

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TOMO IV - Núm. 1

Enero - Febrero, 1963

Director: PROF. DR. JESUS CABO TORRES
Subdirectores: PROF. DR. JOSE M.^a SUÑÉ ARBUSSA
Redacción y Administración: FACULTAD DE FARMACIA - GRANADA (ESPAÑA)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD

PROF. DR. EMILIO MUÑOZ FERNANDEZ

VICE-RECTOR

PROF. DR. J. M.^a CLAVERA ARMENTEROS

FACULTAD DE FARMACIA

TITULARES

Prof. Dr. J. Dorronsoro Velilla. Decano, Química inorgánica, analítica y aplicada.

» » *J. Cabo Torres,* Farmacognosia I y II.

» » *V. Callao Fabregat.* Microbiología I y II.

» » *J. M.^a Clavera Armenteros.* Técnica Física y Físicoquímica.
(Encargado de Historia).

» » *D. Guevara Pozo.* Parasitología.

» » *J. M.^a Muñoz Medina.* Botánica I y II.

» » *L. Recalde Martínez.* Fisiología Vegetal.

» » *J. Saenz de Buruaga y Sánchez.* Química Orgánica I y II.

» » *J. M.^a Suñé Arbussá.* Farmacia Galénica y Técnica Profesional y Legislación.

» » *G. Varela Mosquera.* Fisiología Animal.

ENCARGADOS

Dr. M. Monteoliva Hernández. Bioquímica I y II.

Dr. R. García Villanova. Análisis Químico.

Dr. J. L. Alías Pérez. Mineralogía y Geología.

Dr. F. del Corral, Bromatología.

PROFESORES ADJUNTOS

Dr. M. Abumada, Dr. J. L. Alías, Dr. F. del Corral, Dr. E. Esteban, Dr. R. García Villanova, Dr. J. L. Guardiola, Dr. F. Mascaró, Dr. M. Monteoliva, Dr. A. Serrano, Dr. J. Thomas, Dr. J. Vigaray.

*La responsabilidad de los conceptos
expuestos en los trabajos no incumbe a
la Redacción de la Revista sino a sus
respectivos Autores.*

Dep. Legal Gr. núm. 17 - 1960

Imprenta José M.^a Ventura Hita - Mesones, 23 - Granada

Ars. Pharm. IV, (n.º 1), 1963

**Nuevo método de valoración de ácido ascórbico
en vegetales frescos (continuación)**

F. del Corral

Método propuesto

Los resultados obtenidos en las pruebas indicadas nos llevan a establecer las condiciones para el empleo de la solución de Tillmans-xileno en la valoración de la vitamina C.

Método nuevo de valoración de vitamina C en materia vegetal

FUNDAMENTO DEL NUEVO MÉTODO.

Utilización del reactivo de *Tillmans* disuelto en xileno, de cuyo disolvente es arrastrado por una solución alcalina de fosfato, se adiciona cítrico para formar una mezcla acuosa tampón y por último la porción alícuota de extracto de vitamina. Transcurrido el tiempo de reacción de 15 segundos sólo hay necesidad de agitar unos segundos para que el *Tillmans* sobrante revierta al xileno. La pérdida en el valor inicial de densidad óptica de la solución de *Tillmans* en xileno, apreciada en una curva patrón permite calcular el contenido en ascórbico.

REACTIVOS.

Solución reciente y filtrada de fosfato sódico.

Pesar 3,56 gramos, disolver en agua destilada y completar a 100 c. c.

Solución reciente y filtrada de ácido cítrico.

Pesar 9,45 gramos de ácido, disolver en agua destilada y completar a 100 c. c.

Emplear en las soluciones anteriores agua destilada caliente que hace rápida su preparación.

Solución de ácido metafosfórico al 1 por ciento.

Solución que debe prepararse en agua recién destilada. Forma sedimento al cabo de unos días (8-15) a la temperatura del laboratorio. Este sedimento no altera la cualidad estabilizadora de sus soluciones de vitamina al menos por 4 ó 5 días para la solución pura ni durante el escaso tiempo de mantenimiento necesario para la valoración en el caso de los extractos problemas. Filtrase la solución si se forma sedimento.

Puede evitarse su formación utilizando una solución madre de metafosfórico al 10 % que se conserva inalterada mucho tiempo y preparar para el uso una dilución al 1 + 9 en volumen en agua destilada.

Método de preparación de la solución de Tillmans en xileno de D. O. x 100=50—55.

La mejor forma de preparación ensayada es: Ayudar a la solubilidad de la sal sódica del diclorofenol-indofenol en agua, con bicarbonato sódico en la dosis de unos miligramos para unos 200 c. c. de disolvente y con calor al baño de maría, filtrar, acidular el filtrado con metafosfórico al 1% y arrastrar en ampolla de separación con xileno. Dejar en decantación unos minutos, separar los líquidos acuosos, filtrar la solución de Tillmans en xileno por filtro sin pliegues. Los líquidos filtrados procedentes de extracciones sucesivas deben permanecer tapados en un frasco de vidrio incoloro por espacio de 48 horas; por este procedimiento pierden el agua de arrastre que queda adherida a la pared del vidrio empañando su transparencia.

Filtrar de nuevo por filtro sin pliegues y mantener la solución en frasco de vidrio incoloro. La separación del agua, mencionada anteriormente, se facilita disponiendo tapado el frasco o matraz que contiene

los líquidos xilenos procedentes de la primera filtración, sobre trozos de hielo que alcanzan al mismo nivel que el líquido del interior.

Ultimamente hemos conseguido una preparación ventajosa de la solución de Tillmans en xileno tratando la solución acuosa filtrada de Tillmans por corriente de CO_2 y arrastrando por xileno en ampolla de separación.

Agitando finalmente la solución obtenida con ácido metafosfórico al 1% y siguiendo la marcha reseñada anteriormente para privarle del agua. Experiencias anteriores nos aseguran que el CO_2 no tiene acción perjudicial sobre el Tillmans.

El método de valoración de la vitamina C de Folkmann, inserto en otro lugar, utiliza el sulfato sódico para privar del agua al xileno que lleva disuelto el Tillmans sobrante de su reacción con el líquido problema. Nosotros no vemos ventaja al empleo de dicha sustancia en este caso.

Para preparación rápida de cantidades pequeñas de solución de Tillmans-xileno, deben centrifugarse los líquidos xilenos después de la primera filtración, en tubos de 50 c. c. y decantar sobre un filtro sin pliegues el líquido que sobrenada a las gotículas que se separan.

Lavar el xileno reactivo con metafosfórico al 1% en ampolla de separación y seguir las indicaciones hechas anteriormente para la solución Tillmans-xileno, privándole de las gotículas acuosas bien por reposo o centrifugación.

Diluir con él la solución Tillmans-xileno, hasta conseguir la densidad óptica requerida. En determinaciones seriadas de un mismo material puede hacerse más diluida, utilizando la concentración adecuada a las variaciones de contenido existentes en un mismo filtrado de las muestras.

Solución patrón de ácido ascórbico.

Disuélvanse 0,1 gramos de ácido ascórbico en ácido metafosfórico al 1% y complétense a 250 c. c. en matraz aforado. Tomar 15 c. c. y diluir con la solución de metafosfórico hasta 150 c. c. en matraz aforado.

El agua destilada debe ser obtenida sobre vidrio y el material requiere una limpieza escrupulosa.

Determinación de la vitamina C en el extracto.

Disponer en una probeta de tapón esmerilado de 30 c. c. de cabida, 10 c. c. de la solución de fosfato sódico, añadir 10 c. c. de la solución de Tillmans-xileno medidos con pipeta de doble aforo o mejor con bureta que aprecie bien las décimas de centímetro cúbico. Agitar de forma que se mezclen ambos líquidos durante cinco segundos, con lo que conseguimos que la capa acuosa de fosfato arrastre, coloreándose de azul, la totalidad del Tillmans disuelto en la solución de Tillmans-xileno.

Agregar, dejando resbalar por la pared, dos c. c. de la solución filtrada de ácido cítrico. La solución cítrica, como ácida, hace virar al rojo el Tillmans que se pone en su contacto, pero espontáneamente no se mezclan las soluciones acuosas.

Muévanse los líquidos imprimiendo a la probeta un giro circular sosteniéndola fija por la parte superior. De este modo las fases acuosa y xilenosa permanecen separadas y el Tillmans rojo, por ser el pH 4 o inferior y próximo a él, no pasa al xileno.

Adicionar, resbalando por la pared, de 1 a 5 c. c. de filtrado del extracto problema que por tener menor densidad que la mezcla tampón, queda en la parte superior de la parte acuosa e inmediatamente debajo de la capa xilenosa.

Muévanse los líquidos como anteriormente y desde este mismo momento, cuéntense quince segundos. Transcurridos éstos, agitar cinco segundos en sentido vertical (como se hizo en la primera agitación) con lo que el Tillmans sobrante de su reacción con el líquido problema en el medio acuoso, pasa al xileno. Ambas fases se separan bien por centrifugación para lo cual se trasvasa el contenido total de la probeta en un tubo de 50 centímetros cúbicos de la centrífuga donde se mantendrá por tres minutos a 4-5000 r. p. m.

Decantar el líquido rojo que sobrenada al tubo del colorímetro o a la cubeta del Spekker de un centímetro de espesor, colorimetrar utilizando como «blanco» xileno lavado con los reactivos y privado también del agua por centrifugación subsiguiente, si bien el resultado será el mismo que el obtenido con xileno lavado con solo metafosfórico al 1%, del que disponemos como reactivo, y privado por centrifugación de los indicios de agua. Utilizar una onda de 500 milímicrones o filtro azul.

Si la cantidad de filtrado de extracto es inferior a 2 c. c. conviene

suplementarla hasta este volumen con solución de ácido metafosfórico al 1 %, suplemento que deberá añadirse antes que el extracto problema.

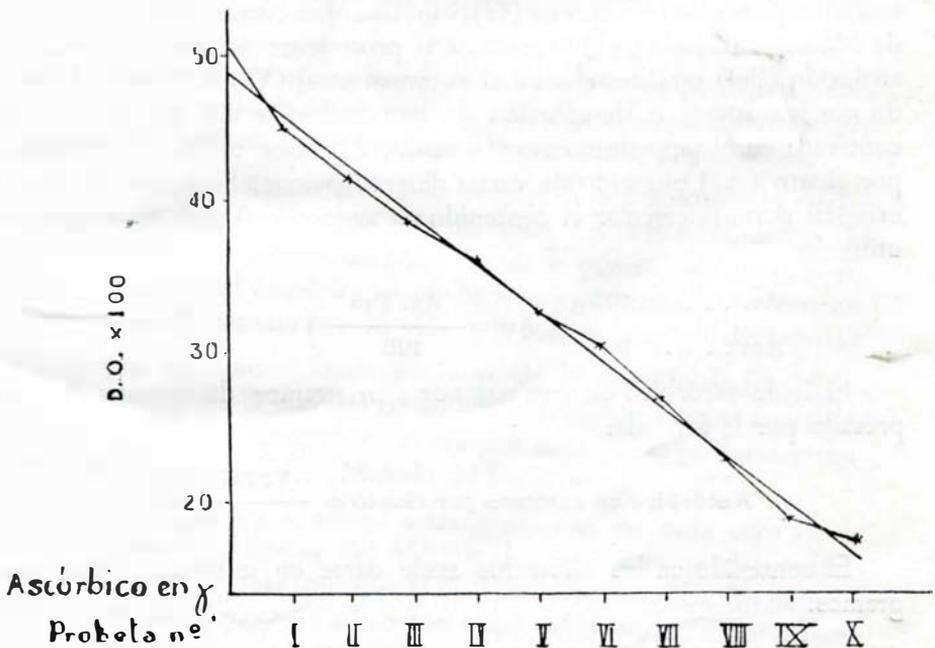
Si el filtrato tiene color, agítense unos centímetros cúbicos con xileno puro y compruébese si los pigmentos son solubles en el mismo. En caso positivo, «hágase un ensayo en blanco» con solo xileno y ajústese el colorímetro a 100 de transmisión con el mismo. Hállese comparativamente el valor colorimétrico de la solución residual de Tillmans en xileno de la muestra problema.

Cuando en los colorímetros ordinarios se pretende apreciar fracciones en la escala de densidades ópticas de las divisiones más pequeñas de la misma, es aconsejable, para más exactitud, hacer la lectura en la escala de transmisiones y conversión posterior de estos valores en densidades ópticas por la relación

$$D. O. = \log. \frac{100}{T}, \text{ siendo } T \text{ la transmisión.}$$

Obtención de la curva patrón.

Disponer en 10 probetas de tapón esmerilado las cantidades reseñadas de reactivos en la determinación del contenido en el filtrado del ex-



tracto problema, utilizando en lugar de este, las cantidades de 0'5, 1'0, 1'5, 2'0, 2'5, 3'0, 3'5, 4'0, 4'5 y 5'0 centímetros cúbicos en cada probeta de solución patrón de vitamina C. Cada determinación debe hacerse por separado suplementando en las primeras probetas el volumen de solución vitamínica con solución de ácido metafosfórico al 1%, para hacer un total de 2,0 c. c. añadiendo el suplemento antes que el volumen de solución patrón. Emplear en el testigo 2 c. c. de ácido metafosfórico al 1%.

Llevar los valores de D. O. x 100 y contenido en gammas de la porción alícuota de solución patrón de vitamina a unos ejes de coordenadas y constrúyase la gráfica o sobre ejes convenientes un ábaco o monograma.

Puede obtenerse la curva patrón empleando volúmenes iguales de soluciones de vitamina de concentración adecuada en cada probeta; de esta forma son iguales los volúmenes de reactivos empleados en todas ellas es decir, en lugar de volúmenes crecientes de una misma solución patrón, emplear volúmenes iguales de solución de concentración creciente.

• Cálculos.

Búsqúese en la curva patrón el valor de D. O. hallado y la equivalencia en gammas de vitamina (G), cantidad que corresponde al volumen de filtrado ensayado (Vf). La vitamina procedente del peso de muestra analizado (Pm) está disuelta en el volumen total (Vt) del líquido formado por los 200 c. c. de solución de metafosfórico más el agua (Am) contenida en el peso de muestra tomado. El valor medio de humedad por ciento (Ac) obtenido de varias determinaciones hechas en el mismo material permite calcular el contenido en agua (Am) del peso muestra utilizado.

$$\begin{array}{l} \text{Ac. } 100 \text{ g} \\ \text{Am } \text{Pm} \end{array} \quad \text{Am} = \frac{\text{Ac. Pm}}{100} \quad \text{Vt} = 200 + \text{Am}$$

El ácido ascórbico en gammas por cien gramos de muestra es expresado por la fórmula:

$$\text{Ascórbico en gammas por ciento} = \frac{\text{Vt} \cdot \text{G} \cdot 100}{\text{Vf} \cdot \text{Pm}}$$

El contenido en los alimentos suele darse en miligramos por cien gramos.

VENTAJAS DEL NUEVO MÉTODO

Las tres pruebas requeridas por los filtrados turbios o coloreados según el método de Bessey o el método de Loeffler y Ponting son reducidos a una sola en los métodos que emplean el xileno.

El método de Pepkowitz significa una aportación por la rapidez del procedimiento y la adecuación a los análisis en serie. La inestabilidad de la solución de Tillmans es su principal inconveniente.

Anteriormente, Hight (13) en su tesis trata de obtener una solución estable de Tillmans en xileno. Para ello acidifica la solución acuosa de Tillmans con ClH 0,03 N y arrastra con xileno. La solución obtenida la lava por *agitación repetida* con solución 0,03 N de ClH ($\text{pH} = 1,5!!$) que *débilita su color pero previene la decoloración que provoca el ácido contenido en la muestra*. La solución, según el autor, permanece estable si se evita la *prolongada exposición a la luz*. Como sustancia problema cita los zumos de frutas (fresa, limón, naranja, etc.) y no menciona procedimiento alguno para la obtención de los extractos.

Su método, que en manos de Pepkowitz dio valores discordantes con el de Stotz, consiste en utilizar de 1 a 3 c. c. de la solución acuosa problema (?) que son mezclados y completados a 15 c. c. con la solución clorhídrica y agitados 15 segundos con 10 c. c. de la solución de Tillmans en xileno.

La valoración exige unos límites de ascórbico en la porción alícuota de 0,01 a 0,06 mg., es decir, aproximadamente la mitad del margen conseguido por la técnica propuesta por Pepkowitz o por nosotros.

La solución de Tillmans en xileno preparada por nosotros es estable y su tensión de vapor es inferior a la del agua. En la determinación del ascórbico la capa de xileno mantiene aislada la porción alícuota del filtrado, del oxígeno del ambiente, como se aconsejaba para mantenimiento de los extractos de plantas por M. Ott (1) con el empleo de bencina.

El margen de contenido de vitamina de la porción de filtrado es más amplio que el de la mayoría de las técnicas colorimétricas realizadas en solución acuosa y equiparable al margen conseguido en las determinaciones realizadas en xileno (Método de Pepkowitz).

Las medidas exactas de xileno y las necesarias en cada caso de la solución acuosa de Tillmans del Método de Pepkowitz quedan reducidas a la medida de una sola solución, la de Tillmans-xileno. La fijación del tiempo es *cómoda y rigurosa al no tener que adicionar reactivo alguno*

después de la medida del extracto y permanecer incambiado el Tillmans sobrante una vez arrastrado por el xileno.

El empleo de un volumen y concentración suficientes de las soluciones tampón, garantiza un pH comprendido entre 3,5 y 4, considerado como ventajoso para la mayor especificidad de la reacción Tillmans-vitamina C y adecuado a la colorimetría, *sin necesidad de neutralizar con solución de NaOH 0,8 N la porción alícuota de extracto* (Método de Pepkowitz).

Confiamos en que su técnica se aplique a otros métodos que utilizan el reactivo de Tillmans: Bien los que emplean soluciones tampón, arrastrando el reactivo con la fracción alcalina o los que utilizan un defecado especial, adaptando la solución tampón a la composición del mismo.

Entre otras se ven las aplicaciones siguientes:

Las soluciones decrecientes en color conseguidas al obtener la curva patrón, pueden servirnos por su misma estabilidad una vez separadas del contenido acuoso, como escala permanente de comparación, apareando con una de ellas el color obtenido por el xileno-Tillmans en un ensayo problema realizado con la misma solución patrón y darnos por un medio rápido una idea aproximada del contenido de la muestra.

También existe la posibilidad de empleo de la solución de xileno-Tillmans para una volumetría extemporánea directa. Sólo es necesario la agitación de un volumen conveniente de ella con un volumen exacto de solución de fosfato, centrifugar y verter en una bureta: El xileno incoloro va a la parte superior y la solución azul hiáalina acuosa queda dispuesta para verterla sobre la solución problema.

Recuperación del xileno.

Realizada la colorimetría, los residuos de la solución de Tillmans en xileno se coleccionan en un frasco. Para su recuperación seguimos la marcha siguiente:

Lavamos con agua, dejamos sedimentar y sifonamos la capa acuosa. La solución de Tillmans en xileno se agita con solución al 1 % de bicarbonato sódico que provoca su decoloración, sifonamos la capa coloreada acuosa, repetimos dos veces la loción con agua destilada, sifonando cada vez. Agregamos un poco de carbón activo, se deja estar 24

horas, filtramos por filtro de poro fino y destilamos el xileno por calefacción directa en baño de aire.

Utilizamos un matraz de fondo redondo unido a un refrigerante descendente mediante una pieza intermedia con dilatación esférica y los extremos esmerilados, uno ordinario para el matraz y otro de rótula para el refrigerante.

La ebullición marcha bien sin necesidad de regulación con material poroso; despreciar los primeros centímetros cúbicos del destilado si se obtienen turbios por los vestigios del agua del xileno.

* * *

Con el nuevo método hemos determinado el contenido en ascórbico de algunos vegetales frescos y en el cuadro siguiente expresamos los resultados comparándolos con los existentes en la bibliografía.

**Contenido en ascórbico expresado en miligramos por cien gramos
hallado en alimentos vegetales frescos por la nueva técnica**

Material	Color y solub. de pigmento	Agua	Determinaciones	Ascórb. en mg. % encontr	Bibliografía
Zumo de limón		—	1	37	30-78 Mathiesen
Plátano		74	2	8	8-12 Eekelen
Mandarina		80	2	41,8	20-25 Clavera
Perejil verde	i/x	75	2	108,5	100 Clavera
Coliflor		91	1	95,0	42-50 Clavera
Judías verdes	i/x	88,5	1	20	12 Eekelen
Pimiento amarillo	i/x	88	2	171	125-180 G. Olmedo
Tomate		93	2	21	15-20 Clavera
Moniato		71	1	11	
Patata fresca (enero)		74	2	25,4	25 Eekelen
Patata vieja.		65	4	6,3	8,9 Eekelen

Los filtrados de extracto coloreados han sido agitados con solo xileno para ensayar su solubilidad; los pigmentos de las muestras ensayadas son insolubles en xileno (i/x).

Conclusiones

De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1.^a—Se prepara una solución Tillmans en xileno comprobándose que:

- a) Es inalterable en su color y en su capacidad reactiva para la vitamina C (ácido ascórbico).
- b) El reactivo de Tillmans pasa al agua al agitar la solución con soluciones acuosas alcalinas. No existe antecedente bibliográfico.
- c) En la colorimetría de esta solución no influye el pH dentro de un margen de 2,5 a 4,5 de la solución acuosa con la que se pone en contacto.
- d) La longitud de onda apropiada a la colorimetría es de 500 milimicras.

2.^a—Se ensayan dos técnicas de valoración que se diferencian en que en una el contacto entre ascórbico y Tillmans es por agitación y en la otra transcurre la reacción en solución acuosa y revierte por agitación el Tillmans sobrante al xileno inicial. Se comprueba la mejor bondad de esta última.

3.^a—La existencia de CO_2 no tiene acción perjudicial sobre el colorante y en cambio hace inerte la atmósfera de la probeta, lo que puede tener utilidad en la valoración del ácido ascórbico asociado al hierro ferroso.

4.^a—En la técnica que se propone:

- a) El tiempo de valoración es de 15 segundos.
- b) La determinación del ascórbico con la solución de Tillmans en xileno cumple la ley de Beer desde 20 a 200 gammas en las condiciones que se indican.

5.^a—Se propone un nuevo método de valoración de ácido ascórbico en material vegetal fresco:

- a) Su fundamento estriba en utilizar el reactivo de Tillmans disuelto en xileno que se arrastra por solución alcalina de fosfato; basta acidular, añadir el extracto problema, contar el tiempo y agitar para que revierta el Tillmans al xileno inicial.
- b) Sus ventajas son: Estabilidad de la solución reactivo, tensión de vapor inferior a la de las soluciones acuosas, margen de valoración de ascórbico superior al de otros métodos, necesidad de una solución medida para reactivo y disolvente, fijación cómoda del tiempo de reacción y pH adecuado sin neutralizar el extracto con solución de NaOH (Pepkowitz).
- c) Posibilidad de utilización de las soluciones decrecientes en color conseguidas al obtener la curva patrón como escala permanente de comprobación con el color obtenido por el xileno Tillmans en un ensayo problema. Esto proporciona, por un medio rápido, una idea aproximada del contenido en ascórbico de la muestra.

6.^a—Se han realizado determinaciones en vegetales frescos con la nueva técnica, que se comparan con las dadas por la bibliografía encontrando en general buena concordancia.

R E S U M E N

Se describe un método colorimétrico de valoración de ácido ascórbico empleando una solución de reactivo de Tillmans en xileno de cuyo disolvente se arrastra el Tillmans por una solución acuosa de fosfato; la solución azul obtenida se lleva por adición de una solución tampón a un pH próximo a 4, se adiciona el extracto que debe valorarse y transcurrido el tiempo de reacción se agita la pequeña probeta que contiene las soluciones y reactivos anteriores, revertiendo el Tillmans sobrante al xileno inicial. La pérdida de D. O. de la solución permite hallar el contenido en ácido ascórbico del volumen o peso de muestra empleados.

Son ventajas del método el reducir las medidas de xileno y Tillmans a una sola, la fijación cómoda y rigurosa del tiempo al no tener que adicionar reactivo alguno después de la medida del extracto y la estabilidad de la solución de Tillmans en xileno.

S U M M A R Y

Essentially the new method is based in shaking a stable xilenic solution of Tillman's reagent with sodium phosphate solution which remove the colorant. With this buffered solution we act the reaction with the unknown extract. When the reaction finish it comes necessary to shake uprightly in order to mix the excess of reagent with the xilenic solution, suitable to do a colorimetric determination.

It has been shown advantages such as accuraty in volumes measurement suitable way of application for several matters.

R É S U M É

On décrit un nouveau méthode consistant a faire agir le réactive de Tillmans avec xilene (solution stable) dans une éprouvette qui contient de la solution de phosphate sodique où passe le réactive, prennant la couleur bleu. A cette solution aqueuse, tamponée (pH, 4), se déroule la réaction Tillmans-acide ascorbique.

Le temp passé, il suffit agiter la éprouvette pour faire retourner le Tillmans restans au xilene. Cette dernier solution est colorimétrée.

Cette nouveau méthode a de plusieurs avantages, tel de la mesure juste, simplification et aisance et signale un chemin qui est possible de parcourir par autres méthodes et matières.

BIBLIOGRAFIA NACIONAL Y EXTRANJERA

- 1.—*Gstirner, F.*: Método físico-químico de valoración de vitaminas. Edit. Manuel Marín, Barcelona (1944).
 - 2.—*Koch, J. y Brettbauer, G.*: Determination of l-ascorbic acid in blackcurrant juice, in intermediate products, and in black-currant sweet must.—Fruchtsaft. Ind. 2 n.º 260 (1957) C. A. 51, 11609 d (1957).
 - 3.—*Blas, L.*: Agenda del Químico. Edit. Aguilar, Madrid. (1942).
 - 4.—*Santos Ruiz, A.*: Las vitaminas. Edit. Saeta, Madrid. (1941).
 - 5.—*Stepp, W.*: Methode of Biochemicals Analysis. David Click, Vol I. London.
 - 6.—*Paech, K. y Tracey M. V.*: Moderne Methoden der Pflanzennalyse, Zweiter Band Springer-Verlag. (1955).
 - 7.—*Rocasolano, G.*: Química General. Edit. Gambón, Zaragoza. (1935).
 - 8.—*Hughes, R. E.*: Use of hemocysteine in the estimation of dehidroascorbic acid.—Bioch. J. 64,203 (1956).
 - 9.—Véase *Gstirner* (1) pág. 137.
 - 10.—*Geigy, J. R.*: Tables scientifiques, Bale, Suiza (1953).
 - 11.—*Robotgi, K. K. y Sayal, P. K.*: A spectrophotometric study of the stability of ascorbic acid. J. Proc. Inst. Chemists (India) 29,28 (1957).
 - 12.—*Dupaigne, P.*: L'Analyse des jus de fruits.—Véase Mise au Point de Chimie analytique pure appliquée et d'analyse bromatologique. 5.ª serie. Masson & Cie. pág. 50.
 - 13.—*Higbet, D. M. y West, (E. S.)*: A procedure for the determination of ascorbic acid based upon the use of a standardized solution of 2-6 dichloro-phenol indophenol in xilene. J. Biol. Chem. 146, 655 (1942).
- Stepp, W.*: Fisiología, Patología, Terapéutica y Política sanitaria de la alimentación. Edit. Labor, Madrid.—(1942).
 Medicamenta, Ed. Labor 4.ª Edic. Tomo I (1951).
- Clavera Armenteros, J. M.*: Los problemas de la alimentación. Edit. Prieto, 3.ª edic. Granada (1953).
- Wissberger, A y Luvall, J. E.*: L'autoxidation de l'acide ascorbique en presence de cuivre. J. Am. Chem. Soc. 66, 700 (1944), Bull. An. 6 2300 z.
- Brynktanova, N. A.*: Vitamin C stabilizers and their application in communal feeding. Voprozy Vitaminol, (1955) C. A. 52, 595 (1958).
- Niculin, A. A. y Valova, N. B.*: The stabilizing effect of ascorbic acid upon adrenal line solutions. Aptechnos Delo, 3, (4), 24(1954) C. A. 49, 2676 b (1955).

- Babadur Khan, A. y Ahmad, B.*: Study of substances inhibiting the aerobic oxidatio of ascorbic solutions. *J. Sci. Research* 6, 58 (1954) C. A. 49, 3425 i (1955).
- Harris, J. L. y Olliver, M.*: Vitamin methodes. The reability of the method for estimating vitamin C by titration against 2, 6 dichloro-phenolindophenol.—Control test with plant tissues.
Bioch. J. 36, 155 (1942), pág. 160.
- Morros Sardá, J.*: Elementos de Fisiología. Tomo 1, 7.^a ed. (1956).
Boll. Inform. Extranj. Septiembre, pág. 557 (1958).
- Alfajeme y Rubio, C.*: Métodos químicos de valoración de la vitamina C en vegetales. Tesis doctoral. Universidad Central. Facultad de Farmacia, Madrid (1940).
- Olmedo, G.*: Citado por Casares López, R. en su tratado de Bromatología.
 Edit. Casares, 3.^a ed. (1959).
- Pennachiotti, M. I.*: Estudio comparativo de los métodos de Tillmans y de Ros para la valoración del ácido ascórbico. *Anales de Bromatología* 6, 359 (1954).
- Randoin, Luci*: Citado por el anterior. Véase la cita anterior.
- Ajón, G.*: Della vitamina C noi succhi di agrume. *Citrus ital. Ag.* 18, 6 (1946) *Bull. Annay.* 8, (11) 125405 (1947).
- Cboten Inajaki*: Vitamin in unshiu oranges. *Nat. Sc. Rept. Ochanomizu Univ.* 4 96 (1953) C. A. 46, 11942 c. (1952).
- Van der Laats, J. E.*: Comparative study of the citric and vitamin C content of the juici of some citrus fruits. *Rev. Biol. trop. Universidad de Costa Rica* 2 núm. 1 (1954).
- Jacobs, M. B.*: Chemycal analysis of Food and products. *Vas Nostrand.* 2.^a edición. New-York (1951).
- Lindner, K.*: Application of mixed colors in the titatron of colored solutions. *Z. Lebensn. Untersuch u. Forsch* 102 37 (1955) C. A. 49 14225 b (1955).
- Winton, A. L. y Winton, K. B.*: Análisis de Alimentos. Edit. Hasa. Buenos Aires (1947).
- Bukasch, F. y Wilner, G.*: Determination of ascorbic acid in nectar, pollen part of blossons and fruits. - *Phyton* 7 37 (1956).
- Pi Joan y Klenperer citados por Todd, J. C. y Sanford, A. H. en su *Diagnóstico clínico por el Laboratorio*. Edit. M. Marín, pág. 419 (1943).
- Udalov, Y. F. y Bykova, S. V.*: Comparative avaluation of methods of preserving material fort the quantitative analysis of ascorbic acid: *Laboratoiol. Delo* 11 n.º 39 (1956) C. A. 50 16945-1 (1956).
- Fujita e Ivatake*: *Biochim. Zeitzch.* 277 293 (1935).
- Paeck, K y Tracey, M. V.*: Moderne methoden der Pflazenanalyse. Springer-Verlag. Zweiter Band. Vol. II, pág. 101.
- Marx, Th.*: Determination of ascorbic acid.-*Laudw. Forsch.* 2 229 (1951) C. A. Vol. 45 6237 i.