

R. esp. Fisiol.  
Tomo VII, núm. 1, páginas 81 a 86, 1951

Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas  
Sección de Fisiología y Bioquímica

Universidad de Valladolid  
Facultad de Medicina  
Cátedra de Fisiología

Director Jefe: Prof. E. Romo Aldana

## I Comunicación

# Modificación al método de determinación del ácido ascórbico con célula fotoeléctrica

por Juan Manuel de Gandarias, Prof. Ayudante de la Cátedra

---

(Recibido para publicar el 28 de febrero de 1951)

El presente método fué ensayado con extractos de glándulas suprarrenales del cobaya. Antes de aplicarlo, hicimos un estudio teórico-práctico comparativo y crítico de los procedimientos más usuales empleados para dosificar la vitamina C. Fué entonces cuando ideamos uno que basado en la decoloración del azul de metileno pudiera aplicarse al Fotocolorímetro.

La acción reductora del 2,6-diclorofenolindofenol, fué señalada por Zilva (21) en 1927, Tillmans (18) en el año 1932, propuso un método cuantitativo valiéndose de esta propiedad. Para corregir el error que supone la presencia de sustancias que contienen azufre (glutation, cisteína, ergotioneína, etc.), que también reducen al 2,6-diclorofenolindofenol, Emmerie (4), en 1934, precipitaba estos cuerpos azufrados sirviéndose del acetato de mercurio, reactivo que complica extraordinariamente la técnica, ya que entonces se produce la oxidación del ácido ascórbico, siendo necesario reducirle de nuevo, mediante una corriente de ácido sulfhídrico, y eliminar el exceso de este gas, con otra corriente de nitrógeno; además ignoramos si por estas maniobras no se han creado nuevas sustancias capaces de reducir de nuevo al 2,6-diclorofenolindofenol.

La utilización del azul de metileno es la más adecuada para la investigación de la vitamina C en los órganos, toda vez que esta sustancia es decolorada únicamente por la vitamina anti-escorbútica y no por los compuestos que contenían azufre y que ya mencionamos antes. El proceder original de Martini y Bon-

signore (11), fué ligeramente modificado por Mentzer y Vialard Goudou (3).

La determinación del ácido ascórbico en los órganos y en la orina ha sido llevado a cabo entre otros muchos por Dichl y Berger (13), sirviéndose del 2,6-diclorofenolindofenol y por von Euler y Klussmann (8), así como por Harris y Ray (6), Svirbely (15), Besey y King (1), Zilva (20). Taubery y Klein (16), Mendivi y Deulofeu (12), Huszak (7), Giroud (5), Leblond y Ratsimamanga (5).

Wacholder y Podesta (19), de una parte, y de otra Thaddea y Hoffmeister (17), han modificado la determinación del ácido ascórbico con el azul de metileno. Bessey (2), en el año 1938, adaptó el procedimiento de Tillmans, a la célula fotoeléctrica.

Nosotros comenzamos a dosificar la vitamina C, en las glándulas adrenales de cobayos siguiendo el método de Martini y Bonsignore, teniendo en cuenta la modificación introducida en el mismo por Mentzer y Vialard Goudou. Pronto nos dimos cuenta de que era difícil alcanzar una igualdad sensible en la coloración de ambos tubos (testigo y problema), siendo por esto fácil que nos excediéramos en la adición de nuevas cantidades de azul de metileno, al pretender igualar la coloración de los dos tubos mencionados. Es procedimiento muy subjetivo.

Para obviar este inconveniente, pensamos adaptarlo a la célula fotoeléctrica y luego de verificar numerosas pruebas, conseguimos lo que nos habíamos propuesto.

### **Método**

Nuestra modificación es acusada si se tiene en cuenta que diluimos el azul de metileno, conforme se observará más adelante, del 1/10.000 al 1/30.000, que hemos suprimido el hiposulfito sódico, porque al formarse azufre coloidal, toda vez que el pH es muy bajo, se produce un enturbiamiento del líquido a dosificar, que impide una medida colorimétrica exacta. Por otra parte, nosotros trabajamos siempre a un mismo pH, lo que supone evitar muchos errores en las determinaciones, como se verá más adelante.

Al diluir, como hacemos, la solución de azul de metileno hasta el 1/30.000 podemos dosificar cantidades más pequeñas de vitamina C, que de otro modo sería imposible determinar.

#### *Descripción de la técnica*

##### *Reactivos. —*

1. — Solución de azul de metileno al 1/30.000
2. — Solución de ácido anhídrico acético al 10 %

3. — Solución de ácido ascórbico al 1/10.000 (ampollas de Cebion Merck)

4. — Solución amortiguadora (citrato trisódico 12G, bicarbonato sódico 3 G y agua bidestilada hasta 100 cc.)

Antes de comenzar la técnica valoramos la solución de ácido ascórbico (sol. 3) por iodometría.

*Metódica. —*

*Ensayo previo.* — Distribuimos en tubos del electrofotómetro cantidades progresivas de ácido ascórbico sol. 3, entre 0,0005 mg. y 0'12 mg. (de 0'05 cc. a 1'2 cc.), completando hasta 3 cc. con ácido tricloroacético (sol. 2). La reacción actual es la misma en todos los tubos (pH 3), porque en todos ellos se obtiene un volumen constante de 3 cc. cuyo fondo está constituido por el ácido tricloroacético que a dichas concentraciones desarrolla siempre el

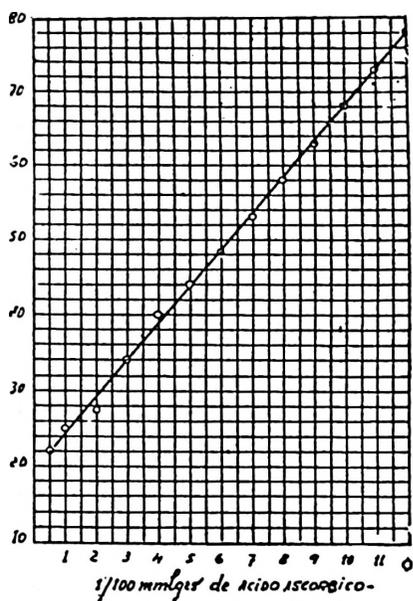


Fig. 1

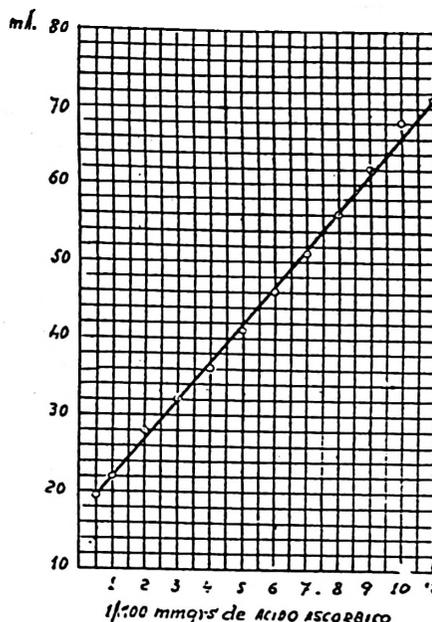


Fig. 2

mismo pH. Agregamos luego 2 cc. de solución amortiguadora (sol. 4) y 2 cc. de azul de metileno (sol. 1). Inmediatamente después de añadir este último reactivo se agita cuidadosamente el contenido de cada tubo y se le somete a irradiación ante una lámpara de 500 W. durante dos minutos exactos. Es preciso que los tubos estén parcialmente sumergidos en un recipiente que contenga agua

a baja temperatura, a fin de evitar que las radiaciones de la lámpara aumenten la temperatura de los tubos, destruyendo en gran parte la vitamina.

El sistema de iluminación está basado en el descrito por Lund (10). Una vez irradiados los tubos, medimos la decoloración

**T A B L A I**  
**Contenido de glándulas suprarrenales de cobayo**  
**en ácido ascórbico**

Peso	Mg./100 grs.	Peso	Mg./100 grs.
<b>DESPROTEINIZACIÓN CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO</b>			
0'129	53	0'259	62
0'310	54	0'279	76
0'301	72	0'176	48
0'205	68	0'168	48
0'186	67	0'236	49
0'222	64	0'143	44
0'292	83	0'136	44
0'132	76	0'237	46
0'120	75	0'224	43
0'246	50	0'2665	64
0'235	49	0'146	67
0'131	45	0'142	70
<b>DESPROTEINIZACIÓN CON ÁCIDO METAFOSFÓRICO</b>			
0'2445	80	0'242	66
0'2175	75	0'206	57
0'3025	85	0,217	59
0'230	72		

que han sufrido, mediante un electrofotómetro Etko, con filtro rojo que resultó ser el más apropiado para la valoración azul.\*

La fig. 1 expresa los valores de transparencia obtenidos en función de las concentraciones de ácido ascórbico. La gráfica es una recta y sigue la Ley de Lambert y Beer (9). La función es lineal porque como los tubos poseen el mismo pH el azul de metileno se decolorará en razón directa y proporcional a las cantidades

\* Agradecemos a la casa MERCK el envío de su producto Cebión.

de ácido ascórbico presentes. Se utiliza como curva de calibración para la determinación en órganos.

*Determinación en órganos.* — Obtenida la gráfica de calibración, pasamos a hacer las determinaciones en los órganos como sigue :

Se pesan los órganos en balanza de torsión y se trituran en mortero con una pequeña cantidad de arena lavada. Se añaden pequeñas cantidades de ácido tricloroacético (sol. 2), hasta un volumen total de 6 cc., al objeto de precipitar las proteínas. Cuando la masa del mortero adquiere un aspecto lechoso, se procede a filtrar o centrifugar. Del líquido claro sobrenadante, o del filtrado, se toman 3 cc. que se pasan a tubos del electrofotómetro, añadiendo acto seguido los 2 cc. de sol. amortiguadora y otros dos de la de azul de metileno, procediendo en lo demás como antes.

EJEMPLO. — Glándula suprarrenal de cobayo con un peso de 0'191 gr. Transparencia después de la irradiación, 68 mA, que corresponde en la gráfica a la concentración de 0'1 mg. El cálculo se hace teniendo en cuenta que nos hemos servido de la mitad del extracto total (3 cc.) refiriéndolo luego a 10'0 gr. de peso fresco de órgano :  $0'10 \times 2/0'191 = 0'052$ .

Posteriormente hemos trabajado con una solución de ácido metafosfórico, en substitución de la de ácido de tricloroacético al 10 %. Por lo demás, la técnica a seguir es exactamente igual a la precedente. Conservamos el mismo pH, la gráfica obtenida en tal caso está representada en la figura 2 y reproduce una línea recta al igual que en el caso anterior. Esto mismo hacen notar Policarí, Ferranz y Arnold (14). Guiándonos de esta última gráfica hemos dosificado también el ácido ascórbico en algunas glándulas suprarrenales.

La tabla 1 reúne los valores obtenidos en glándulas suprarrenales de cobayas normales.

La dilución del azul de metileno empleada es la más adecuada para la dosificación de la vitamina C en órganos que como las suprarrenales del cobaya a causa de su peso reducido y de su contenido en ácido ascórbico relativamente discreto, entra siempre en la escala de valores, que nosotros hemos manejado. Cuando se trata de dosificar las glándulas de otros animales, que poseen mayores depósitos de vitamina (conejo, rata, etc.) podemos emplear el azul de metileno a una concentración mayor. Si por el contrario, el órgano objeto del análisis contiene menor cantidad de ácido ascórbico, diluiremos aún más el azul de metileno.

### Resumen

Se describe un método que reúne las ventajas siguientes: fácil ejecución, gran sensibilidad y mucha rapidez.

### Summary

Some modifications of the Martini and Bentzer methods for determining vitamin C by means of methylen blue are proposed. For the reading of the results the photocolorimeter is applied. The method, according to the authors, is very sensitive and easily and rapidly executed.

### Bibliografía

- (1) BETHE, A.: *Pflügers Arch.*, 68, 449. 1897.
- (2) BETHE, A. y WOITAS, E.: *Arch. ges. Physiol.*, 224, 821. 1930.
- (3) BUDDENBROCK, W. von: *Biol. Zbl.*, 41, 41. 1921.
- (4) BUDDENBROCK, W. von: *Grundriss der Vergleichenden Physiologie*. 2.<sup>a</sup> ed. T. I. Verlag von Gebrüder Borntraeger. Berlin, 1937.
- (5) CARLET: *C. r. Acad. sc. Paris.*, 117, 565. 1888.
- (6) DEMOLL, R.: *Die Sinneorgane der Arthropoden ihr Bau und ihre Funktion*. Braunschweig. 1917.
- (7) DEMOOR, J.: *Arch. de Biol.*, 10, 567. 1890.
- (8) FRAENKEL, G.: *Zeitschr. f. vergl. Physiol.*, 16, 444. 1932.
- (9) FRIEDRICH, H.: *Zeitschr. f. vergl. Physiol.*, 18, 536. 1933.
- (10) HERTWECK, H.: *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, 139, 559: 1931.
- (11) HOFFMANN, R. W.: *Zeitschr. f. vergl. Physiol.* 18, 741. 1933.
- (12) KÜHL, H.: *Zeitschr. f. vergl. Physiol.*, 14, 450: 1931.
- (13) PRINGLE, J. W. S.: *J. Exp. Biol.* 17, 8. 1940.
- (14) RIJLANT, P.: *C. R. Soc. Biol. Paris*, 111, 636. 1932.
- (15) TEN CATE, J.: *Arch. néerland. de Physiol.* 21, 652. 1936.
- (16) TEN CATE, J.: *Arch. néerland. de Physiol.* 25, 401. 1941.
- (16) TEN CATE, J.: *Arch. néerland. de Physiol. de l'homme et des animaux*, 25, 401. 1941.
- (17) ULXKÜLL, J. von: *Z. Biol.*, 50, 168. 1908.
- (18) ZAWARZIN, A.: *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, 100, 245. 1912.