

### **NOTA IMPORTANTE:**

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

**ININ/ Oficina Nacional de Normalización**

**FRUTAS, VEGETALES Y PRODUCTOS  
DERIVADOS. DETERMINACION DEL CONTENIDO  
DE ACIDO ASCORBICO.  
PARTE 2: METODOS DE RUTINA  
(ISO 6557-2:1984, IDT)**

Fruits, vegetables and derived products.  
Determinations of ascorbic acid content.  
Part 2: Routine methods

---

ICS: 67.080.01

1. Edición      Noviembre 2002

**REPRODUCCION PROHIBIDA**

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.  
Teléf.: 830-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: [nc@ncnorma.cu](mailto:nc@ncnorma.cu)



## Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

### Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el NC-CTN 31 de Jugos y Néctares integrado por las siguientes instituciones:
  - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
  - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
  - Laboratorios CUBACONTROL
  - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
  - Unión de Conservas de Vegetales
  - Ingelco / Río Zaza
  - Ministerio del Comercio Interior
  - Instituto de Investigaciones de Cítricos y Frutales (IICF-MINAGRI)
  - Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ-ONN)
  - Oficina Nacional de Normalización
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la ISO 6557-2:1984 "Fruits, vegetables and derived products. Determination of ascorbic acid content. Part 2: Routine methods.
- No contiene el capítulo de Referencias normativas por lo que la referencia a la norma en cuestión aparecerá en los apartados correspondientes.
- Sustituye a la NC 77-22-16:1982 "Conservas de frutas y vegetales. Determinación del contenido de ácido ascórbico.

## © NC, 2002

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC).**

**Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.**

**Impreso en Cuba**

## FRUTAS, VEGETALES Y PRODUCTOS DERIVADOS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACIDO ASCÓRBICO. PARTE 2: METODOS DE RUTINA

### 1 Objeto

Esta parte de la presente norma cubana establece dos métodos de rutina para la determinación del contenido de ácido ascórbico<sup>1)</sup> de frutas, vegetales y productos derivados.

**Método A:** Método por valoración con 2,6 diclorofenolindofenol.

**Método B:** Método espectrofotométrico con 2,6 diclorofenolindofenol después de extraer con xileno.

El método A sólo puede ser usado en ausencia de ciertas interferencias (ver 2.6).

El método B es aplicable a productos derivados de frutas y vegetales fuertemente coloreados.

### 2 Método A: Método por valoración con 2,6 DCIF

#### 2.1 Principio

El método se basa en la extracción del ácido ascórbico con una solución ya sea de ácido oxálico o de ácido metafosfórico-ácido acético. Valoración con el colorante 2,6 diclorofenolindofenol hasta un color rosado salmón.

#### 2.2 Reactivos

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida; el agua empleada será agua para análisis de acuerdo a la ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use. Specification and test methods.

##### 2.2.1 Solución de extracción

Puede emplearse tanto una solución al 2% (m/m) de ácido oxálico como una solución de ácido metafosfórico preparada como sigue:

Disolver 15 g de ácido metafosfórico en 40 mL de ácido acético glacial en un matraz aforado de 500 mL conteniendo 200 mL de agua. Enrase y filtre a través de papel de filtro directamente al envase de vidrio donde se guardará el reactivo.

Esta solución permanece inalterada en refrigeración durante 7 a 10 días.

##### 2.2.2 Solución del colorante 2,6 diclorofenolindofenol

Disolver 50 mg de la sal de sodio del 2,6 diclorofenolindofenol en 150 mL de agua caliente (50 a 60° C) conteniendo 42 mg de carbonato ácido de sodio en un matraz aforado de 200 mL y enrase. Almacene en un envase oscuro en refrigeración.

La solución del colorante se descompone con el tiempo por lo que periódicamente debe prepararse solución fresca.

---

<sup>1)</sup> El ácido ascórbico es determinado como ácido dehidroascórbico.

### 2.2.3 Solución patrón de ácido ascórbico (1 g/l)

Pese 50 mg de ácido ascórbico con precisión de alrededor de 0.1 mg, transfíralo cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y enrase con la solución de extracción preparada como en 2.2.1. Esta solución debe utilizarse en el día.

## 2.3 Aparatos

Aparatos usuales de laboratorio y:

2.3.1 Balanza analítica

2.3.2 Homogenizador de laboratorio.

2.3.3 Bureta de capacidad entre 10 y 50 mL.

## 2.4 Procedimiento

### 2.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Si es necesario remueva las semillas y las cavidades duras de las semillas y entonces mezcle bien la muestra. Filtre y tome el filtrado para la determinación.

Si el producto está congelado, déjelo descongelar en una vasija cerrada y adicione el líquido separado durante este proceso antes de homogeneizar la muestra.

### 2.4.2 Porción de ensayo

Pese entre 10 y 100 g de la muestra con precisión de 0.1 mg.

### 2.4.3 Determinación

#### 2.4.3.1 Extracción

Mezcle la porción de ensayo con la solución de extracción (ver 2.2.1) de tal forma que el volumen en mL de este último sea numéricamente de 1 a 5 veces la masa en g de la porción de ensayo. Filtre desechando los primeros mililitros.

La concentración de ácido ascórbico en esta solución de ensayo debe encontrarse entre 0.1 y 1 mg/mL.

#### 2.4.3.2 Valoración de la solución del colorante

Diluya una alícuota de 5 mL de la solución patrón de ácido ascórbico (ver 2.2.3) con 5 mL de la solución de extracción (ver 2.2.1). Valore rápidamente con la solución del colorante (ver 2.2.2) hasta que persista una solución con una coloración rosado salmón durante 5 segundos como mínimo. Repita el procedimiento dos veces más tomando las lecturas del volumen del colorante con precisión de 0.1 mL.

Corra un blanco paralelamente, reemplazando los 5 mL de la solución patrón de ácido ascórbico por 5 mL de la solución de extracción.

Reste el blanco del volumen de colorante gastado en las tres valoraciones.  
Promedie el resultado final y exprese la concentración del colorante como la masa en miligramos de ácido ascórbico equivalente a 1.0 mL de solución.

#### 2.4.3.3 Valoración

Tome tres alícuotas del filtrado obtenido en 2.4.3.1 de tal forma que contenga alrededor de 2 mg de ácido ascórbico y valore rápidamente con la solución del colorante hasta la aparición de un color rosado salmón que persista un mínimo de 5 seg. Para los cálculos (ver 2.5) use la media aritmética del volumen de solución del colorante.

#### 2.4.3.4 Prueba en blanco

Corra un blanco paralelamente procediendo como se especifica en 4.4.3.3 pero omitiendo la porción de ensayo.

#### 2.4.3.5 Número de determinaciones.

Lleve a cabo tres determinaciones en la porción de ensayo, tomadas desde la misma muestra de ensayo.

### 2.5 Expresión de los resultados

El contenido de ácido ascórbico expresado en miligramos por 100 g de producto se calcula por:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times m_1}{m_0} \times 100$$

donde:

$m_0$  es la masa en gramos de la porción de ensayo tomada en la alícuota para la valoración.

$m_1$  es la masa en mg de ácido ascórbico equivalente a 1.0 mL de la solución del colorante

$V_0$  es el volumen en mL de la solución del colorante empleado para la valoración.

$V_1$  es el volumen en mL de la solución del colorante usado en el blanco.

Como resultado se toma la media aritmética de las tres determinaciones.

### 2.6 Notas al procedimiento

Pueden existir algunas sustancias que interfieran en la valoración, tales como: hierro, cobre, estaño, agentes reductores, hidrosulfuros, sulfitos y dióxido de azufre. Los agentes reductores a los que se refiere esta nota son aquellos desarrollados por sobrecalentamiento o almacenamiento por largos periodos de tiempo.

Para detectarlos proceda como sigue:

Adicione dos gotas de azul de metileno 0.05% a 10 mL de solución que contenga igual volumen de solución de extracción. Mezcle. La desaparición del color azul en 5 a 10 segundos indica la presencia de interferencia.

**NOTA:** Para detectar el estaño u otra sustancia interferente se procede de la forma siguiente.

Adicione índigo carmín 0.05% a 10 mL de la solución de ensayo a la cual se le han adicionado 10 mL de ácido clorhídrico al 25%. Mezcle. La desaparición del color en 5 a 10 segundos indica la presencia de estaño u otra sustancia interferente.

### **3 Método B. Método espectrofotométrico con 2,6 diclorofenolindofenol después de la extracción con xileno**

#### **3.1 Principio**

El método se basa en la extracción del ácido ascórbico de la porción de ensayo usando una solución de ácido oxálico y una de ácido metafosfórico – ácido acético. Reducción cuantitativa del 2,6 diclorofenolindofenol por el ácido ascórbico, extracción del exceso de colorante con xileno y su determinación cuantitativa en un espectrofotómetro empleando una longitud de onda de 500 nm.

#### **3.2 Reactivos**

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida; el agua empleada será agua para análisis de acuerdo a la ISO 3696.

##### **3.2.1 Solución de extracción**

Ver 4.2.1

##### **3.2.2 Solución tampón de pH 4.0 acetato de sodio/ ácido acético**

Tomar 700 mL de agua y adicionar 300 g de acetato de sodio anhidro, agitar y añadir 1000 mL de ácido acético glacial.

##### **3.2.3 Solución del colorante 2,6 diclorofenolindofenol**

Proceda como se establece en 2.2.2.

##### **3.2.4 Solución patrón de ácido ascórbico (1g/l).**

Proceda como se establece en 2.2.3.



### 3.2.5 Xileno

**PRECAUCIÓN:** Debido a las propiedades narcóticas del xileno a altas concentraciones, todas las operaciones que involucran este reactivo deben llevarse a cabo en una campana de laboratorio.

Verifique la pureza del reactivo mediante el siguiente procedimiento:

Adicione ácido acético glacial a una pequeña cantidad de la solución del colorante Déjelo reposar hasta que la solución se decolore, y agite con 10 mL del xileno.

El xileno puede ser recuperado por destilación agitando con solución de sosa al 20% (m/m) para neutralizar el ácido acético.

### 3.3 Aparatos

Aparatos usuales de laboratorio y:

3.3.1 Balanza analítica.

3.3.2 Mezcladora.

3.3.3 Microburetas de capacidades 2, 5 y 10 mL

3.3.4 Tubos de centrifuga de capacidad 25 mL con protectores.

3.3.5 Centrifuga.

3.3.6 Espectrofotómetro, apropiado para hacer mediciones a 500 nm.

### 3.4 Procedimiento

#### 3.4.1 Preparación de la muestra de ensayo

Proceda como se establece en 2.4.1.

#### 3.4.2 Porción de ensayo

Proceda como se establece en 2.4.2

#### 3.4.3 Determinación

##### 3.4.3.1 Extracción

Proceda como se establece en 2.4.3.1 para obtener una solución de ensayo que contenga entre 0.05 y 0.5 mg de ácido ascórbico por mL.

### 3.4.3.2 Valoración del colorante

Proceda como se establece en 2.4.3.2.

### 3.4.3.3 Reducción

Transferir con una pipeta entre 1 y 5 mL de la solución de ensayo a un tubo de centrifuga (ver 3.3.4) y adicione igual volumen de la solución tampón (ver 3.3.2). Inmediatamente añada un exceso de la solución de colorante (ver 3.2.3); mezcle y adicione 10 mL de xileno (3.2.5). Tape el tubo y agite vigorosamente durante 6 a 10 s. Centrifugue para separar las fases. Remueva cuidadosamente la capa superior de xileno y pásela a una cubeta.

### 3.4.3.4 Medida espectrofotométrica

Mida la absorbancia del xileno a 500 nm.

### 3.4.4 Prueba en blanco

Mida la absorbancia del xileno (ver 3.2.5) a 500 nm.

### 3.4.5 Gráfico de calibración

Transfiera la misma cantidad de solución de extracción que fue usada en la determinación (ver 3.4.3.3) a cuatro tubos de centrifuga (ver 3.3.4). Añadir a cada uno la misma cantidad de solución tampón y añada respectivamente 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mL de la solución de colorante (3.2.3). Proceda como se especifica en 3.4.3.3.

Grafique la absorbancia como una función del volumen de colorante añadido.

### 3.4.6 Número de determinaciones

Lleve a cabo dos determinaciones de la misma muestra de ensayo.

## 3.5 Expresión de los resultados

El contenido de ácido ascórbico expresado en mg por 100 g de producto se calcula por la siguiente expresión:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times m_1}{m_0} \times 100$$

donde:

$m_0$  es la masa en gramos tomada en la alícuota de la porción de ensayo.

$m_1$  es la masa en miligramos del ácido ascórbico equivalente a 1.0 mL de la solución del colorante

$V_0$  es el volumen en mililitros de la solución de colorante añadida en 5.4.3.3

$V_1$  es el volumen en mililitros del exceso de colorante correspondiente a la absorbancia medida en 3.4.3.4, y leída en el gráfico de calibración

### 3.6 Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones (ver 3.4.6) llevadas a cabo en rápida sucesión por el mismo analista sobre la misma porción de ensayo, no debe exceder un 3% de la media.

### 3.7 Notas al procedimiento

**3.7.1** Si el producto contiene pigmentos de posible extracción con xileno, lleve a cabo una corrección del blanco con hidroquinona como sigue:

Después de medir la absorbancia de la capa de xileno (ver 3.4.3.4) añada dos gotas de una solución semisaturada de hidroquinona (esta se prepara añadiendo dos veces el volumen de acetona requerido para preparar una solución saturada de hidroquinona), mezcle, deje reposar 30 s y mida la absorbancia nuevamente. Reste esta absorbancia de la inicial medida a la capa de xileno.

**3.7.2** Si el producto ha sido sobrecalentado o almacenado por un período largo de tiempo o en algunos productos naturales (tales como el jugo *blackcurrant*) debe hacerse un tratamiento con formaldehído para corregir la presencia de sustancias reductoras no relacionadas con el ácido ascórbico, para ello lleve a cabo un control en paralelo con la determinación procediendo como se especifica en 3.4 hasta la adición del colorante. Antes de la adición añada 1 mL de agua a la porción de ensayo y 1 mL de solución al 40% de formaldehído a la solución de control. Deje reposar por 10 min. y proceda a la determinación.

Determine el volumen de colorante consumidos por la interferencia de acuerdo al gráfico de calibración, y corrija el resultado.

## 6 Informe de ensayo

El informe de ensayo debe mostrar el método usado y el valor obtenido. Debe mencionar también cualquier detalle en la operación que no esté especificado en esta norma, o considerada como opcional, junto con los detalles de cualquier incidente que pudiese influir en los resultados.

El informe de ensayo debe incluir toda la información necesaria para una completa identificación de la muestra.