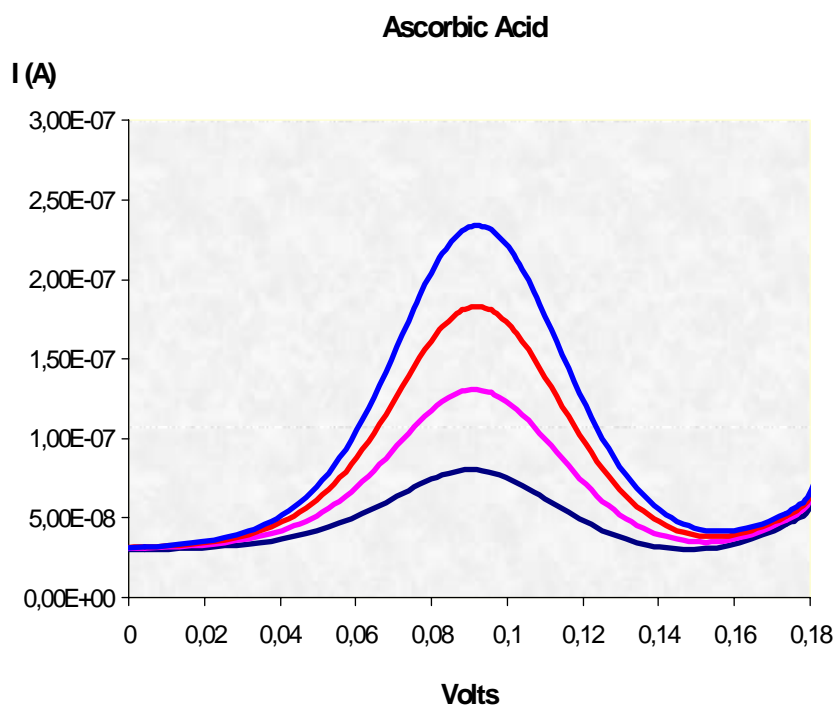


FIGURE 1. Corresponding polarograms for the determination of ascorbic acid in milk based formula sample. Additions of 10 μg of ascorbic acid.



*Parámetros analíticos del método.**Analytical parameters of the method.*

Los resultados obtenidos se indican en el cuadro nº 4.

The results obtained are shown in table no.4.

CUADRO 4. Parámetros analíticos de la determinación de ácido ascórbico en fórmulas para lactantes por polarografía diferencial de impulsos.

Limite de detección	15 mg ácido ascórbico / 100g de fórmula	
Linealidad	3 a 110 µg / en cubeta	$y = 5,6817x - 8,9548$
	15 a 550mg / 100g muestra	$r = 0,9998$
Precisión CV %	Instrumental	2,91
	Método- intradía	2,76
	Método interdía	4,33
Exactitud	Recuperación	$95,09 \pm 5,73$
Muestra certificada	Valor certificado mg/ 100g	Valor hallado mg/ 100g
SRM 1846	$114,60 \pm 6,66$	$105,36 \pm 4,56$

TABLE 4. Analytical parameters of ascorbic acid determination in infant formulas through differential pulse polarography.

Detection limit	15mg ascorbic acid/100g of formula	
Lineality	3 to 110µg/in tanks	$y = 5.6817x - 8.9548$
	15 to 550mg/100g sample	$r = 0.9998$
Precision CV %	Instrumental	2.91
	Intraday-method	2.76
	Intraday-method	4.33
Accuracy	Recovery	95.09 ± 5.73
Certified sample	Certified value mg/100g	Found value mg/100g
SRM 1846	114.60 ± 6.66	105.36 ± 4.56

CONCLUSIONES

El método de determinación optimizado y evaluado es útil para la determinación de ácido ascórbico en fórmulas para lactantes en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 15 y 550 mg/ 100g de fórmula láctea.

CONCLUSIONS

The evaluated and optimised method for determination is useful for the determination of ascorbic acid in infant formula within the range of concentrations of 15 to 550mg/100g of infant formula.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Hero España S.A. su colaboración en este estudio.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Hero España S.A. for their collaboration in this study.

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. RD 1091/2000. RTS por la que se aprueba la reglamentación específica de los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales. BOE de 9 de junio de 2000.
2. Aparicio P, Farré R, Frígola A. Determinación de ácido ascórbico en vegetales por polarografía diferencial de impulsos. *Anales de Bromatología* 1992; XLIV (4): 257-261.
3. Esteve MJ, Farré R, Frígola A, López JC, Romera JM, Ramírez M, Gil A. Comparison of voltametric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chemistry* 1995; 52: 99-102.
4. Guedes de Miranda LC. Evaluación del poder antioxidante de cítricos y derivados. Tesis Doctoral, Valencia, 2000.
5. Lau OW, Shin KK, Chang ST. Determination of ascorbic acid in vegetables and fruits by differential pulse polarography. *J Sci Food Agric* 1985; 36 (8): 733-739.