

# REVITECA

Revista en  
Tecnología  
y Ciencia  
Alimentaria

Publicación Semestral del Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos \* Vol. 2 Ns 1-2 \* 1993

---

ISSN 1022-0321

## EFECTO DE LA ESTIMULACION ELECTRICA EN LA SUAVIDAD DE LA CARNE BOVINA



Micrografía electrónica de transmisión de célula muscular  
del *Longissimus dorsi* (12.000X)

### Determinación de la vida útil de un extensor de leche método acelerado

La determinación de la vida útil de un extensor de leche y la de la leche íntegra en polvo, se realizaron mediante la técnica de "almacenamiento acelerado"... (ver pág. 31)

### Alternativas de aprovechamiento de los almidones residuales de la deshidratación osmótica de frutas. Elaboración de mermelada

Se realizó un estudio del empleo de los almibares residuales de la deshidratación... (ver pág. 23)

### Determinación de una fórmula de ceviche de pescado

Con el fin de estandarizar una formulación de ceviche que permite posteriormente estudiar el crecimiento y la supervivencia de bacterias patógenas ... (ver pág. 18)

### Método modificado para la determinación de ácido ascórbico en frutas por medio de cromatografía líquida

Se incluyó, como modificación de un método de análisis para la determinación rápida de ácido ... (ver pág. 48)



Revista Semestral publicada por el Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos

Director del CITA  
Ing. Luis Fernando Arias M.

Editor  
Ricardo Quirós Castro.

Consejo Editorial  
Ing. Luis Fernando Arias Molina.  
Ing. Fernando Aguilar Villarreal.  
Ana Ruth Bonilla Leiva, Ph. D.  
Víctor Lobo Di Palma, M. Sc.  
Juan Manuel Esquivel Kruse, M. Sc.  
Lic. Vera García Cortés.

Diseño de Portada  
Ricardo Quirós Castro.

Diagramación  
Jeanina García Ureña.

La responsabilidad de los trabajos firmados es de sus autores y no del CITA, excepto cuando se indique expresamente lo contrario.

La mención de cualquier empresa o procedimiento patentado no supone su aprobación por parte del CITA.

Los artículos incluidos en REVITECA pueden reproducirse libremente siempre y cuando se haga mención expresa de su procedencia y se envíe copia al Consejo Editorial.

Correspondencia para canje y suscripciones  
Universidad de Costa Rica - Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos  
REVITECA  
San José - Costa Rica  
Telex UNICORI 2544  
Tels. 225-9885, 224-8027  
253-53-23 ext. 4212-4701  
Fax (506) 253-3762

La presente edición de REVITECA es patrocinada por la Fundación para la Investigación Agroindustrial Alimentaria (FIAA).

**Consumo de algunos alimentos y preparaciones en niños preescolares y adultos de un área rural y una comunidad urbana del Valle Central de Costa Rica**  
Anne Chinnock 1

**Determinación del mejor estado fisiológico para cosechar papaya (*Carica papaya* L.) y madurarla con etefón (ácido 2-cloro-etilfosfónico)**  
Miguel Monterrey-López  
Marcia Baraona-Cockrell  
Diego Aguirre-Rosales  
Wilfredo Flores del-Valle  
Herbert Madrigal-Villa 7

**Efecto de la estimulación eléctrica en la suavidad de la carne bovina**  
Teresita Rodríguez-Salas  
José Antonio Zaglul-Slon  
Francisco Hernández 12

**Determinación de una fórmula de ceviche de pescado**  
Virginia Jiménez-Sibaja  
Vera García-Cortes 18

**Alternativas de aprovechamiento de los almíbares residuales de la deshidratación osmótica de frutas. Elaboración de mermeladas**  
Ana María Rodríguez-Sibaja  
Ana Cecilia Segreda-Rodríguez 23

**Determinación de la vida útil de un extensor de leche; método acelerado**  
Víctor Lobo-Di Palma 31

**Rendimientos y coeficientes técnicos en las etapas de cosecha, postcosecha y procesamiento del palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes*)**  
Ruth Calderón-Castro  
María Alexandra Sancho-Hernández 42

**Método modificado para la determinación de ácido ascórbico en frutas por medio de cromatografía líquida de alta presión**  
Jorge Ulate-Rodríguez  
Ana Ruth Bonilla-Leiva 48



## Método modificado para la determinación de ácido ascórbico en frutas por medio de cromatografía líquida de alta presión

Jorge ULATE-RODRIGUEZ\*, Ana Ruth BONILLA-LEIVA\*

### ABSTRACT

**Modified method for the determination of ascorbic acid in fruits through high pressure liquid chromatography.**

The use of acetic acid in the mobile phase of a method of analysis for the determination of ascorbic acid in fruits, using high pressure liquid chromatography, was introduced as a modification, and the results evaluated. The method has a range of applicability of 0,001-0,250 mg ascorbic acid/mL. The sensibility of the method is 0,001 mg/mL. The statistical validity of the method was demonstrated. Samples of various fruits were analyzed with and without addition of vitamin C standards, in order to determine the method's recovery with the fruits. Recoveries higher than 89% were obtained.

### RESUMEN

Se incluyó, como modificación de un método de análisis para la determinación rápida de ácido ascórbico en frutas por medio de cromatografía líquida de alta presión, la utilización de ácido acético en la fase móvil y se evaluaron los resultados obtenidos. El método es aplicable en un rango de 0,001-0,250 mg ácido ascórbico/mL. La sensibilidad del método es de 0,001 mg/mL. Se demostró la validez estadística del método y se analizaron muestras de varias frutas con adición y sin ella de patrones de vitamina C para determinar la recuperación del método con las distintas frutas. Se obtuvieron recuperaciones mayores al 89%.

### INTRODUCCION

Debido a su fácil degradación, la vitamina C es un compuesto muy utilizado en la tecnología de alimentos como índice de calidad nutricional en los alimentos procesados. Badui (1988) reporta que si el ácido ascórbico resiste los tratamientos térmicos de los alimentos, se considera que todos los demás nutrientes se encuentran en buen estado. Por esta razón, es importante contar con un método de análisis rápido que pueda ser aplicado en el control de calidad de los alimentos. El método propuesto por la AOAC presenta el inconveniente de que tarda cerca de una hora para la obtención de los resultados (AOAC, 1975). Otro método muy empleado consiste en la aplicación de enzimas para la determinación de este compuesto. Sin embargo, tiene las desventajas de que requiere periodos de incubación de la muestra de 6 minutos a 37°C y de 15 minutos a 37°C para lograr la acción de la enzima, lo cual implica cuidados excesivos por parte del analista para no afectar la actividad enzimática y evitar el deterioro del ácido ascórbico (Boehringer Mannheim, 1989). La cromatografía líquida de alta presión es una opción importante, por cuanto permite análisis rápidos con alta exactitud. En la literatura se reporta gran cantidad de métodos cromatográficos útiles para la determinación de ácido ascórbico.

Watada (1982), presenta un buen método de análisis cromatográfico para esta vitamina, el cual muestra una buena resolución para el ácido ascórbico en menos de 10 minutos. Sin embargo, la fase móvil propuesta, que consiste en una solución 1,5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , presenta la desventaja de ser una sal, lo que hace necesario extremar los cuidados en la limpieza de la columna luego de realizados los análisis, para evitar que queden restos de sal en la

\* Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica.



columna, lo cual puede obstruirla y reducir su vida útil.

Otro método propuesto es el utilizado por el Ministerio de Sanidad y Consumo de España (1989), pero este método no resulta aplicable debido a que usa como fase móvil una solución amortiguadora de fosfato de potasio y acetonitrilo en una relación 60:40, este último es extremadamente caro.

Además, al emplear una solución de una sal como fase, es probable que se den los problemas antes mencionados para el método de Watada. De manera similar, el método descrito por Dennison, Brawley y Hunter (1981) utiliza como fase móvil una solución 50:50 metanol-solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25%.

López, Simal y Romero (1989) presentan un método práctico para el análisis del ácido ascórbico. Sin embargo, tiene la desventaja de que aplica ácido sulfúrico en su fase móvil, que es muy corrosivo.

El objetivo de este estudio es evaluar la utilización de una disolución de agua y ácido acético (88/12 %v/v) como fase móvil para el análisis cromatográfico de ácido ascórbico en frutas.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de la muestra:

La parte comestible de la fruta fue homogenizada en una licuadora convencional. Se tomaron 25 g del homogenizado y se aforó a 100 mL con una disolución de  $\text{HPO}_4$  6% con EDTA  $1 \times 10^{-6}$  M y dietilditiocarbamato  $1 \times 10^{-7}$  M para lograr la extracción del ácido ascórbico (Watada, 1982). Se filtró a través de algodón y posteriormente se filtró utilizando papel de filtro Whatman 4. El filtrado se pasó por un filtro de microporo de  $0,45 \mu\text{m}$  antes de ser inyectado en el cromatógrafo. Durante toda esta etapa, la muestra se protegió de la luz para evitar pérdidas de vitamina C.

### Soluciones patrón:

Las soluciones patrón se prepararon a partir de cantidades exactamente conocidas de ácido ascórbico sólido de alta pureza, aforadas con la solución de ácido metafosfórico-EDTA-dietilditiocarbamato y protegidas de la luz. Todas fueron filtradas con el filtro de microporo de  $0,45 \mu\text{m}$ .

### Condiciones de análisis:

Se utilizó una columna Alltech C18 con un tamaño de partícula de  $5 \mu\text{m}$  y cuyas dimensiones eran  $250 \times 4,6$  mm. La fase móvil empleada fue una disolución agua:ácido acético (88:12 %v/v), cuyo pH es de 2,2. Esta solución fue filtrada por microporo de  $0,45 \mu\text{m}$  y desgasificada. El análisis se realizó isocráticamente con un flujo de  $0,4$  mL/min y a temperatura ambiente. El ácido ascórbico se determinó con un detector ultravioleta Shimadzu modelo SPD-6A a 254 nm. Se cuantificó por áreas con un integrador Shimadzu modelo C-R3A.

### Prueba con patrones:

Se realizó una prueba con patrones de distintas concentraciones, por duplicado, para determinar el rango de aplicación del método. Adicionalmente se analizaron patrones de concentraciones cercanas al límite inferior del rango de aplicación, por triplicado, para determinar la sensibilidad del método y el límite de detección.

Posteriormente, se eligieron tres concentraciones dentro del rango de aplicación y se analizaron patrones con siete repeticiones en cada punto, para determinar la validez estadística del método.

### Análisis de frutas:

Se analizaron diferentes frutas, adquiridas en un local comercial sin muestreo estadístico, para determinar el comportamiento del método. Primero se analizó cada fruta y luego se analizó una muestra igual, pero con la adición de una cantidad conocida de ácido ascórbico, con el objeto de determinar la recuperación del método. En ambos casos se trabajó por duplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La preparación de la fase móvil utilizada es sencilla y presenta la ventaja de que el ácido acético no es muy corrosivo. La Figura 1 muestra un cromatograma típico obtenido para un patrón de ácido ascórbico.



Figura 1: Cromatograma de una solución patrón de ácido ascórbico. El primer pico (5.65 min) corresponde a la solución de ácido metafosfórico. El segundo pico (7,2 min) corresponde al ácido ascórbico.



En el Cuadro 1, se muestra la evaluación del método propuesto, para la cual se procedió al análisis de patrones de ácido ascórbico. Estos resultados demuestran que en el rango de 0,001 mg/mL a 0,250 mg/mL el método presenta alta exactitud, se logró una recuperación que oscila entre 94,9 y 115,4%. Este rango de valores, en una muestra de 25 g de fruta, representa la posibilidad de determinar vitamina C desde 0,4 mg de ácido ascórbico/100 g de muestra hasta 100 mg/100 g

**Cuadro 1. Análisis de patrones de ácido ascórbico.**

Concentración teórica (mg/mL)	Concentración medida (mg/mL)	Promedio	% Recuperación
0,001	0,001	0,001	100,0
	0,001		
	0,001		
0,002	0,002	0,002	100,0
	0,002		
	0,002		
0,013	0,015	0,015	115,4
	0,015		
0,019 0,020	0,021	0,020	105,3
0,059	0,057	0,056	94,9
	0,055		
0,068	0,071	0,071	104,4
	0,071		
0,105	0,107	0,106	100,9
	0,106		
0,167	0,164	0,164	98,2
	0,165		
0,212	0,210	0,210	99,0
	0,209		
0,253	0,243	0,244	96,4
	0,244		

Los datos anteriores exhiben un coeficiente de correlación de 0,9997. No se probaron concentraciones más altas de 0,250 mg/mL, por cuanto existe la posibilidad de que se sature la columna.

La sensibilidad de un método se define como la diferencia más pequeña en concentración que puede ser detectada, y depende de la diferencia más pequeña que puede ser distinguida en el

instrumento de lectura (Acuña, 1992). Esta se definió para el método en cuestión como 0,001 mg/mL.

El límite de detección es un medio cuantitativo para expresar el límite inferior de concentración para la cual se puede usar una técnica (Acuña, 1992). Para el método propuesto, el límite de detección es de 0,001 mg/mL, igual que la sensibilidad.

El Cuadro 2 muestra los patrones analizados para determinar la precisión del método y la validez estadística de este.

**Cuadro 2. Validación estadística del método de análisis.**

Patrón (mg/mL)	Concentración medida (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	Límite de confianza
0,023	0,022	0,023	0,001	± 0,001
	0,023			
	0,023			
	0,023			
	0,023			
0,108	0,111	0,108	0,003	± 0,002
	0,108			
	0,108			
	0,103			
	0,108			
0,210	0,213	0,208	0,002	± 0,001
	0,207			
	0,208			
	0,206			
	0,207			

El Cuadro 2 permite observar que el método presenta muy buena precisión, esta es mejor a menores concentraciones. Este fenómeno se puede deber a lo antes mencionado con respecto a la saturación de la columna a mayores concentraciones.

Una vez demostrada la validez del método, se procedió a la aplicación en algunas frutas. El objetivo de esta parte fue observar la recuperación de patrones añadidos a las muestras para determinar la recuperación del método. Por este motivo no se realizó un muestreo estadístico de las frutas, pues no se pretendió caracterizar las frutas con respecto a su contenido de vitamina C. El Cuadro 3

muestra los resultados obtenidos, se deduce que se logra una mayor recuperación en la mandarina. En la Figura 2 se puede observar un cromatograma obtenido para una muestra de mandarina.

**Cuadro 3. Contenido de vitamina C en algunas frutas.**

Fruta	Vitamina C* (mg/100 g)	Acido ascórbico (mg/100 g)		% recuperación
		añadido*	medido*	
Carambola ( <i>Averrhoa carambola</i> )	32,2	29,5	29,1	98,6
Maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> )	27,3	44,4	40,0	90,1
Naranja ( <i>Citrus aurantium</i> )	54,1	27,7	24,7	89,2
Granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> )	21,5	18,0	16,2	90,0
Mandarina ( <i>Citrus cinensis</i> )	18,0	35,7	36,0	100,8

a) Resultado del promedio de dos mediciones

b) Se encuentran dentro del rango de aplicación del método



**Figura 2:** Cromatograma de una muestra de mandarina. El pico de ácido ascórbico aparece a los 7,25 min.

## CONCLUSIONES

El método propuesto en este artículo es bastante exacto y preciso en la determinación cuantitativa del ácido ascórbico. Tiene un amplio rango de aplicación. Se obtiene una alta recuperación en el análisis de vitamina C en frutas. Requiere menos de 10 minutos en cada determinación, por lo que puede ser aplicado como análisis de rutina en los laboratorios.

Se recomienda el estudio de la aplicación de este método para la determinación de vitamina C, en alimentos que no sean frutas.

## REFERENCIAS

- ACUÑA, J. 1992. Comunicación personal. Facultad de Química, Universidad de Costa Rica.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1975. Official Methods of Analysis. 12 ed. Washington: AOAC.
- BADUI, S. 1988. Química de los Alimentos. México: Alhambra.
- BOEHRINGER MANNHEIM. 1989. L-Ascorbic acid: biochemical analysis, food analysis. Información Técnica.
- DENNISON, D.; BRAWLEY, T.; HUNTER, G. 1981. J. Agric. Food Chem. 29:927.
- LOPEZ, M. J.; SIMAL, J.; ROMERO, M. A. 1989. Aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución al análisis de ácidos orgánicos en zumos, néctares y bebidas refrescantes. An. de Bromatol. 12(1):65.
- MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. 1989. El Código Alimentario Español y su Desarrollo Normativo: Frutas y Vegetales. Vol. XIV. Capítulo XXII. España.
- WATADA, A. E. 1982. A High-performance liquid chromatography method for determining ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables. HortScience 17(3):334.