

# DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN UCHUVA (*Physalis peruviana L.*), POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

## ASCORBIC ACID DETERMINATION IN GOOSEBERRY (*Physalis peruviana L.*), FOR HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

TANIA M. GUTIÉRREZ<sup>1</sup>, OLGA L. HOYOS<sup>2</sup> Y MARTHA I. PÁEZ<sup>3</sup>

### PALABRAS CLAVE:

Ácido ascórbico, cromatografía líquida de alta resolución, uchuva, estandarización y extracción.

### KEY WORDS:

Ascorbic acid, high-performance liquid chromatography, gooseberry, standardization and extraction

### RESUMEN

*El ácido ascórbico (AA) es una vitamina esencial en la dieta humana, y su determinación por técnicas sensibles y rápidas, es importante para evaluar su estabilidad en diferentes alimentos. Actualmente la búsqueda de fuentes naturales de AA, reviste gran interés por las características antioxidantes de la vitamina; la uchuva (*Physalis peruviana L.*), fruto silvestre de los Andes suramericanos, registra contenidos de 20 a 32 mg de AA por cada 100 g de pulpa, siendo así, un cultivo promisorio para incluir en los registros de las fuentes comunes de esta vitamina. El objetivo principal de este estudio, fue encontrar las condiciones óptimas para la extracción, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) del AA presente en la uchuva (*Physalis peruviana L.*); para ello se analizaron diferentes metodologías reportadas para el proceso de extracción. Por el método del ácido fosfórico se encontraron porcentajes de recuperación entre el 92,36 y 100,4 %; las condiciones de operación más adecuadas para la cuantificación del AA por CLAR, fueron, fase móvil:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  al 1 % pH = 2,7; fase estacionaria: Hypersil  $\text{C}_{18}$  ODS  $\mu 5$  m x 4,0 mm x 250 mm; longitud de máxima absorción: 265 nm y un flujo: 0,9 mL/min. La metodología de cuantificación presentó linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad a un nivel de confianza del 95%. El contenido de AA determinado para la uchuva fue de 0,3320 mg ( $\pm 0,0262$ )/g de muestra, la estandarización del método de cuantificación del AA por CLAR ofrece la oportunidad de realizar posteriores investigaciones acerca de la estabilidad de la vitamina en la uchuva.*

Recibido para evaluación: Diciembre 5 de 2006. Aprobado para publicación: Febrero 5 de 2007

- 1 Magíster en Ciencias Química, Universidad del Valle, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Contaminantes Ambientales y Plaguicidas
- 2 Doctora en Ciencias Química, Universidad del Cauca, Departamento de Química, Grupo de investigación en Química de Productos Naturales
- 3 Doctora en Ciencias Química, Universidad del Valle, Departamento de Química, Grupo de investigación en Contaminantes Ambientales y Plaguicidas

Correspondencia: Tania Gutiérrez: e\_mail: tgutierrez@unicauca.edu.co

## ABSTRACT

*The ascorbic acid (AA) it is an essential vitamin in the human diet, and their determination for sensitive and quick technical, it is important to evaluate their stability in different foods. At the moment the search of natural sources of AA, had great interest for the antioxidants characteristics of the vitamin; the gooseberry (*Physalis peruviana* L.), tropical fruit of the South American Andes, registers contents from 20 to 32 mg of AA for each 100 g of pulp, being this way, a promissory cultivation to include in the registrations of the sources common of this vitamin. The main objective of this study, was to find the optimize conditions for the extraction, identification and quantification by high-performance liquid chromatography (HPLC) of the present AA in the gooseberry (*Physalis peruviana* L.); for they were analyzed it different reported methodologies, for the extraction process. The phosphoric acid method, of they were recovery percentages between the 92,36 and 100,4 %; the most appropriate operation conditions for the quantification of AA for HPLC, were: Mobile phase:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  to 1 % pH = 2,7; Stationary phase: Hypersil C<sub>18</sub> ODS 5 $\mu$  m x 4,0 mm x 250 mm; Maximum absorption wavelength of: 265 nm and a Flow: 0,9 mL/min. The quantification methodology presented linealidad, precision, accuracy and sensibility at a level of trust of 95 %. The content of certain AA for the gooseberry was of 0,3320 mg ( $\pm$  0,0262)/g sample, the standardization of the method of quantification of the AA for HPLC offers the opportunity to carry out later investigations about the stability of the vitamin in the gosseberry.*

## INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico (AA) es un nutrimento esencial para los humanos. Una baja ingesta causa una enfermedad, por deficiencia, conocida como escorbuto. Este ácido esta presente en forma natural en muchas frutas y verduras, además, estos alimentos son ricos en vitaminas antioxidantes, compuestos fenólicos y carotenos [1, 2].

La *Food and Drug Administration* (FDA, Dirección de Alimentos y Medicamentos), clasifica el ácido ascórbico sintético como un aditivo alimenticio "generalmente reconocido como seguro". Se adiciona a una amplia variedad de alimentos, tanto por razones nutricionales como técnicas.

Entre las funciones del AA, están la fijación del oxígeno: Cuando los alimentos se embotellan o se enlatan estos contienen oxígeno, que podría reaccionar con varias moléculas del alimento, provocando rancidez, pérdida de color, entre otras características. Al agregar AA, este fija o elimina el oxígeno, como se observa en la figura 1.

Además la fijación de radicales libres y control del pardeamiento, [3], hacen que esta vitamina sea uno de los aditivos más empleados en la industrial de los alimentos.

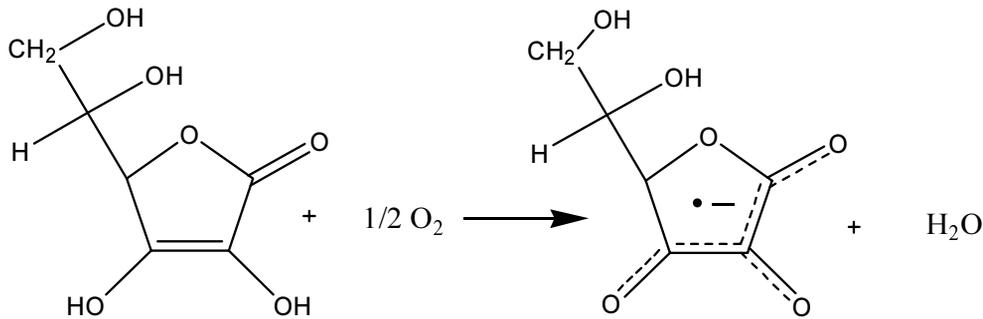
El AA, es conocido como una vitamina termolábil; varios autores, [4, 5] han estudiado la cinética de degra-

dación térmica en jugos y frutas naturales, bajo diferentes condiciones de tratamiento; por ejemplo, la oxidación del AA al ácido dehidroascórbico y dicetogulónico, hace que se pierda la actividad vitamínica, razón por la cual, el seguimiento de la variación en la concentración del AA en alimentos, es relevante para establecer los mecanismos que afectan su estabilidad y por tanto influyen en el tiempo de vida útil de los mismos.

La uchuva es una fruta típica de los Andes Suramericanos, pertenece a la familia de las solanáceas y el género *Physalis*; cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre. La uchuva es la especie más conocida de este género y se caracteriza por tener un fruto azucarado y con buenos contenidos de vitaminas A y C (AA 20 mg/100 g de fruta), además de hierro y fósforo. Su jugo, presenta valores de pH entre 3,6 a 4,1; éste parámetro favorece la estabilidad del AA en la fruta, frente a procesos de oxidación, tratamientos térmicos, exposición a la radiación, etc.

La determinación de AA por diferentes técnicas analíticas, ha sido ampliamente estudiada, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la molécula. (6,7) Torregrosa (8,9) cuantifica el AA en jugos de naranja y zanahoria por técnicas polarográficas, dadas las características redox del analito; empleando la gota de mercurio como electrodo de trabajo, pulso diferencial con velocidad de barrido de 10 mV/s y cuantificación por adición estándar.

Figura 1. Reacción del ácido ascórbico con el oxígeno (3).



El uso de la espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis), para la determinación del AA, es ampliamente utilizada en investigaciones con alimentos, [10,11], pues este ácido presenta transiciones electrónicas fuertes en la región UV, facilitando su identificación y cuantificación por esta técnica.

Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), garantizan límites de detección y cuantificación más bajos, que facilita además la eliminación de los efectos causados por la matriz (interferencias en otros métodos de análisis); esta técnica se utiliza como herramienta esencial en los estudios cinéticos detallados [12,13,14].

El objetivo de este estudio fue realizar la optimización del método de extracción, identificación y cuantificación del AA en la uchuva (*Physalis peruviana L.*), por CLAR; teniendo en cuenta que la información sobre la estabilidad de esta vitamina en la uchuva es incipiente.

La técnica cromatográfica fue utilizada posteriormente para evaluar la cinética de degradación térmica y lumínica del AA en la uchuva [15].

## METODOLOGÍA

**Reactivos.** Los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron todos grado analítico. Las soluciones patrón de AA se prepararon con: L-ascórbico 99,9 %, Aldrich Chemical Co, Inc; dichas soluciones se prepararon con ácido fosfórico 0,05 N en agua deionizada: Ácido fosfórico, Merck, 85 %. Se trabajó con Ácido sulfúrico: Iso Merck, 95 - 97 %, Fosfato monobásico de potasio: Mallinckrodt, 99,5 %, para la extracción de la vitamina en la fruta.

Las fases móviles empleadas para optimizar la elución del AA en el cromatógrafo de líquidos fueron: Fosfato de sodio monobásico: Mallinckrodt, 99,2 %, Metanol HPLC: Fischer, Chem Alert, 99,9 % y Acetonitrilo HPLC: Fischer, Chem Alert, 99,9 %. Todas las soluciones se prepararon con agua deionizada (sistema EQ-millipore), cuya conductividad registró valores entre 0,5 a 0,8  $\mu\text{S}$ .

La muestra de uchuva para los análisis, fue recolectada en el cabildo *El Cacique* ubicado a 3128 m.s.n.m, el cual pertenece al resguardo indígena de Guambia en Silvia, departamento del Cauca (Colombia). El cultivo estaba constituido por 500 plantas de uchuva distribuidas aleatoriamente entre cultivos de maíz, de las cuales se seleccionaron 50 plantas de un lote de 6 x 13,5 m, de 7 meses de edad, para el estudio.

Teniendo en cuenta la distribución aleatoria de las plantas, se realizó un barrido entre filas, tomando en promedio seis uchucas por planta, para obtener al final del recorrido una muestra compuesta. Las uchucas recolectadas con cáliz de color amarillo se cortaron con tijeras, realizando corte transversal del pedúnculo; una vez obtenida la muestra compuesta, ésta se almacenó en una nevera de icopor de dos pisos, para evitar que las 300 uchucas presentaran algún tipo de daño mecánico.

**Instrumentación: Cromatografía Líquida de Alta Resolución, (CLAR).** Para la adecuación del método de identificación y cuantificación de AA en uchuva, se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos HP 1100 series - desgasificador G1322A, bomba cuaternaria G1311A, detector UV-Vis G1314A, columna Hypersil ODS  $C_{18}$  -5 $\mu$  m x 4,0 mm x 250 mm.

Los equipos requeridos para el proceso de extracción fueron: Planchas Corning PC 420, Centrifuga Sorvall

T6000B, Liofilizador Labconco Freeze dryer 4,5 micrones Hg, pH-Meter 744 Metrohm, Balanza Analítica Precisa XT 220 A (0,001g), Licuadora Ozterizer con aspas de acrílico. Las muestras de uchuva y las soluciones patrón fueron almacenadas en una Incubadora Precisión 815 a  $4,0 \pm 0,1$  °C.

**Extracción del Ácido Ascórbico en Uchuva (*Physalis peruviana* L.).** En la optimización del procedimiento de extracción del AA de la fruta (se trabajó con todo el fruto comestible, sin cáliz), se evaluaron tres metodologías diferentes; el procedimiento de Johnston propone la maceración y posterior liofilización, además de la extracción con una solución tampón de acetato de sodio, filtración e inyección, por triplicado, al cromatógrafo de líquidos [16]. El segundo y tercer método consistió en la extracción con Agua-Ácido sulfúrico y con Ácido fosfórico 0,05 N respectivamente, [17]; se realizó una extracción sólido-líquido por espacio de 30 minutos, al término de los cuales se centrifugó a 6000 r.p.m por 20 min, posteriormente se realizó la separación de la fase acuosa; se filtró, se aforó e inyectó, por triplicado al cromatógrafo de líquidos.

Para los análisis se trabajó con un tamaño de muestra de 25,5020 g de fruta; con la técnica de extracción adecuada se optimizó el volumen del solvente extractor, entre 60 y 120 mL.

**Cuantificación de Ácido Ascórbico por CLAR.** Con una solución patrón de AA de 50 mg/L en ácido fosfórico 0,05 N y teniendo en cuentas los diferentes reportes, (16,18,19), acerca de las condiciones para la cuantificación de AA en jugos y frutas, se optimizó la fase móvil y la longitud de onda del detector (barrido entre 200 a 320 nm), para obtener la mayor sensibilidad y resolución en la señal cromatográfica. Para ello se realizaron ensayos con las siguientes fases móviles:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 %, pH = 2,3
- Acetonitrilo-Agua, (70:30)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 %, pH = 2,7
- Metanol-Solución reguladora de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,03 M, pH = 2,7, (99:1)
- Agua-Metanol-Acetonitrilo (74,4: 25,0: 0,6)

Se realizaron ensayos de curva de adición estándar y curva de calibración con patrones de AA entre 1,0 a 25,0 mg/L en ácido fosfórico 0,05 N, para determinar el efecto matriz en el método de cuantificación.

**Rango de Linealidad:** Se evaluó la linealidad de la curva de cuantificación con las soluciones patrón de AA, entre 1,0 y 25,0 mg/L, con un criterio de linealidad de  $R \geq 0,990$ ,  $R^2 \geq 0,980$  y Coeficiente de variación  $CV \leq 5,00$  %. Cada patrón se inyectó por triplicado y se relacionó el área del pico cromatográfico vs. concentración del AA.

**Precisión:** La precisión hace referencia a la reproducibilidad y repetibilidad de un conjunto de medidas realizadas con el mismo método de cuantificación [20].

**Repetibilidad:** Con una solución de 10,0 mg/L de AA y teniendo en cuenta que el analito es una vitamina sensible a la degradación por cambios de temperatura y radiación, se preparó cada día un patrón fresco, el cual se sometió al análisis en las mismas condiciones de operación (Siempre el mismo operador, equipo, laboratorio y en pequeños intervalos de tiempo). El criterio establecido de repetibilidad fue un  $CV \leq 5,00$  %.

**Reproducibilidad:** La concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una solución patrón de AA de 10,0 mg/L fue sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes (Operadores, equipos, laboratorios y/o épocas diferentes), [21].

**Sensibilidad:** Para el parámetro de sensibilidad se evaluó el límite de detección y de cuantificación. Experimentalmente, se utilizaron los límites de confianza de la regresión, empleando cinco soluciones patrón de AA de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 y 1,0 mg/L.

**Exactitud:** Una solución patrón de 10,0 mg/L de AA certificada se tomó como referencia para determinar la exactitud del método de cuantificación, realizando inyecciones por triplicado de dicho patrón en el cromatógrafo de líquidos.

**Estabilidad de las soluciones patrón de Ácido Ascórbico.** Teniendo en cuenta que el AA se degrada fácilmente por diversos factores, fue necesario establecer el tiempo y la temperatura en la cual se conserva la mayor cantidad de analito en su forma activa. Para ello, se midieron tres soluciones de referencia de 25,0 mg/L de AA a las 3, 6 y 9 horas después de su preparación, almacenándolas en matraces protegidos de la luz. Además se evaluó el efecto de cinco temperaturas de almacenamiento (4, 10, 20, 30 y 40 °C), con soluciones patrón de AA de 20,8 mg/L; se tomaron muestras cada tres horas y se inyectaron al cromatógrafo de líquidos.

**Estimación del contenido de Ácido Ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.).** Una vez determinados los parámetros de cuantificación del AA, se prosiguió a determinar su contenido en la muestra (Uchuva). Para ello se tomó 12,7510 g (Por triplicado) de uchuva, y se efectuó el método de extracción correspondiente; al final el sobrenadante se aforó a 100 mL con ácido fosfórico 0,05 N, se filtró con membrana 0.45  $\mu$  m, se realizó la dilución correspondiente e inyectó al cromatógrafo de líquidos por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Extracción del Ácido Ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.).** El AA se clasifica como una vitamina hidrosoluble, razón por la cual es abundante en frutas cuyo contenido de agua es superior al 50 %; esta vitamina se degrada muy fácilmente por cambios de temperatura, incidencia de la radiación y concentración de oxígeno. Su extracción de fuentes naturales debe realizarse en medio ácido y con la mínima cantidad de radiación.

Utilizando la metodología indicada por Johnston, [16] se obtuvo un porcentaje de extracción del 94,13 % del ácido presente en la fruta. A pesar, que el porcentaje de extracción es superior al 85 %, el cromatograma de la figura 2, indica la aparición de un hombro en el pico del AA, lo cual implica una degradación del ácido a productos intermediarios.

Según Biancs, [22] la degradación del ácido ascórbico es grande cuando el contenido de agua decrece por debajo del 30%.

En otras investigaciones [18] los extractos liofilizados conservaron mejor el contenido vitamínico en los alimentos, puesto que el agua es el principal vehículo de transporte de enzimas y demás sustancias que causan el deterioro. Aún no es claro el mecanismo de pérdida del AA en frutas cuando el contenido de agua es mínimo.

Con la metodología de: 1. Agua- ácido sulfúrico y 2. Ácido fosfórico al 0,05 N, se obtuvieron porcentajes de recuperación del 85,05 y 92,36 - 100,4 %, respectivamente. A la metodología del ácido fosfórico al 0,05 N, se le optimizó la cantidad de solución extractora respecto a la cantidad de muestra; para ello, se realizó

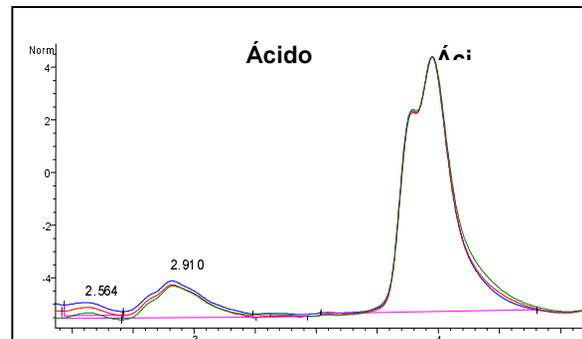
una curva entre la concentración de AA extraído y el volumen de ácido fosfórico al 0,05 N adicionado (en mL).

Como puede observarse en la figura 3, a partir de 100 mL de solución extractora, el contenido de AA comenzó a permanecer constante para un tamaño de muestra de 25,5020 g; por tal razón, se utilizó la mitad de muestra (12,751 g) y 50,0 mL de solución extractora para los análisis.

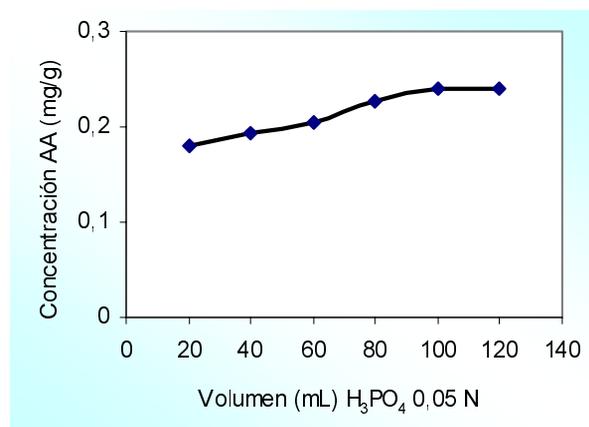
**Cuantificación de Ácido Ascórbico por CLAR.** De acuerdo con la figura 4, la longitud de onda de mayor sensibilidad. Para la detección del AA, fue la de 265 nm, con un área total de 5218,8 mUA.

La fase móvil de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  al 1% y pH = 2,7 presentó picos gaussianos con ancho de banda menor de 0,15 min., a comparación con otras fases que favorecieron los fenómenos dispersivo en la columna.

**Figura 2.** Cromatograma del AA extraído de la uchuva, según el método de Johnston, (Inyección por triplicado).



**Figura 3.** Extracción de AA con diferentes volúmenes de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 N, según el método de Osuna.



A continuación se describen las condiciones óptimas encontradas para la determinación del AA por CLAR: Figura 4.

- Fase móvil:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  al 1%, pH = 2,7
- Fase estacionaria: Hypersil  $\text{C}_{18}$  ODS  $5\mu\text{m}$  x 4,0 mm x 250 mm
- Longitud de máxima absorción: 265 nm
- Flujo: 0,9 mL/min

**Rango de linealidad:** Los valores entre las pendientes de la curva de calibración y adición estándar no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto se cuantificó por curva de calibración empleando el método de mínimos cuadrados con los datos sin promediar.

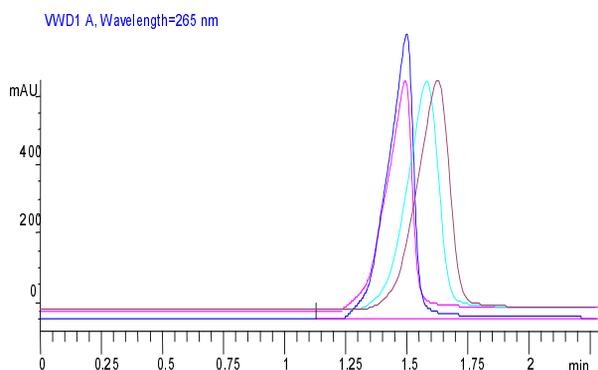
En la tabla 1, se hace evidente una buena relación lineal; sin embargo el mejor indicador del modelo lineal no es simplemente R.

Una prueba estadística de linealidad, consiste en calcular, el valor de t con n-2 grados de libertad (Ecuación 1), y comparar el resultado con el valor de t tabulado para el nivel de confianza requerido, que en nuestro caso fue del 95 %.

**Ecuación 1.** Cálculo de la t experimental para n-2 grados de libertad.

$$t = \frac{|r| \cdot (n - 2)^{1/2}}{(1 - r^2)^{1/2}} \quad \text{Ec. (1)}$$

**Figura 4.** Cromatograma de una solución patrón de ácido ascórbico a: 255, 265, 270 y 275 nm.



La hipótesis nula es, que no existe correlación entre y e x, si el valor calculado de  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ , se rechaza la hipótesis nula, es decir, si existe una correlación significativa. En este caso,  $R = 0,999$ ,  $R^2 = 0,998$  y  $n = 18$ , así  $t_{\text{tab}}$  es igual a 89,35 que comparado con  $t_{\text{tab}}$  [2,12], es mayor; por lo tanto existe una correlación significativa entre el área de pico y la concentración del analito.

En la Tabla 2 se utilizó el dato estadístico  $Sy/x$  para calcular la desviación estándar del intercepto y de la pendiente [23].

**Sensibilidad:** La sensibilidad corresponde a la mínima cantidad que puede producir un resultado significativo, se encuentra definida por los límites de detección y cuantificación. Límite de detección (LD): Existen diferentes conceptos acerca del LD, para un método analítico [24, 25, 26].

**Tabla 1.** Datos cromatográficos para diferentes concentraciones de ácido ascórbico (mg/L).

Concentración ppm	$Y_{\text{expe}}$	%CV
1	26,3796	
1	26,3238	
1	25,0436	2,9162
5	110,7637	
5	111,0972	
5	112,6089	0,8820
10	271,7395	
10	272,1218	
10	277,4879	1,1740
15	415,6191	
15	416,0305	
15	415,6191	0,0571
20	544,4357	
20	537,2949	
20	539,3567	0,6801
25	671,5256	
25	674,4119	
25	676,7628	0,3891
<b>PENDIENTE</b>	27,4869	
<b>INTERCEPTO</b>	-7,9002	
<b>R</b>	0,9991	
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9982	

Empleando otra aproximación, el LD para un analito es aquella concentración que proporciona una señal ( $y$ ) significativamente diferente a la señal de una muestra en "blanco" o "señal de fondo".

Los resultados obtenidos se evaluaron, calculando la recta de regresión para definir la respuesta a concentración cero por extrapolación al origen de la recta ( $b'$ ).

Posteriormente se determinó  $S_{bl}$  que corresponde a la desviación estándar del intercepto. Así,  $X_{LD}$  es la concentración mínima de analito que puede detectar el espectrofotómetro UV-Vis a 265 nm, la cual se determina por la ecuación 2. [27].

**Ecuación 2.** Determinación de la mínima cantidad detectable del ácido ascórbico por CLAR.

$$X_{LD} = \left| \frac{3 \cdot S_{bl} + b'}{m} \right| \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (2)}$$

El LD para la determinación de AA fue de 0,241 mg/L, (Otras técnicas, como la espectrofotométricas, manejan LD de 3,2 mg/L con niveles de azúcares menores del 0,15 %). (11) **Límite de Cuantificación (LC):** El límite de cuantificación o determinación es considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativas precisas, y para el AA está dado por:

**Ecuación 3.** Determinación de la mínima cantidad cuantificable del ácido ascórbico por CLAR.

$$X_{LC} = \left| \frac{10 \cdot S_{bl} + b'}{m} \right| \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (3)}$$

**Tabla 2.** Factores estadísticos en la determinación del error asociado a la pendiente e intercepto de la ecuación  $y = 27,4869 \cdot x - 7,9002$  para el ácido ascórbico.

Factores estadísticos	Valores
$S_{y/x}$	10,519
$Sm$	0,299
$Sb$	4,564
$t_{n-2} = 16$	2,120
$m = 27,4869$	$\pm 0,633$
$b = - 7,9002$	$\pm 9,667$

El valor determinado de LC fue de 0,3505 mg/L. De acuerdo con este parámetro, es posible indicar que la técnica de cuantificación por CLAR para el AA mediante curva de calibración, presentó sensibilidad.

**Exactitud:** En la tabla 3, se observan los porcentajes de error relativo, en la determinación de una solución referencia de 10,0 mg/L de AA. El error es inferior al 3,0 %, y de acuerdo con los parámetros anteriores, el método de cuantificación por curva de calibración para el AA, presentó exactitud.

**Precisión:** En la tabla 4, puede observarse la repetibilidad del método de cuantificación del AA, empleando una solución de referencia de 10,0 mg/L. Los valores de CV indican que el método de cuantificación por CLAR presenta repetibilidad.

En cuanto a la reproducibilidad del método se emplearon tiempos diferentes de análisis, (cada 15 días durante dos meses). La tabla 5, indica que existe reproducibilidad del método de cuantificación de AA en el tiempo; hay que tener en cuenta que el patrón fue preparado inmediatamente antes de realizar las medidas, puesto que su estabilidad para dos meses es mínima.

Los valores de % CV son inferiores al 3%, indicando que el método de cuantificación es reproducible en el tiempo.

**Estabilidad de las soluciones patrón de Ácido Ascórbico.** El AA presenta inestabilidad en soluciones acuosas aisladas, por tal razón éstas deben prepararse inmediatamente antes de ser analizadas por CLAR; de este modo se obtuvo que: partiendo de una concentración inicial de 25,48 mg/L de AA, al cabo de tres horas

**Tabla 3.** Determinación de la concentración de una solución referencia de 10,0 mg/L de ácido ascórbico por curva de calibración.

Días	1	2	3	4
<b>RÉPLICAS</b>	<b>mUA</b>	<b>mUA</b>	<b>mUA</b>	<b>mUA</b>
1	264,43	330,58	269,24	329,12
2	260,86	330,87	272,02	330,34
3	252,92	337,51	272,36	335,94
4	261,46	333,18	271,32	332,91
5	260,94	332,69	272,01	330,64
<b>PROMEDIO</b>	260,12	332,96	271,39	331,79
<b>DESVIACIÓN</b>	4,2847	2,7772	1,2608	2,6953
<b>% CV</b>	1,6472	0,8341	0,4646	0,8123

de preparada la solución (almacenada en incubadora a  $4,0 \pm 0,1$  °C), se degradó, en promedio el 13 %.

Pasadas seis horas, se determinó una pérdida del 30% y a las nueve horas restantes, del 44%; por tal razón se efectuaron todos los análisis, tanto de muestras de uchuva como de patrones, antes de las tres horas de iniciado el procedimiento.

La temperatura por su parte degrada el AA a su primer intermediario, el ácido dehidroascórbico; así en la figura 5, se observa el comportamiento de las soluciones patrón de AA (20,8 mg/L), a diferentes temperaturas de almacenamiento (Aisladas de radiación).

Las soluciones de AA a 4 y 10 °C presentaron una cinética de orden cero, es decir, la rata de cambio es independiente de la concentración; sin embargo, hay mayor preservación de la muestra a 4 °C, puesto que se conserva el 95,0 % de la vitamina inicial al cabo de 9 horas de almacenamiento.

A 10 °C se conserva el 88,91 % del AA inicial almacenado por 9 horas. Este comportamiento está acorde con el modelo cinético aplicado a los valores obtenidos, donde las pendientes de las curvas indican un aumento progresivo con la temperatura; esto se traduce en el aumento de la constante de rapidez (k), que acelera el proceso degradativo del ácido.

Las temperaturas de 20, 30 y 40 °C, catalizan la degradación del patrón con valores de k de 7,04, 7,82 y 16,7 ppm.h<sup>-1</sup> respectivamente; así, a 40 °C el AA decae completamente a un valor no registrado por el método de cuantificación, a un tiempo de 6 horas; obviamente el valor de k indica una velocidad de reacción bastante alta comparada con otras temperaturas [15].

**Estimación de la concentración de Ácido Ascórbico en uchuva por CLAR.** En la tabla 6 se indica el contenido de AA en uchuva utilizando el método del ácido fosfórico; en promedio, la muestra analizada presentó 0,332 mg ( $\pm 0,0262$ ) de ácido por gramo de muestra comestible.

Acorde con datos nutricionales en variedades andinas de Sur América, cuyo contenido promedio es de 0,43 mg; la variedad es un factor relevante en la composición química de la fruta. [28].

En la figura 6, se observan dos cromatogramas del AA extraído de la uchuva; la determinación del ácido se realizó por triplicado en una muestra compuesta de uchuva y su extracto se inyectó en el cromatógrafo de líquido. Las interferencias están ausentes, pues el pico presenta gaussianidad, con tiempo de retención corto, que favorece la rapidez en la medida.

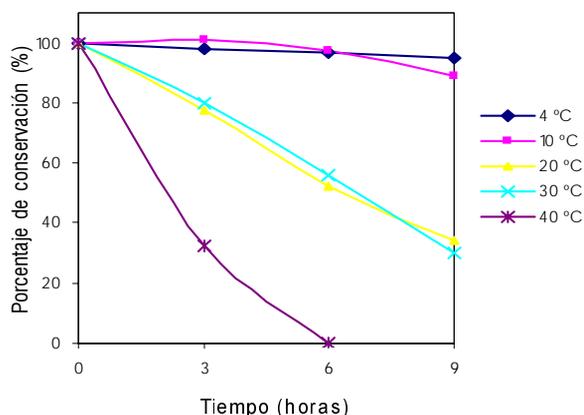
**Tabla 4.** Repetibilidad de un patrón de 10,0 mg/L de ácido ascórbico medido en cuatro días consecutivos.

RÉPLICAS	mg/L	mg/L	mg/L
1	9,908	10,174	10,08
2	9,778	10,187	10,18
3	9,489	10,383	10,20
4	9,799	10,317	10,16
5	9,781	10,302	10,18
<b>PROMEDIO</b>	9,751	10,25	10,16
<b>DESVIACIÓN</b>	0,156	0,08	0,05
<b>% CV</b>	1,599	0,871	0,451
<b>% Error</b>	2,49	2,51	1,61

**Tabla 5.** Reproducibilidad del método de cuantificación de un patrón de 10,0 ppm de ácido ascórbico medido cada 15 días por dos meses.

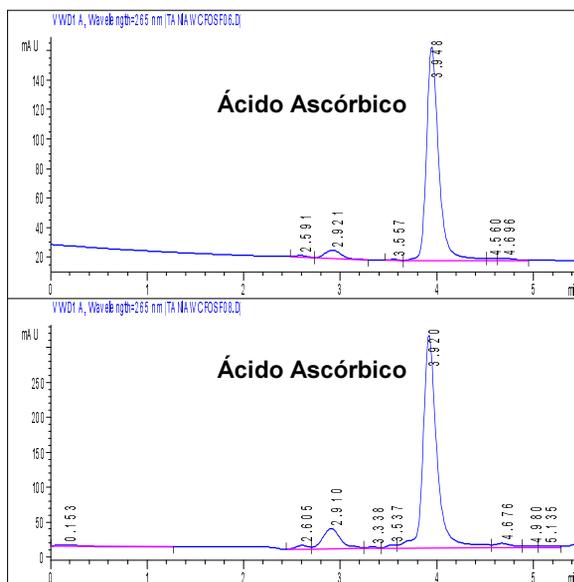
RÉPLICAS	mUA	mUA	mUA	mUA
1	318,30	271,74	269,24	275,38
2	315,56	272,72	272,02	276,46
3	312,46	275,49	272,36	273,28
<b>PROMEDIO</b>	315,44	273,32	271,21	275,04
<b>DESVIACIÓN</b>	2,9247	1,9437	1,7124	1,6182
<b>% CV</b>	0,9272	0,7111	0,6314	0,5883

**Figura 5.** Efecto de la temperatura sobre soluciones patrón de ácido ascórbico a pH 2,5



**Tabla 6.** Cuantificación de ácido ascórbico en uchuva.

Muestras de uchuva	Concentración (mg/g muestra)	Limites de confianza (95%)
1	0,330	$\pm 0,0246$
2	0,324	$\pm 0,0259$
3	0,341	$\pm 0,0281$

**Figura 6.** Cromatogramas de dos muestras de uchuva, extraídas por el método del ácido fosfórico.

## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los valores estadísticos obtenidos para la estandarización de la técnica cromatográfica, podemos indicar que la cuantificación del ácido ascórbico, utilizando el método del ácido fosfórico para su extracción y posterior determinación por CLAR, bajo las condiciones de Fase móvil:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  al 1%,  $\text{pH} = 2,7$ ; Fase estacionaria: Hypersil  $\text{C}_{18}$  ODS  $5\mu\text{m} \times 4,0\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ ; Longitud de máxima absorción: 265 nm y Flujo: 0,9 mL/min, es un método sensible con límite de detección de 0,241 mg/L y de cuantificación de 0,3505 mg/L.

Además de presentar, precisión y exactitud. Las soluciones y las muestras deben analizarse antes de las tres horas subsiguientes a su preparación, las cuales deben almacenarse a  $4, 0 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ . Esta metodología es útil para trabajar con matrices complejas como los alimentos, por su versatilidad y bajo costo. La concentración de ácido ascórbico en la uchuva (*Physalis peruviana* L.)

fue de 0,332 mg ( $\pm 0,0262$ ) por gramo de muestra; el método no presentó efectos de matriz dadas las condiciones de acidez que favorecen la estabilidad del ácido en el fruto.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los grupos de investigación de Química de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad del Cauca y al grupo de Contaminantes Ambientales y Plaguicidas del Departamento de Química de la Universidad del Valle por la financiación de esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] BLOCK, N. y HUDES, M. En: American Journal of Epidemiology, 154 (2001) 1113-1118.
- [2] JHON, Z. y YUDKIN, R. En: The Lancet, 359; (2002) 1969-1974.
- [3] ROIG, M; RIVERA, Z. y KENNEDY. En: Journal Food Science Nutrition, 44; (1998) 59-72.
- [4] JOHNSON, J. y BRADDOCK, R. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. En: Journal of Food Science, 60; (1995) 502-505.
- [5] VIEIRA, Margarida. y TEIXEIRA, A. Mathematical modelling of the thermal degradation kinetic of vitamin C in cupuacu nectar. En: Journal of Food Engineering, 43; (2000) 1-7.
- [6] KING, B. y SWITAISKI, Lydia. Keystone Betabasic and aquasil HPLC columns for the analysis if water-soluble vitamins. En: International Labmate, 1; (2001); 1-7.
- [7] TORRES, A. En: Ciência Tecnología Alimentos, 2 (2001) 21-26.
- [8] TORREGROSA, F. y ESTEVE, M. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange-carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. En: Journal of Food Engineering, (2005). Article in press.
- [9] ESTEVE, M. y BLASCO, R. Ascorbic acid degradation kinetic in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. En: Journal of Food Quality, 37; (2004)171-175.
- [10] BURDURLU, Hande; KOCA, Nuray. y KARADENIZ, Feryal. Degradation of vitamin C in citrus juice

- concentrates during storage. En: *Journal of Food Engineering*, (2005). Article in press.
- [11] ARYA, Stya. y MAHAJAN, Meenakshi. Photometric methods for the determination of vitamin C. En: *Analytical Sciences*, 14; (1998) 889-894. Reviews.
- [12] THIN, Mai. y FARID, Mohammed. Ultraviolet treatment of orange juice. En: *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 5; (2004) 495-502.
- [13] GIANNA, K. En: *Food Chemistry*, 83 (2003) 33-41.
- [14] RIZZOLO, Anna. y BRAMBILLA, Ada. Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue. En: *Food Chemistry*, 77; (2002) 257-262.
- [15] GUTIÉRREZ VALENCIA, Tania Milena. Seguimiento de la degradación térmica y lumínica de las vitaminas A y C en la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Cali, 2006. Tesis (Magíster Ciencias Químicas). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias.
- [16] JOHNSTON, Carol. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juice. En: *Journal American Dietetic*, 102; 4; (2002); 102-104.
- [17] OSUNA, Jorge. y WALL, Marisa. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-Type Chile cultivars. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46; (1998) 5093-5096.
- [18] NÍSPERO, C. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40 (1992).
- [19] DEL CARO, Alessandra; PIGA, Antonio. y VACCA, Vicenzo. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. En: *Food Chemistry*, 84; (2004) 99-105.
- [20] Analytical Chemistry. Guide for use of terms in reporting data. *Analytical Chemistry*, 47; (1975) 2527.
- [21] LONG, G. y WINEFORDNER, J. En: *Analytical Chemistry*, (1983) 55.
- [22] BIANCS, L. En: *Food Science*, (2000) 840.
- [23] MILLER, J. MILLER, J. Estadística para Química Analítica. Addison-Wesley, 5; (1993) 87-114.
- [24] VOGELGESANG, J. y FRESENIUS, Z. En: *Analytical Chemistry*, 328; (1987) 213-220.
- [25] PORTER, W. En: *Analytical Chemistry*, 63; (1997) 1638-1643.
- [26] WILLIAM, R. En: *Analytical Chemistry*, 63; (1991) 1535-1543.
- [27] DÍAZ, Iverlis. y FARIÑAS, Ofelia. Validación del método analítico para la determinación de 3 vitaminas hidrosolubles en un suplemento vitamínico. En: *Revista Cubana Farmacia*, 34; (2000) 93-99.
- [28] MORTON, J. *Fruits of warm climates*, (2004) 430-434.