

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Bioquímica. Madrid.

## Observaciones acerca de la valoración de la vitamina E por método químico

por A. SANTOS RUIZ y A. J. CORREIA RALHA

(Recibida para publicar el 30 de Abril de 1947)

Para la valoración de los tocoferoles han sido propuestos hasta hoy los tres tipos de métodos siguientes:

- A. Métodos biológicos.
- B. Métodos físicos.
- C. Métodos químicos.

### A. — MÉTODOS BIOLÓGICOS.

Como por los métodos físico-químicos los diferentes tocoferoles se comportan de la misma manera frente a los reactivos empleados en su valoración y como biológicamente tienen diferentes actividades, se comprende que todavía se consideren los métodos biológicos como los más rigurosos.

En las varias técnicas biológicas propuestas se compara siempre la actividad del producto en estudio con dl- $\alpha$ -tocoferol sintético (12), (13), (17), (18).

La prueba de fertilidad en los roedores es el método más ordinariamente usado (10), (20). No obstante también se utilizan el conejo (17) y el crustáceo *Daphnia* (27), (28).

Generalmente se utilizan ratas vírgenes (1), (2) y los ensayos se realizan por métodos preventivos y curativos, predominando el criterio de que la prueba de gestación y reabsorción del feto debe ser completada con la determinación del

peso. La autopsia de los animales a los diez días de la gestación mejora aún la metódica anterior.

En el caso de la prueba de la fertilidad de la «*Daphnia magna*», crustáceo transparente, se mide el crecimiento de los ovarios y del embrión partenogénico en el saco embrionario.

A pesar de las ventajas que estos métodos presentan en relación con los físicos y químicos, y que ya fueron citados al principio, tienen inconvenientes que hacen que sean poco utilizables y que podemos resumir así:

a) *Error propio del método biológico.* — Este inconveniente, común a todos los métodos biológicos, reside en que cada individuo se comporta diferentemente en relación al producto en estudio y es por tanto necesario experimentar con un número apreciable de animales para que los resultados sean significativos.

b) *Necesidad de mucho tiempo para la ejecución.* — Esta es una de las más graves desventajas para la evaluación biológica de esta vitamina que limita su empleo sobre todo cuando se pretende hacer determinaciones en serie.

c) *Elevado precio.* — Estos métodos son excesivamente caros atendiendo a la carestía de los animales utilizados y a las dificultades de obtención de algunos de ellos.

d) *Infidelidad del reactivo.* — Los animales utilizados pueden presentar dolencias que contribuyan a falsear los resultados.

## B). — MÉTODOS FÍSICOS.

Los métodos físicos de valoración de vitamina E, que se basan en los espectros de absorción característicos obtenidos con soluciones en alcohol o ciclobexano,  $E \frac{1\%}{1 \text{ cm.}} = 284 \text{ m}\mu = 77, (3), (4), (14), (19), (21)$ , sólo pueden recomendarse para el compuesto puro, ya que las sustancias naturales con actividad antiestéril comprenden además del tocoferol sus ésteres, que presentan una absorción máxima en diferentes longitudes de onda. Por otra parte los indicios de vitamina A interfieren las observaciones en extractos lipídicos totales y si se saponifica cantidades apreciables de ergona se destruyen (8), a menos que la operación se realice en condiciones óptimas (9).

JOHN (14) modifica el método espectrográfico determinando

el espectro de absorción del producto de oxidación de la vitamina E y realizando ensayos antes y después de ésta, para excluir así los valores obtenidos de algún material previamente oxidado. El producto oxidado, que tiene una función quinona, presenta un máximo de absorción a  $265\text{ m}\mu$ , con un coeficiente de extinción aproximadamente superior al de el  $\text{dl-}\alpha$ -tocoferol.

Contribuye a limitar el empleo de estos métodos el hecho que no en todos los laboratorios poseen un espectrógrafo. Además la interferencia de compuestos, de estructura semejante a la vitamina E, disminuye apreciablemente el valor de esta técnica.

### C. — MÉTODOS QUÍMICOS.

Son los métodos más corrientemente utilizados, teniendo en cuenta su economía y rapidez. Todos ellos se fundan en una reacción de los tocoferoles por oxidación, distinguiéndose solamente por el agente oxidante.

a) *Agente oxidante*  $\text{Cl}_3$ , Fe. — WAEDELL y STEENBOCK propusieron en 1928 la dosificación de la vitamina E por medio de una solución alcohólica de cloruro férrico (29). EMMERIE y ENGEL propugnan una adición posterior de  $\alpha$   $\alpha'$ -dipiridilo que, con los iones ferrosos formados, origina una coloración roja característica (5), (6). Es conveniente trabajar con luz artificial porque la luz solar puede dar origen a una cierta coloración de la solución patrón.

Es obvio decir que también otras sustancias reductoras, entre las cuales se encuentra ciertos compuestos naturales del grupo de los carotenoides, interfieren las operaciones oscureciendo el color.

El método del dipiridilo de EMMERIE (9) recomienda la saponificación previa con KOH, 2N, durante diez minutos y ulteriormente propone una absorción con floridina activada con ácido clorhídrico (7).

PARKER y McFARLANE modifican el método anterior tratando el material a valorar, disuelto en hexano o éter de petróleo, con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  del 85 %, centrifugando y lavando con soluciones alcalinas diluidas para eliminar las sustancias perturbadoras (22).

Todos estos tratamientos previos, destinados a eliminar los

productos interferentes, provocan considerables pérdidas y en consecuencia errores en la evaluación.

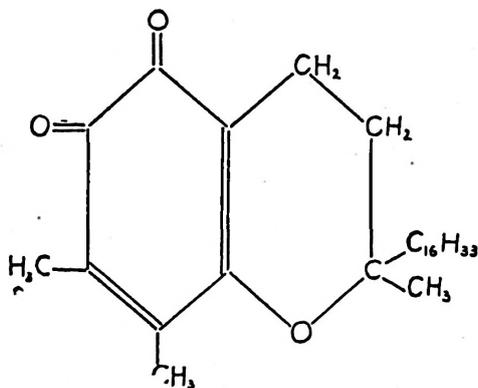
Para determinaciones muy exactas son necesarias grandes cantidades de producto, lo que restringe su aplicación.

b) *Agente oxidante*  $\text{Cl}_3 \text{Au}$ . — KARRER y sus colaboradores indican una técnica de dosificación de la vitamina E, basada en la oxidación producida por una solución alcohólica de cloruro de oro a  $50^\circ$ . El progreso de la reacción se sigue electrométricamente (15), (16).

Como en el caso anterior varios compuestos naturales, sobre todo carotenoides, pueden interferir la reacción. El autor evita dicho error repitiendo la determinación después de acetilar el insaponificable (los tocoferoles se convierten en acetatos no reductores). La vitamina A, que en ciertos materiales existe en cantidades apreciables, es destruída previamente con tricloruro de antimonio.

c) *Agente oxidante*  $\text{NO}_3\text{H}$ . — Este procedimiento es el más sencillo, pues consiste solamente en oxidar la vitamina E en solución alcohólica, con ácido nítrico originándose una coloración roja característica (FURTER y MEYER) (11).

La coloración roja parece ser debida a la formación del compuesto que se indica a continuación (24), (25):



La coloración puede determinarse en un colorímetro corriente, pero como varias sustancias que acompañan al producto pueden dar coloraciones diferentes, sobre todo amarillo pálido, se aconseja filtrar la luz de modo que se utilicen solamente las variaciones comprendidas entre 450 y 520  $m\mu$ .

Los productos de oxidación del tocoferol, biológicamente inactivos dan la misma coloración, lo que constituye una desventaja, pero en cambio la presencia de carotenoides no perturba la reacción. UNGNADE y SMITH (26) indican que este proceso convenientemente empleado es rápido y riguroso.

Como indicamos al principio, con los métodos químicos, cualesquiera que sean, es imposible distinguir los  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -isómeros que poseen actividades biológicas diferentes (ROSENBERG) (17).

## PARTE EXPERIMENTAL

Al pretender seleccionar una técnica para valoración de vitamina E, con objeto de utilizarla en las determinaciones corrientes de la Sección de Bioquímica, nos fijamos en la de FURTER y MEYER por ser la más simple, tener rigor suficiente y no ser perturbada la reacción por la presencia de carotenoides. Al aplicar el método a pequeñas cantidades de extractos lipídicos nos encontramos con dificultades que nos han llevado a estudiar una modificación de la técnica original que justifica esta nota.

### TECNICA (MODIFICADA)

Pesar aproximadamente un gramo de grasa en un tubo de ensayo y saponificar con tres c. c. de KOH alcohólica, 3N, hirviendo la mezcla durante diez minutos. Diluir en seguida con 2 c. c. de alcohol, pasar a una ampolla de decantación (aprovechando el alcohol en dos fracciones para lavar el tubo), adicionar después 15 c. c. de agua destilada (lavando también el tubo) y extraer tres veces con 15 c. c. de éter etílico. Lavar los extractos etéreos reunidos, tres veces con agua destilada, dos veces con KOH diluída al 5 % y por último con agua destilada, para eliminar el álcali hasta que no dé reacción fenoltaleína. Separar el éter secándolo con sulfato de sodio anhidro. Finalmente se evapora el éter a presión reducida.

El impondible, así extraído, se disuelve completamente en alcohol absoluto y se completa en probeta graduada hasta un volumen de 10 c. c.

Poner 5 c. c. de la solución anterior en un pequeño matríz de erlenmeyer y adicionar con una microbureta 1 c. c. de  $\text{NO}_3\text{H}$  al 65 % y hervir en baño maría, con refrigerante vertical, durante tres minutos exactos. Dejar reposar durante 15 minutos y observar en el fotómetro de Pulfrich, en la cubeta de 10 milímetros, interponiendo el filtro S47. En el otro foco de luz del fotómetro se pone en la cubeta como compensador la mezcla siguiente :

Alcohol absoluto . . . . .	16,7 c. c.
Acido nítrico del 65 % . . . . .	<u>3,3 c. c.</u>
Total . . . . .	20,0 c. c.

Muestras	Mét. Furter y Meyer modf.		Mét. de Furter y Meyer		Mét. de Karrer
	Peso de sustancia	vit. E gr. %	Peso de sustancia	vit. E gr. %	vit. E gr. %
Aceite de germen de trigo — 1	1,0 gr.	0,246	—	—	—
Aceite de germen de trigo — 2	0,9	0,293	0,5	0,522	0,292
	0,5	0,218	0,5	0,550	—
	2,3 (*)	0,180	—	—	—
Everol	0,47	0,203	—	0,860	0,200
	0,17 (*)	0,180	—	—	0,203
Aceite de germen de trigo — 3	1,0	0,176	—	—	—
	1,0	0,193	—	—	—
	2,0 (*)	0,137	—	—	—
Aceite de oliva	0,8	0,062	—	—	—
Aceite de semilla de «Coronilla gl.»	1,56	0,123	0,4	0,360	—

*Estudio del filtro*

Filtro	Longitud de onda	Extinción	Observaciones
S <sub>43</sub>	434 m $\mu$	0,530	Muy oscuro
S <sub>47</sub>	463	0,347	
S <sub>50</sub>	494	0,244	
S <sub>53</sub>	530	0,152	
S <sub>57</sub>	572	0,076	
S <sub>61</sub>	619	0,036	
S <sub>72</sub>	729	0,027	
S <sub>75</sub>	750	0,027	

El filtro S<sub>47</sub> es por lo tanto el más indicado.

*Estudio de la influencia del tiempo de reacción (ebullición con refrigerante del reflujo) en la producción del color*

Tiempo :	1 minuto	Extinción :	0,370
	2 »		0,370
	3 »		0,386
	5 »		0,426
	15 »		0,600

Del cuadro anterior se deduce que el tiempo de reacción influye en la producción del color, lo que indica claramente la necesidad de controlar exactamente dicho tiempo.

## CONCLUSIONES

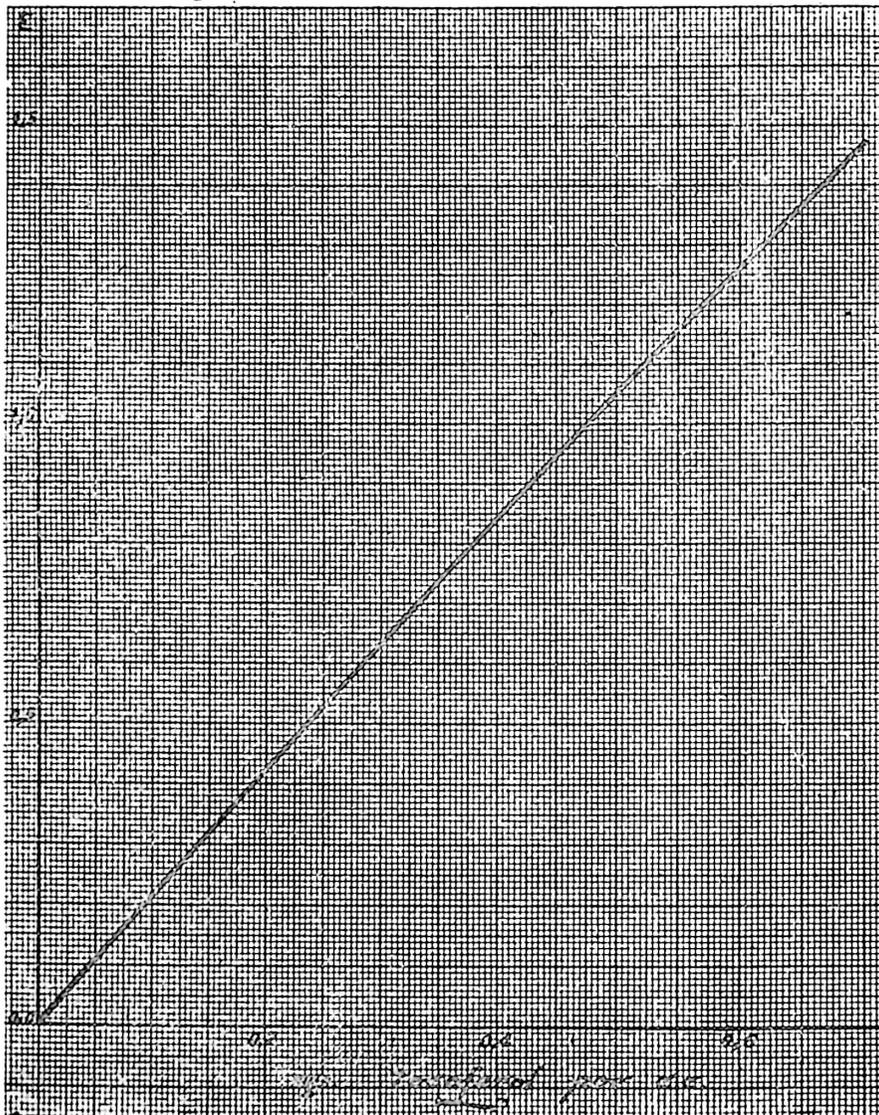
1.<sup>a</sup> Con la técnica modificada obtenemos valores más bajos que con el método original de FURTER y MEYER.

Es probable que, en el extracto lipídico total, otras sustancias distintas de la vitamina E puedan interferir la coloración, posiblemente por la formación de derivados nitrados. Empleando el insaponificable se limita al menos el número de esas sustancias.

2.<sup>a</sup> El método de KARRER produce valores muy próximos a

los que consiguen con la modificación que proponemos a la técnica de FURTER y MEYER.

3.<sup>a</sup> Operando en las condiciones indicadas parece ser que



un gramo de material es la cantidad que debe ser escogida, ya que el empleo de cantidades bastante diferentes conducen a valores más bajos (\*).

4.<sup>a</sup> Por la simplicidad de la ejecución, así como por su exactitud relativa, aconsejamos la técnica de FURTER y MEYER, modificada en el sentido de verificar la reacción en el insaponificable, para las valoraciones seriadas de vitamina E en productos de origen vegetal.

### Resumen

Los autores pasan revista a las diferentes técnicas usadas para la valoración de tocoferoles, analizando las ventajas e inconvenientes que presentan cada una de ellas.

Indican como la más práctica, y no menos rigurosa que las otras, la de FURTER y MEYER basada en la formación de un compuesto de coloración roja por oxidación de los tocoferoles por ácido nítrico.

Proponen una modificación para las determinaciones en grasas que consiste en utilizar el insaponificable, obtenido a partir de un gramo aproximadamente de producto, en lugar de operar con los lípidos totales como indica el método original.

### Summary

The authors review, in this work, the different techniques used for the evaluation of tocopherols, and analyze the advantages and the difficulties of every one of them.

They point out as the most practical, and not less exact than the others, that of Furter and Meyer, modified, which is based on the formation of a compound of a red colour, by oxidation of Vitamin E with nitric acid.

They suggest in their modification to use the unsaponifiable obtained starting from about one gramme of product, instead of operating with the total lipides, as the original technique determined.

### Bibliografía

1. BACHARACH, A. C. ALLCHORNE, E. y GLYNN, H. E. *Biochem. J.* 31 : 2287, 1937.
2. BACHARACH, A. C. y ALLCHORNE, E. *Biochem. J.* 32 : 1298, 1938.
3. CUTHBERTSON, W. F. J., RIDGEWAY, R. R. y DRUMMOND, J. C. *Biochem. J.* 34 : 34, 1940.
4. DRUMMOND, J. C. SINGER, E. y MASWALTER, R. J. *Biochem. J.* 29 : 456, 1935.
5. EMMERIE, A. y ENGEL, C. *Nature* 142 : 873, 1938.
6. EMMERIE, A. y ENGEL, C. *Rec. trav. Chem.* 57 : 1351, 1938.
7. EMMERIE, A. y ENGEL, C. *Rec. trav. Chem.* 58 : 283, 1939.
8. EMMERIE, A. y ENGEL, C. *Rec. trav. Chem.* 58 : 895, 1939.

9. EMMERIE, A. *Rec. trav. Chem.* 59 : 246, 1940.
10. EVANS, H. M. y BURR, G. O. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*  
11 : 334, 1925.
11. FURTER, M. y MEYER, R. E. *Helv. Chim. Acta* 22 : 240, 1939.
12. GAUTIER. *Bull. Org. Hyg.* 12 (1) : 1-113, 1945/6.
13. HUME, E. M. *Bull. Org. Hyg.* 9 : 460-466, 1940/41.
14. JOHN, W. *Soc. Chem. Ind. Food Group.* 23, 1939.
15. KARRER, P., ESCHER, R. FIRITZCHE, H., KELLER, H., RINGIER, B. H. y SALOMÓN, H. *Helv. Chim. Acta* 21 : 240, 1939.
16. KARRER, P y KELLER, H. *Helv. Chim. Acta* 21 : 939, 1939.
17. MACKENZIE, C. G. y Mc. COLLUM, E. V. *J. Nutrition* 19 : 345, 1940.
18. *Mémoire Bull. Org. Hyg.* 9 : 467-470, 1940/41.
19. MOORE, T. y FAJOGOPAL, K. R. *Biochem. J.* 34 : 335, 1940.
20. OLCOTT, H. S. y MATILL, H. A. *J. Biol. Chem.* 104 : 423, 1934.
21. OLCOTT, H. S. *J. Biol. Chem.* 110 : 695, 1935.
22. RORKER, W. A. y Mc. FARLANE, W. D. *Can. J. Research.*  
18 : 405, 1940.
23. ROSENBERG, H. R. *Chemistry and Physiology of the Vitamins.*  
Interscience Publishers. Inc. (N. Y.) 1942.
24. SMITH, L. I., IWIN, W. B. y UNGNADE, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* 61 : 2424, 1939.
25. SMITH, L. I. IWIN, W. B. y UNGNADE, H. E. *Science* 334,  
1939.
26. UNGNADE, H. E. y SMITH, L. I. *J. Org. Chem.* 4 : 397, 1939.
27. VICHOEVER, A. y COHEN, I. *Am. J. Pharm.* 110 : 297, 1938.
28. VICHOEVER, A. *J. Assoc. Official Agr. Chem.* 22 : 715, 1939.
29. WADDEL, J. y STEENBOCK, H. *J. Biol. Chem.* 80 : 431, 1928.