

Nuevo método de valoración de ácido ascórbico en vegetales frescos. I. Ensayos preliminares

ANGEL HOYOS DE CASTRO Y FRANCISCO CORRAL DIAZ

Estabilidad de la solución. Tillmans en agua. - Solubilidad

En el método de Pepkowitz empleado en el trabajo de valoración de vitamina C en naranjas, encontramos algunos inconvenientes derivados de la inestabilidad de la solución acuosa de Tillmans. Efectivamente, la bibliografía hace mención de esa inestabilidad como se puede ver a continuación.

En la preparación de la solución de reactivo de Tillmans para valoración de la vitamina según la técnica de R. Stroheker y R. Vaubel que se inserta en el libro "Métodos físico-químicos para la valoración de vitaminas" de F. Gstirner, dice: "La solución preparada con agua templada se conserva bien en nevera hasta cuatro semanas, pero, a pesar de ello, conviene comprobar de vez en cuando el factor determinado después de la preparación, sobre todo cuando se desee hacer una valoración exacta".

La solución preparada, según Tauber y Kleiner (1) disolviendo 50 miligramos en 150 c.c. de agua hirviendo, se conserva *inalterada*, según los autores, durante cuatro días.

W. Dewjatnin y W. Dorosxhenko (1) en su técnica afirman que el D. F. I. N/1000 es sensible a la luz y a la temperatura y emplean en su solución acuosa escasa cantidad de tampón fosfato de pH 7.

Th. Birch, L. Harris y S. Ray (1) en su micrométodo, preparan la solución con *agua hirviendo cada vez*, porque, si es vieja, el color rojo *vira al pardo en vez de desaparecer y convertirse en amarillo pálido*.

Para facilitar la solubilidad del Tillmans A. Fujita y T. Ebihara (1) recomiendan añadir eventualmente unas gotas de NaOH N/100 y *prescriben su preparación diaria*.

La A. O. A. C. ha adoptado provisionalmente la utilización de la solución acuosa de Tillmans, preparada con ayuda de un escaso volumen de solución 0.05 M de bicarbonato sódico, *que debe valorarse diariamente y desecharse cuando mezclados 15 c.c. con 15 c.c. de la solución extractora que contenga un exceso de ascórbico no produzcan un líquido práctica-*

mente incoloro. La solución de Tillmans en ácido oxálico al 2 por 100, ensayada recientemente por J. Koch y G. Bretthauer (2), carece de estabilidad por lo que dichos autores se inclinan por el empleo de comprimidos dosificados de reactivo para preparación extemporánea de uso inmediato.

Estabilización de la solución Tillmans en xileno

Siguiendo el método de Folkman, observamos que las soluciones de Tillmans en xileno, que coleccionábamos después de colorimetrar para aprovechamiento del xileno por destilación, conservaban su color y transparencia iniciales, y para asegurarnos de ello dispusimos a la luz difusa una solución de Tillmans en xileno conseguida por adición de ácido metafosfórico a la solución acuosa azul de aquel reactivo y arrastre por agitación del Tillmans rojo al xileno.

La solución roja de Tillmans en xileno dio los valores siguientes de densidad óptica en el absorciómetro Spekker de Hilger :

Fecha	Densidad óptica (x 100)
Día 28 de marzo	48,2
Día 31 de marzo	47,4 — 47,2
Día 5 de abril	47,8 — 48,0
Día 19 de abril	47,2
Día 27 de abril	47,9 — 47,2
Día 15 de mayo	48,2

Resultados que indican estabilidad completa en el color, en contraste con las soluciones acuosas de Tillmans que son inestables, pues los llamados estabilizadores no permiten prescindir de las comprobaciones periódicas de título cada dos o tres días por 20-25 días como máximo, ni aún manteniéndolas en *refrigeradora y a resguardo de la luz*.

Hemos hecho la lectura por duplicado para compensar en lo posible las variaciones momentáneas de la tensión de la red eléctrica en el momento de la lectura colorimétrica.

El medio aconsejado por Th. Birch, L. Harris y S. Ray y por la A. O. A. C. para comprobar el buen estado de la solución acuosa de Tillmans nos parece adecuado aplicarlo a la solución de Tillmans en xileno. Con esta finalidad se han hecho los ensayos siguientes :

1.º En dos probetas se han dispuesto 10 c.c. de la solución de Tillmans en xileno preparada por *disolución en frío* del Tillmans en agua y siguiendo por lo demás la marcha reseñada para su obtención. Han sido decolorados por un exceso de solución de ascórbico en metafosfórico según la técnica II inserta más adelante. La solución de Tillmans en xileno contaba con 12 días desde su preparación.

Solución Tillmans-Xileno	Xileno residual	
D. O. × 100 inicial	D. O. × 100	Transm.
66,6	0,8	98,2
66,4	0,8	98,2

2.º Los ensayos anteriores se repiten con una solución de xileno Tillmans preparada por disolución del Tillmans en agua caliente, de acuerdo con la pauta general señalada.

Solución Tillmans-Xileno	Xileno residual	
D. O. × 100 inicial	D. O. × 100	Transm.
52,0	0,8	98,2
52,5	0,7	98,5

La solución fue preparada el día 25 de septiembre y ensayada el 21 de diciembre último; han transcurrido 87 días desde su preparación.

Podemos concluir que la solución de Tillmans en xileno preparada por nosotros, permanece inalterable en su color y EN SU CAPACIDAD REACTIVA PARA CON LA VITAMINA C. La calefacción al baño de maría de su solución acuosa no presenta inconveniente alguno.

Características del Xileno

Comprobada mediante las experiencias anteriores la estabilidad de la solución de Tillmans en xileno, intentamos encontrar el mejor procedimiento para su preparación.

Existen tres isómeros del xileno, cuyas características, según Beilstein y Karrer, son :

o-xileno	P. e. 142°C
m-xileno	P. e. 139°C
p-xileno	P. e. 138°C

El xileno comercial suele ser (3) una mezcla de los isómeros m- y o- del dimetilbenceno. Líquido claro, insoluble en agua, miscible con alcohol, éter y cloroformo. Su p. e. es de 137-140°C. Las tensiones de vapor del agua y de sus componentes son, según también Beilstein :

Substancia	Tensión de vapor	Temperatura
o-xileno	6,4	10°
	10,05	20°
m-xileno	3,45	10°
	6,43	20°
agua	9,209	10°
	18,535	20°

La tensión de vapor del xileno comercial es mucho menor que la del agua y las soluciones que lo empleen conservan su título o concentración mejor que las acuosas.

Ensayos para la obtención de la solución de Tillmans en xileno

Para la obtención de la solución de Tillmans en xileno se han hecho los siguientes ensayos:

1.° Tratamos de disolver Tillmans (como en experiencias anteriores se trata del compuesto sódico comercial) en xileno directamente; su solubilidad es escasa, comunicando al xileno color rojo; las partículas no disueltas conservan el color azul.

2.° Adicionando previamente un poco de solución acuosa diluida de ácido metafosfórico, se facilita la disolución en xileno.

3.° Tratamos 14 miligramos de Tillmans con 20 gramos de glicerina en un mortero, tomando el conjunto color azul y aspecto homogéneo. Añadimos unos centímetros cúbicos de (4 a 5) de metafosfórico al 10 por 100, que adquiere color morado sin mezclarse con la glicerina. Al agitar con xileno en ampolla de separación, éste toma color rojo pero apenas arrastra al Tillmans; las tres soluciones permanecen separadas. Al añadir agua destilada el color de las soluciones acuosa y glicérica, ahora unidas, vira al rojo y la agitación hace que el colorante pase al xileno.

4.° Se ha intentado facilitar la solubilidad empleando a la par el ácido bórico y la glicerina con la idea de hacerla ácida una vez disuelto en ella el Tillmans por formación del complejo glicerobórico; se ha utilizado también el ácido láctico y la glicerina sin conseguir el resultado deseado. En todos los casos quedan partículas no solubilizadas en ninguna de las fases.

5.° La mejor forma de preparación ensayada va incluida más adelante.

Propiedades de la solución de Tillmans en xileno

- Agitando solución de Tillmans-xileno con una solución acuosa que tiene un pH próximo a 7, pasa algo de Tillmans a la solución acuosa.
- La adición de alcohol a la solución acuosa de pH 7, hace cam-

biar el color a la solución de Tillmans-xileno y determina el paso de Tillmans al agua con color azul.

c) *Alcalinizando la solución acuosa fuertemente y agitando, todo el Tillmans pasa al agua con color azul; el xileno queda incoloro.*

Esta última propiedad ha sido evidenciada por nosotros y no hemos encontrado antecedente alguno en la amplia bibliografía consultada.

Influencia del pH en colorimetría

Para realizar las experiencias se han preparado las soluciones "standard" que siguen:

Fosfato sódico 0,2 N.—Pesar 3,56 g; disolver y completar a 100 c.c. con agua destilada.

Acido cítrico 0,2 N.—Pesar 3,84 g; disolver y completar a 100 con agua destilada.

Acido metafosfórico al 1 por 100 en solución acuosa.

Primeramente determinamos el pH por el electrómetro de Beckman en mezcla de volúmenes distintos de ambas soluciones tampón en la forma que sigue: Dispusimos en un matraz 60 c.c. de la solución de fosfato y sobre ella vertimos mediante bureta 50 c.c. de la solución cítrica, determinamos el pH y repetimos la medida después de cada adición de 5 c.c. de solución ácida.

60 c.c. de fosfato con	}	50 c.c. de cítrico tienen un pH de 5,0
		55 " " " " " " " " 4,8
		60 " " " " " " " " 4,6
		65 " " " " " " " " 4,5
		70 " " " " " " " " 4,3
		75 " " " " " " " " 4,0

El ácido cítrico se ha empleado como estabilizador de la vitamina C y por esta razón determinamos el volumen que admiten 10 c.c. de la solución de pH 4 sin que varíe este último más allá de los límites que permita la determinación colorimétrica.

10 c.c. de sol. tampón de pH 4 con	}	5 c.c. de solución cítrica pH 3,5
		10 c.c. de solución cítrica pH 3,0

A las dos horas de la determinación del pH hemos dispuesto 12 c.c. de la solución tampón de pH progresivo con un incremento de 0'5 unidades en cada una de las seis probetas y agregamos a cada una 1 c.c. de metafosfórico al 1 por 100. Adicionamos a continuación 10 c.c. de Tillmans en xileno, agitamos medio minuto y centrifugamos durante tres. Colorimetramos la solución de Tillmans en xileno.

Probeta	pH	Metafosfórico	Densidad [*] óptica por cien
I	2,5	1 c.c.	72,1
II	3,0	1 c.c.	72,2
III	3,5	1 c.c.	71,8
IV	4,0	1 c.c.	71,7
V	4,5	1 c.c.	72,5
VI	5,0	1 c.c.	73,1

(Los resultados obtenidos son promedio de dos determinaciones).

No existe diferencia alguna en la separación de los líquidos después de la centrifugación.

Los valores de las densidades ópticas indican que la colorimetría en el xileno puede realizarse aunque los líquidos con los que estuvo en contacto tengan un pH inferior a 4,5 y superior a 2,5. Nosotros hemos elegido para nuestro trabajo un margen de 3,5 a 4 de acuerdo con el utilizado en el material vegetal y en solución acuosa por algunos autores citados en otro lugar. A. Santos (4) considera como excesivo el pH de 2,5 para la valoración con D. F. I. en solución acuosa y Bessey (5) aconseja un pH de 3,5.

Una de las grandes ventajas del xileno es, por consiguiente, permitir que se realice la reacción de Tillmans-vitamina C en solución acuosa con un amplio margen de pH sin que influya en la determinación colorimétrica posterior del Tillmans-xileno.

La limitación del pH viene, de otra parte, establecida por los conocimientos siguientes: a) La existencia de sustancias reductoras del D. F. I. de acción lenta, que se invalida en medio ácido (1,6).— b) El ácido ascórbico disminuye su estabilidad y su velocidad de reacción con el D. F. I. al elevarse el pH.— c) El ácido ascórbico no resiste una concentración muy fuerte, especialmente si se trata de ácidos minerales y el colorante se debilita (pálidece) espontáneamente a un pH bajo.

No se ha citado en la bibliografía que las variaciones de pH originen modificación alguna en las relaciones estequiométricas entre Tillmans y vitamina C a diferencia de lo que sucede con el método del azul de metileno, que exige en el pH una precisión de 0,05 unidades por este motivo.

* * *

Conocidas las propiedades fundamentales de la solución de Tillmans en xileno se pasó a realizar unas pruebas preliminares de valoración de vitamina C.

Ensayos de valoración de la vitamina C con la solución patrón de Tillmans en xileno

Dos técnicas entrevemos para la posible utilización de la solución de Tillmans en xileno en la valoración, y para su mejor comprensión debemos anticipar que la valoración de un líquido problema con una solución acuosa titulada de Tillmans puede realizarse a un pH próximo a 3,5 y se habla

de valoración al rojo (la solución de Tillmans tiene color rojo a un pH inferior a 4,2) o bien a un pH vecino y superior a 5,2 y se habla de valoración al azul (porque a este pH y por encima de él tiene este color el reactivo).

Las soluciones acuosas de Tillmans presentan color morado en la zona intermedia de pH, que debe considerarse como *zona de viraje* de este *indicador*.

La valoración al azul no tiene aplicación general porque a ese pH se manifiesta en mayor grado la acción de las sustancias interferentes que suelen acompañar a la vitamina. Hoy la mayoría de los autores trabajan a un pH próximo a 3,5 en extractos de vegetales, como se aprecia en el cuadro siguiente :

Material	Autores	pH
Orina	F. Siebert	2,5 — 3
Orina	A. Jezler y Niederberger	2,7 — 3
Sangre	F. Taylor, D. Chase	4,7
Leche	B. Willberg	2,7
Vegetales	Morell	3,6
Vegetales	Hochberg, Melnick y Oser (7)	3,5
Vegetales	Pepkowitz	4,0
Vegetales	F. Siebert	2,5 — 3

TECNICA I

Agitación de la solución de Tillmans en xileno con una solución tamponada a un pH de 4 o algo inferior que contiene la vitamina y *contar como tiempo de contacto el tiempo de agitación*.

TECNICA II

Agitación de la solución de Tillmans en xileno con una solución ligeramente alcalina que arrastre en su mayor parte al Tillmans coloreándose de azul. Adicionar a esta solución alcalina una solución tampón para obtener un líquido rojo de un pH inferior a 4,2 (II-A) o un líquido azul de un pH próximo y superior a 5,2 (II-B). Agregar en ambos casos una porción alícuota de extracto acuoso problema que se irá al fondo poniéndose en contacto con el Tillmans acuoso (rojo o azul) al que *decolorará* parcialmente.

Terminado el tiempo de reacción deberá llevarse en la variante (II-B) a un pH inferior a 4 para que, mediante agitación, revierta en *ambos ensayos el Tillmans sobrante al xileno inicial*, pues sólo a este pH el coeficiente de reparto le es tan favorable al xileno que se consigue un arrastre total.

La variante II-B presenta los inconvenientes de la valoración al azul y la dificultad de limitar el tiempo de reacción porque requiere la adición de ácido y la agitación final a un mismo tiempo.

La variante II-A presenta las ventajas de la valoración al rojo y de reducir las manipulaciones. Es la única que admite comparación con la técnica I por la posibilidad de establecer identidad en los reactivos y en las cantidades manejadas de los mismos.

La técnica II se reduce para nuestro trabajo a la variante II-A.

Ensayos Preliminares

Ensayo con una solución tampón de pH 7.—Hemos ensayado la agitación de la solución de Tillmans en xileno con una solución tampón de pH 7 cuya composición insertamos más abajo, y comprobamos que la cantidad de Tillmans que pasa al agua es insuficiente para la cantidad de vitamina contenida en un volumen adecuado de solución patrón empleada.

Consideramos por esto de interés, el ensayo con soluciones alcalinas que arrastran en mayor proporción al Tillmans de la solución de este reactivo en xileno.

Soluciones tampón empleadas anteriormente:

Solución A: $\text{CO}_2\text{H}_2\text{N}$ 1/15 molar 9,018, $9,018/5 = 1,8156$ para 200 c.c.

Solución B: CO_2H Na_2 1/2 H_2O 1x15 molar 25,8877, $25,8877/5 = 4,174$ para conseguir un pH 7 se tomaron 39 c.c. de la A y 61 c.c. de la B.

Ensayo con solución de bicarbonato sódico.—Hemos preparado las soluciones siguientes:

Solución al 1 por 100 de bicarbonato sódico.

Solución al 1 por 100 de metatosiorico.

Solución de verde de bromocresol, cuyo viraje es de pH 5,4 con color azul a 5,8 con color amarillo; en la zona intermedia presenta un color verde.

Solución de ácido cítrico de concentración ajustada para que mezclada con un volumen igual de la de bicarbonato dé un líquido cuyo pH coincida con la zona de viraje del indicador.

Adicionamos a 10 c.c. de bicarbonato, 10 c.c. de ácido cítrico y una gota de indicador que da color verde a la solución.

A la par hemos preparado una solución de Tillmans en xileno cuya concentración es semejante a la de la solución acuosa empleada en el método de Leonard P. Pepkowitz, es decir con un contenido próximo a 12 miligramos para 200 c.c. de xileno.

Para hallar la proporción adecuada de solución alcalina que consiga un arrastre total realizamos la prueba siguiente: Disponemos en tres probetas de tapón esmerilado de 60 c.c. de cabida, volúmenes distintos de solución de bicarbonato sódico y volúmenes iguales de la solución de Tillmans en xileno (T-X), agitamos el conjunto 5 segundos y dejamos separar los líquidos con el resultado del siguiente cuadro:

Probeta	Bicarbonato	Sol. de Till. en xileno		color del xileno
I	5 c.c.	10 c.c.	Agitación	casi incoloro
II	5 c.c.	10 c.c.	Agitación	casi incoloro
III	10 c.c.	10 c.c.	Agitación	casi incoloro

A continuación se adiciona a cada probeta un volúmen de cítrico igual al empleado de bicarbonato, que determina alguna efervescencia espontánea. Los líquidos tienen un pH que corresponde a la zona de viraje del indicador. Agitamos en sentido vertical para que el Tillmans revierta al xileno, la efervescencia es mucha y para evitar pérdidas de líquido dejamos reposar dos minutos antes de abrir las probetas, aunque esto no sería inconveniente porque el líquido que se va a colorimetrar es ya homogéneo. El inconveniente mayor de esta técnica estriba en que la adición de cítrico determina una *efervescencia inicial que arrastra gran parte del Tillmans disponible en solución acuosa a la capa xilena*, reduciendo la cantidad máxima de vitamina valorable y con ello los márgenes de amplitud del método.

Para comprobar en estos ensayos en blanco si el CARBONICO tiene alguna acción sobre el colorante, centrifugamos y colorimetramos la capa xilena en el Spekker.

Probeta	D. O. x 100 en el Spekker
I	35,9
II	35,9
III	35,6

La constancia en la D. O. nos indica que el CO₂ no tiene acción perjudicial sobre el colorante. Deseamos, una vez terminada la presente Tesis Doctoral, ensayar de nuevo la solución de bicarbonato sódico, porque su empleo hace inerte la atmósfera de la probeta y esto es de especial interés en la valoración de preparados farmacéuticos en los que se asocia el hierro ferroso a la vitamina C, de los que existen varios en la industria farmacéutica nacional y extranjera. El hecho de que en la preparación de la solución N/1000 de D. F. I. con sal de Mohr no se requiera atmósfera inerte se debe a la estabilidad que le confiere el ácido sulfúrico y sobre todo al carácter especial de esta sal que ya sólida es poco alterable al aire (7).

* * *

El seguir en la práctica de los análisis de jugo cítrico el método de Pepkowitz nos hace concebir la experimentación con la solución de fosfato sódico en sustitución de la de bicarbonato sódico sin los inconvenientes de la efervescencia.

Ensayo con la solución de fosfato sódico.—Se han empleado las soluciones siguientes :

Solución de fosfato sódico 0.2 N. Pesamos 3.56 g. disolvemos en agua destilada y completamos a 100 cc.

Solución de ácido cítrico aproximadamente 0.7 N. Pesamos 4.7 g. disolvemos en agua destilada y completamos a 100 c.c.

Utilizamos una solución concentrada de cítrico con la finalidad de reducir el volumen necesario para que en mezcla con la de fosfato propor-

cione un líquido con un pH de 4 o inferior según el papel indicador "Universal" y de escala fraccionada de la Casa Merck.

Solución de Tillmans en xileno preparada anteriormente para el ensayo del bicarbonato sódico.

Disponemos en cada una de dos probetas 5 c.c. de la solución de fosfatos y 10 c.c. de la solución de Tillmans en xileno. Agitamos 5 segundos y la solución de fosfatos arrastra casi por entero al Tillmans contenido en el xileno, coloreándose de azul. Agregamos ácido cítrico en las cantidades de 2 y 1,5 c.c., la solución cítrica se va al fondo pero no se mezcla espontáneamente. Para conseguir su mezcla se imprime a las probetas un movimiento circular, manteniéndolas fijas por la parte superior.

La solución acuosa azul ha virado al rojo en la probeta I y al morado en la probeta II.

Agitamos las probetas en sentido vertical y el Tillmans revierte al xileno. Centrifugamos la totalidad del líquido de cada una de las probetas, colorimetrans la solución de Tillmans en xileno recuperada y determinamos con el papel indicador el pH de los líquidos acuosos residuales.

El cuadro hace esquemática, en lo posible, la marcha seguida.

Probeta	Fosfato	Till-xil	Cítrico	Color sol. acuosa	D.O. x 100 Till-xil	pH líquido acuoso
I	5 c.c.	10 c.c.	2 c.c.	rojo	35,3	4
II	5 c.c.	10 c.c.	1,5 c.c.	morado	35,7	4,4

Repetimos los ensayos en blanco en cuatro probetas con la diferencia de utilizar mayores cantidades de la solución de fosfato y mayor variedad en el volumen de cítrico.

Probeta	Fosfato	Till-xil	Cítrico	Color sol. acuosa	D.O. x 100 Till-xil	pH líquido acuoso
I	8 c.c.	10 c.c.	2 c.c.	morado	36,0	4,8
II	8 c.c.	10 c.c.	4 c.c.	rojo	35,8	3,8
III	8 c.c.	10 c.c.	2 c.c.	morado	35,7	4,8
IV	8 c.c.	10 c.c.	5 c.c.	rojo	35,7	3,6

De los ensayos en blanco anteriores podemos concluir que la modificación del volumen de solución tampón total (de 7,5 a 13 c.c.) y las variaciones de pH de 3,6 a 4,8 no afectan a los valores finales de densidades ópticas de la capa xilena.

Siguiendo exactamente la técnica mencionada y con los volúmenes fijados de 8 c.c. de solución de fosfato y 4 de la solución de cítrico, ensayamos una solución de ASCORBICO preparada por disolución de 4 miligramos de esta sustancia cristalizada en ácido metafosfórico al 1 por 100 y completando a 100 c.c.

Probeta	Fosfato	Cítrico	Ascórbico	D. O. x 100
I	8 c.c.	4 c.c.	1 c.c.	69,5
II	8 c.c.	4 c.c.	2 c.c.	60,5
III	8 c.c.	4 c.c.	3 c.c.	48,8
IV	8 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	36,5

La técnica proporciona valores de D. O. que guardan una relación lineal con las cantidades de vitamina C o lo que es igual con los volúmenes de la solución patrón utilizada.

Para ver la estabilidad que tiene la solución de ascórbico en metafosfórico al mezclarle con una de fosfato sódico, hemos repetido el ensayo de la probeta I pero adicionando el cítrico, después que el volumen de la solución vitamínica (1 c.c.), en el orden siguiente :

Probeta	Fosfato	Ascórbico	Cítrico	D. O. x 100
I	8 c.c.	1 c.c.	4 c.c.	70,4

Aunque la mezcla de fosfato y metafosfórico resulta alcalina, el ascórbico no ha sufrido porque la densidad óptica no se ha alterado sensiblemente.

Comparación de los resultados obtenidos por las técnicas I y II con los mismos reactivos, dilución y tiempo.

La agitación de dos líquidos, agua y xileno, no debe poner en contacto sus moléculas con la intimidad que tiene lugar cuando se trata de líquidos miscibles. Esta misma consideración parece válida para las sustancias disueltas en ellos en la experiencia presente. El Tillmans no se disuelve en el agua, o mejor dicho, no pasa al agua a un pH próximo a 4 y como característica del ascórbico se da su insolubilidad en el xileno (5).

En ambas TÉCNICAS se emplean las mismas soluciones también con la diferencia de que en la TÉCNICA I se mide la mezcla ya formada y en la TÉCNICA II disponemos primeramente el volumen de fosfato y más

tarde el correspondiente de cítrico para que la unión de ambas proporcione el volumen y pH manejados en la TECNICA I.

Soluciones en uso :

Solución de fosfato 0,2 N. 3,56 g, disueltos y llevados a 100 c.c. con agua destilada.

Solución de ácido cítrico. Pesamos 2,7 g. que son disueltos y llevados a 100 c.c. con agua destilada.

Solución de ácido ascórbico. Pesamos 4 mg. que disolvemos y completamos con ácido metafosfórico al 1 por 100 a 100 c.c.

Solución concentrada de Tillmans en xileno.

TECNICA I

En cada una de las probetas de 30 c.c. de tapón esmerilado y en el orden que se mencionan, se miden : 8 c.c. de mezcla tampón (pH4), 10 c.c. de solución de Tillmans en xileno y 1 c.c. de la solución de ascórbico. Damos a las probetas un movimiento circular para que la vitamina se diluya en la mezcla tampón y a continuación agitamos vivamente los líquidos en sentido vertical durante exactamente treinta segundos. Centrifugamos el contenido de cada probeta y colorimetramos la capa de xileno.

Probeta	Tampón	Till-xil	Ascórbico	Contacto	D O. x 100
I	8 c.c.	10 c.c.	1 c.c.	30 seg.	61,2
II	8 c.c.	10 c.c.	1 c.c.	30 seg.	60,0

En el ensayo precedente la solución vitamínica CONTACTA CON EL TILLMANS disuelto en el xileno por EL TIEMPO que dura la agitación; en el que sigue la vitamina REACCIONA EN SOLUCION ACUOSA. con el mismo pH y dilución. EL TIEMPO DE REACCION LO INTERRUMPE LA AGITACION :

En dos probetas gemelas, con las anteriores, medimos 3,6 c.c. de fosfato y 10 c.c. de la solución de Tillmans en xileno. Agitamos unos segundos y el Tillmans pasa a la fase acuosa coloreándola de azul; añadimos el cítrico correspondiente al ensayo anterior (4 c.c.) y el líquido vira al rojo por el cambio de pH, ayudando a que todo el líquido acuoso sea homogéneo con un movimiento circular de las probetas mantenidas fijas por la parte superior. Una vez conseguido se agrega 1 c.c. de ascórbico, contando desde este momento 30 segundos; transcurridos éstos. se agitan los líquidos en sentido vertical unos segundos. Centrifugamos y colorimetramos la capa de xileno.

Pbta.	Fosfato	Till-xil	Cítrico	Asbico.	Tiempo	D.O. x 100
I	3,6 c.c.	10 c.c.	4,4	1 c.c.	30 seg.	56,2
II	3,6 c.c.	10 c.c.	4,4	1 c.c.	30 seg.	56,7

LOS VALORES OBTENIDOS AHORA SON CASI IDENTICOS Y MENORES QUE LOS ANTERIORES porque la vitamina reacciona por entero.

El tiempo y el pH son fundamentales en la valoración de la vitamina C. La determinación de cantidades pequeñas de vitamina obliga a mantener el tiempo límite de reacción de 15 segundos que algunos autores amplían a 30 segundos (8,9). Con la finalidad de confirmar la disparidad de resultados obtenidos con anterioridad por ambas TECNICAS y la interpretación dada por nosotros de que es atribuible a que la TECNICA DE CONTACTO POR AGITACION deja sin valorar parte de la vitamina, hemos repetido la experiencia llevando el tiempo de AGITACION a un minuto así como el de REACCION en los ensayos paralelos por la TECNICA II.

Técnica	Probeta	Tiempo	D. O. x 100
I	I	15 segundos	45,5
	II	15 segundos	44,1
	III	60 segundos	38,5
	IV	60 segundos	38,3
II	V	15 segundos	37,5
	VI	15 segundos	37,8
	VII	60 segundos	37,6
	VIII	60 segundos	38,0

Los resultados conseguidos por la TECNICA I con un tiempo de 15 segundos difieren ligeramente entre sí y grandemente de los correspondientes a la TECNICA II. Los resultados de ésta son todos concordantes, aunque difiere el tiempo como corresponde a una buena técnica y nos muestra que con el pH 3,7 que tienen los líquidos tampón, la vitamina reacciona por entero en 15 segundos.

La TECNICA I deja sin valorar parte de la vitamina en el tiempo límite establecido de 15 segundos de agitación violenta, como lo comprueba el hecho de que se aproximen sus resultados a los de la TECNICA II si se amplía el tiempo de agitación a un minuto. Debemos descartar de nuestro trabajo la TECNICA I POR INEXACTA.

* * *

EL TILLMANS NO SE ALTERA MANTENIDO UN MINUTO EN LA SOLUCION DE FOSFATO NI POR IGUAL TIEMPO EN LA MEZCLA TAMPON QUE RESULTA DE LA ADICION DE LA SOLUCION DE CITRICO.

Las diferencias apreciadas por los valores obtenidos por las TÉCNICAS I y II no son debidas a la alteración del Tillmans en la solución alcalina ni en la ácida tampón, como se comprueba en la siguiente experiencia:

Probetas I y II.—Disponemos los mismos reactivos que en un ensayo en blanco hecho por la TÉCNICA I; un tiempo de agitación de 15 segundos. Centrifugamos y colorimetramos el Tillman-xileno.

D. O. media = 52,3

Probetas III y IV.—Disponemos el volumen de fosfato, agregamos el correspondiente de la solución Tillmans-xileno, agitamos cinco segundos y el Tillmans pasa del xileno al agua, coloreándola de azul, dejamos estar un minuto, agregamos la solución correspondiente de cítrico, agitamos los líquidos dando a las probetas un giro circular y desde este momento contamos un minuto, transcurrido el cual, agitamos unos segundos en sentido vertical para que revierta al xileno el Tillmans rojo de la solución ácida tampón. Centrifugamos y colorimetramos el Tillmans-xileno recuperado.

D. O. media = 52,0

La coincidencia de ambos valores nos permite afirmar que sin premura puede adicionarse el cítrico o la vitamina en la TÉCNICA II y que las diferencias halladas entre ambas TÉCNICAS son imputables, como otras experiencias lo confirman, a que la agitación no es medio adecuado para poner en contacto las moléculas de un soluto (vitamina C) con las otras (Tillmans) cuyo solvente es inmiscible con el primero y cuando el tiempo de contacto viene limitado a un valor tan reducido como 15 segundos.

Ascórbico y soluciones tampón

No juzgamos necesario el ensayo de la estabilidad del ácido ascórbico en las soluciones tampón empleadas que son las de fosfato sódico y ácido cítrico de Mc Illvain (10,3) modificada en su concentración la solución ácida. Las soluciones de Mc Illvain han sido ensayadas para comprobar la estabilidad que presentan al ascórbico a diferentes pH por K.K. Rohatgi y P.K. Sayal (11) por procedimiento espectrofotométrico.

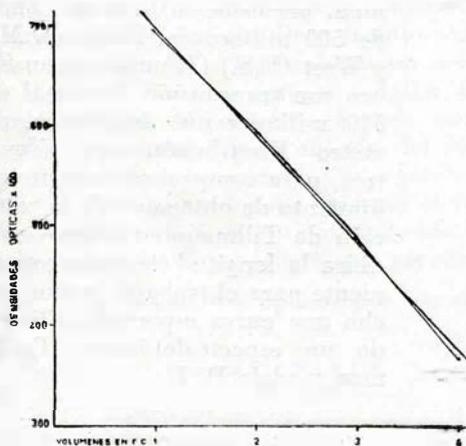
Han encontrado máxima estabilidad entre 3 a 5,6 que incluye el pH manejado por nosotros, así como al pH natural de la mayor parte de los zumos de frutas (12).

Soluciones tampón de Mc Illvain		Soluciones propuestas
Cítrico	31,01 g por litro	94,5 g por litro
Fosfato sódico	35,0 g por litro	35,6 g por litro

Variaciones del pH de la mezcla tampón por volúmenes crecientes de la solución de ascórbico en metafosfórico al 1 por 100.

Por procedimiento electrométrico se han determinado las variaciones de pH en la mezcla tampón utilizada en la obtención de la gráfica núm. 1;

para ello hemos utilizado el doble de los volúmenes empleados en una de las probetas, es decir 16 de fosfato y 4 de cítrico que dan un pH de 3,96, pero los resultados que se mencionan van referidos a los volúmenes de la gráfica.



Gráfica núm. 1

Volúmenes de la solución de ascórbico	pH
1 c.c.	3,82
2 c.c.	3,79
4 c.c.	3,75
6 c.c.	3,70
8 c.c.	3,64
10 c.c.	3,57
12 c.c.	3,52

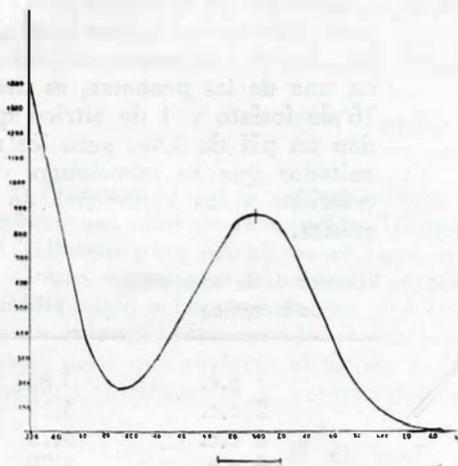
Las cifras de pH de la solución tampón varían en la obtención de la curva patrón entre los límites de 3,82 y 3,57. Mayor estabilidad tiene aún el pH en la solución tampón utilizada en la curva patrón última por ser mayor el volumen empleado.

* * *

LA REACCION TILLMANS-VITAMINA C SE REALIZA EN 15 SEGUNDOS EN LOS EXTRACTOS DE NARANJA POR LA TECNICA II.

Anteriormente hemos mostrado el tiempo necesario para la reacción Tillmans-vitamina C en soluciones puras y se vio que la vitamina reacciona en 15 segundos; para comprobar si esto sucede también en los zumos, se han realizado ensayos con tiempo de reacción distintos en el extracto obtenido de la naranja. Existe constancia en los valores de las densidades ópticas para tiempos comprendidos entre 10 y 25 segundos.

Tiempo:	D. O. x 100
10 segundos	43,5
15 segundos	44,2
20 segundos	43,6
25 segundos	44,3

CURVA ESPECTRAL DE XILENO-
-TILLMAN FRENTE A XILENO*Curva espectral de la solución
Tillmans-xileno*

Gráfica num. 2

De su resultado, llevado a la gráfica 2, se deduce que debe utilizarse una longitud de onda de 500 milimicrones como se indica en el método de Pepkowitz.

En las experiencias nuestras empleamos un fotocolorímetro Spekker de la Casa Hilger y utilizamos el filtro que comprende este máximo de absorción.

* * *

Deducidas por las experiencias preliminares citadas las condiciones de trabajo para la valoración de la vitamina C con la solución Tillmans-xileno, era necesario comprobar que dicha solución cumple la ley de Beer, requisito indispensable para poderla utilizar en determinaciones colorimétricas. Para ello se realizaron las experiencias que a continuación se reseñan, aplicando la que hemos denominado Técnica II por más adecuada.

Ley de Beer

Las soluciones empleadas tienen las concentraciones siguientes:

Solución de fosfato sólico 0,2 N. Pesar 3,56 g; disolver y completar con agua destilada a 100 c.c.

Solución concentrada de cítrico. Pesar 5,56 g; disolver en agua y completar 100 c.c.

Solución de Tillmans en xileno de D. O. \times 100 próxima a 50.

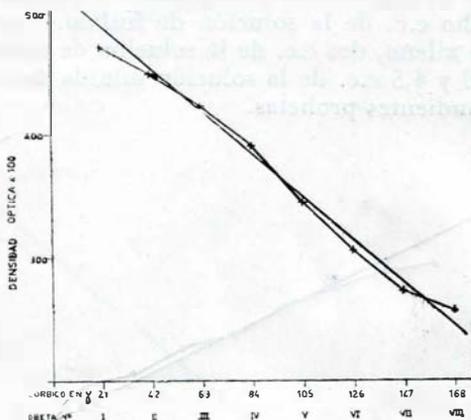
Solución de ácido ascórbico preparada disolviendo 7 miligramos en ácido metafosfórico al 1 por 100 y completando a 100 c.c.

Obtención de la curva patrón.—En ocho probetas de tapón esmerilado de 30 c.c. de cabida, disponemos: 8 c.c. de la solución de fosfato; añadimos, con pipeta de doble aforo, 10 c.c. de la solución Tillmans-xileno (preparada por dilución de una concentrada utilizada en experiencias anteriores), agitamos 5 segundos. A las soluciones acuosas azules de Tillmans conseguidas se les adicionaron, mediante bureta, dos c.c. de solución concentrada de cítrico que lleva la solución a un pH de 4; se agitan los líquidos, imprimiendo a las probetas un movimiento circular sosteniéndolas por la parte superior y se agregan 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,1 y 2,4 c.c. de solución patrón de ascórbico a cada una de las correspondientes probetas. Desde el momento de la adición del ascórbico se agita en la forma indicada más arriba y se cuentan 30 segundos; pasados éstos se agita en sentido vertical unos segundos. Se trasvasa el contenido de cada probeta a un tubo de centrifuga de 50 c.c. Centrifugamos a 4.000 r. p. m. 4 minutos y colorimetramos la capa de xileno que arrastra el Tillmans sobrante.

Las densidades ópticas por ciento son :

Probeta	Densidad óptica x 100
I	47,4
II	45,2
III	42,5
IV	39,2
V	34,6
VI	30,7
VII	27,5
VIII	25,8

La gráfica núm. 3 que los representa, muestra que los dos primeros valores se separan de la línea ideal. La probeta número 8 que contiene 2,4 c.c. de la solución de ascórbico, no queda con *color rojo* después de la reacción con la vitamina, indicándonos que el Tillmans que pasó al agua fue insuficiente.



Gráfica núm. 3

* * *

Conviene incrementar la cantidad de Tillmans que pasa a la fase acuosa para disponer del necesario en la reacción con el ascórbico contenido en la probeta núm. 8. Esto puede conseguirse: a) Por aumento del volumen de la solución de Tillmans en xileno empleado en cada probeta. b) Por aumento de la concentración del Tillmans en el xileno. c) Ayudando

a un arrastre más completo del Tillmans disuelto en el xileno por un incremento en el volumen de la solución alcalina de fosfato.

En las determinaciones que siguen, aparte de otras modificaciones sin importancia, se utilizan 20 c.c. de la solución Tillmans-xileno.

Técnica II.—Empleo de 20 c.c. de Tillmans-xileno

Soluciones empleadas :

Solución madre de ascórbico. Pesar 0,1 g; disolver y llevar a 250 c.c. con ácido metafosfórico al 1 por 100.

Solución diluída, 15 c.c. de la anterior, se llevan a 150 c.c. con metafosfórico al 1 por 100.

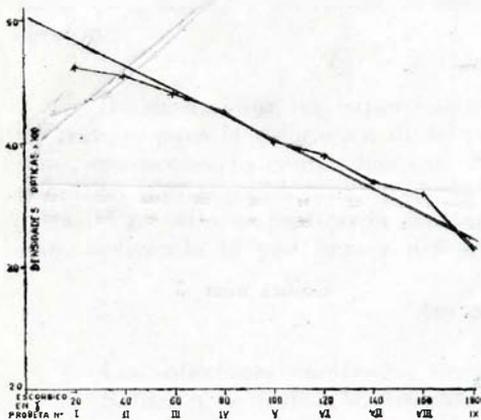
Solución de fosfato 0,2 N. Pesar 3,56 g; disolver y llevar a 100 c.c. con agua destilada.

Solución de cítrico, 7,56 g; disolver y llevar a 100 c.c. con agua destilada-

Solución de Tillmans en concentración aproximada a la utilizada con anterioridad, con una D.O. x 100 (sin tratamiento por reactivos) de 50,5.

Obtención de la curva patrón.—Con la técnica mencionada se hacen las determinaciones empleando 9 probetas de 30 c.c. en las que disponemos ocho c.c. de la solución de fosfato, veinte c.c. de la solución de Tillmans en xileno, dos c.c. de la solución de cítrico y 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 4,5 c.c. de la solución diluída de ascórbico en cada una de las correspondientes probetas.

La colorimetría nos da los valores siguientes :



Probeta	Densidad óptica x 100
I	46,2
II	45,5
III	44,0
IV	42,5
V	40,7
VI	39,0
VII	36,8
VIII	35,8
IX	31,4

Gráfica num. 4

Los resultados se llevan a la gráfica num. 4. A la vista de ella se deduce que el empleo de veinte c.c. de la solución de Tillmans-xileno resta mucha sensibi-

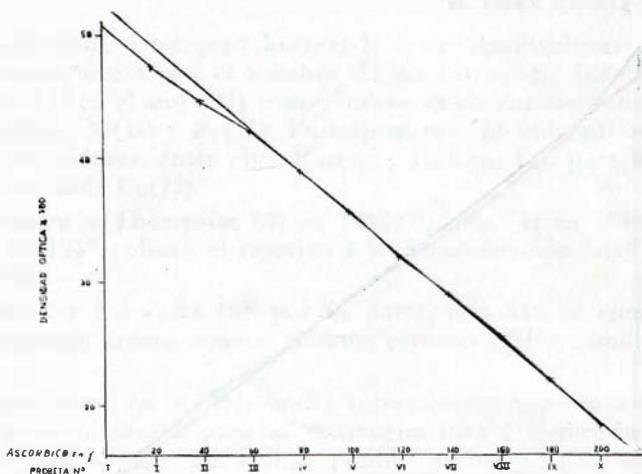
lidad al método, razón por la que en la experiencia siguiente volvemos a emplear diez c.c. y modificamos el volumen de fosfato y la concentración de cítrico.

Técnica II.—Efecto del ácido metafosfórico. Cumplimiento de la ley de Beer.

Con la técnica mencionada y los volúmenes y soluciones que se especifican, 10 centímetros cúbicos de solución 0,2 N de fosfato sódico; 2 c.c. de solución de cítrico preparada disolviendo 9,45 gramos en agua y completando a 100 c.c.; 10 c.c. de Tillmans en xileno con una D. O. \times 100 inicial de 50,5 sin tratamiento por los reactivos.

Obtenemos los resultados siguientes :

Probeta	Densidad óptica \times 100
I	47,3
II	44,5
III	42,1
IV	38,9
V	35,6
VI	32,0
VII	28,9
VIII	25,6
IX	22,0
X	18,4
Testigo	50,6



Gráfica núm. 5

representados en la gráfica núm. 5, casi ideal. Como se desprende de la misma, comparativamente con la anterior, es necesario que el ensayo en blanco lleve también metafosfórico al igual que los restantes en que se utiliza la *solución de vitamina C en este ácido*.

El comportamiento del ácido metafosfórico en estas experiencias es distinto al de otros ácidos en experiencias semejantes. H. Highest y E. West (12) notan que el ácido CIH 0,03 N empleado por ellos como disolven-

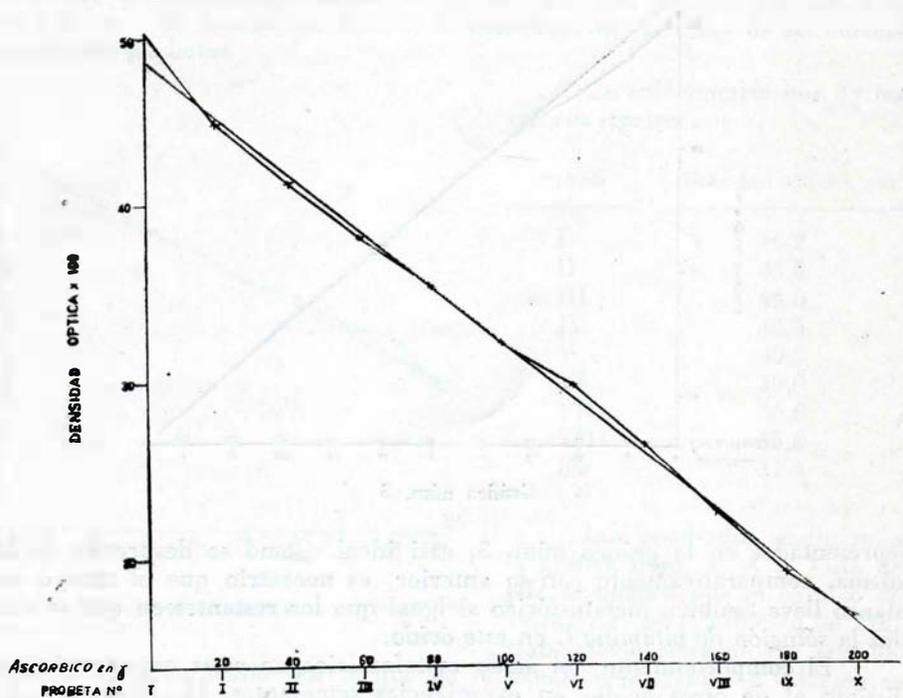
te debilita al Diclorofenol-indofenol así como otros ácidos contenidos en las muestras. Ya apuntamos al hablar del pH que el colorante palidece espontáneamente en medio de un pH bajo.

Las observaciones precedentes se han tenido en cuenta en la obtención de la gráfica núm. 6, añadiendo también ácido metafosfórico al 1 por 100 a la probeta I, que contiene tan sólo 0,5 c.c. de la solución de vitamina en este ácido.

El cuadro inserto a continuación aclara lo precedente :

Probeta	Fosfato	Cítrico	Metafosfato	Sol. vim. C	D O. x 100
I	10 c.c.	2 c.c.	0,5	0,5	44,7
II	10 c.c.	2 c.c.	—	1,0	41,3
III	10 c.c.	2 c.c.	—	1,5	38,5
IV	10 c.c.	2 c.c.	—	2,0	35,5
V	10 c.c.	2 c.c.	—	2,5	32,4
VI	10 c.c.	2 c.c.	—	3,0	29,8
VII	10 c.c.	2 c.c.	—	3,5	26,5
VIII	10 c.c.	2 c.c.	—	4,0	22,7
IX	10 c.c.	2 c.c.	—	4,5	19,2
X	10 c.c.	2 c.c.	—	5,0	15,7
T	10 c.c.	2 c.c.	1 c.c.	—	49,7

Véase gráfica núm. 6.



Gráfica núm. 6