


# Desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (hplc), para la determinación y cuantificación de vitamina C, ácido cítrico y ácido láctico en jarabe

Palacios Sánchez María de Jesús\*, Orozco Guareño Eulogio, Badillo Camacho Jessica

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Departamento de Química. Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Olímpica, Guadalajara, Jalisco. C.P. 44430. México.

\*Autor para correspondencia: maria.palacios1333@academicos.udg.mx

ORCID : 0000-0002-8034-8335

## Recibido:

18/mayo/2022

## Aceptado:

30/diciembre/2022

## Palabras clave:

Acido,  
jarabes,  
HPLC

## Keywords:

Acid,  
Srupes,  
HPLC

## RESUMEN

El ácido ascórbico, el ácido cítrico y el ácido láctico se usan en diferentes proporciones en diferentes alimentos. Estos compuestos se encuentran presentes en jarabes medicinales. En este trabajo fue desarrollado un método analítico encromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la determinación y cuantificación de los ácidos antes mencionados. Se utilizó una fase reversa, en un equipo Agilent 1220 con una columna C18. Se determinaron las condiciones óptimas para la extracción, identificación y cuantificación los ácidos. Una vez determinados los tiempos de retención y las condiciones, fueron analizadas dos muestras de jarabes. en una mezcla de los tres ácidos, donde se pudo observar que el ácido ascórbico es el que cuenta con mayor concentración en ambas muestras de jarabe, mientras que, por otro lado, en los estándares, el ácido con mayor concentración fue el láctico.

## ABSTRACT

Ascorbic acid, citric acid, and lactic acid are used in different proportions in different foods. These compounds are present in medicinal syrups. In this work, a high-performance liquid chromatography (HPLC) analytical method was developed for the determination and quantification of the aforementioned acids. A reverse phase was used, in an Agilent 1220 equipment with a C18 column. The optimal conditions for the extraction, identification and quantification of the acids were determined. Once the retention times and conditions were determined, two syrup samples were analyzed. in a mixture of the three acids, where it was observed that ascorbic acid is the one with the highest concentration in both syrup samples, while, on the other hand, in the standards, the acid with the highest concentration was lactic acid.

## Introducción

Los jarabes son vehículos ampliamente utilizados apropiados para principios activos hidrosolubles. Es una preparación acuosa de uso oral, caracterizado por un sabor dulce y consistencia viscosa, y puede contener sacarosa a una concentración de al menos 45% p/p y algunos ácidos orgánicos. Su sabor dulce se puede obtener utilizando polioles o agentes edulcorantes, también contiene agentes aromatizantes o tensoactivos (García et al., 2019).

### Ácido cítrico

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3 propano tricarbóxico) es un ácido orgánico que puede ser considerado natural, también puede ser sintetizado vía laboratorio por fermentación con *Aspergillus niger*. Es considerado un ácido carboxílico versátil y ampliamente utilizado en el campo de la alimentación de los productos farmacéuticos como refrescante y acidulante entre otros. Físicamente es un polvo cristalino blanco que puede presentarse de manera anhidra o monohidrato (Ramesh y Kalaiselvam, 2011).

### Ácido ascórbico

El ácido ascórbico ((5R) - [(1S) -1,2-dihidroxietil] -3,4-dihidroxifuran-2 (5H) -ona) conocido como vitamina C, es una vitamina que se puede obtener de forma natural o por síntesis química a partir de la glucosa. Es un poderoso agente antioxidante y tiene una reacción esencial del sistema inmunológico. En la industria farmacéutica es ingrediente en suplementos dietéticos, formulaciones tóxicas y la mejora de actividades de crecimiento y salud. (<https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspañol.pdf>)

### Ácido láctico

El ácido láctico (2-hidroxi-propanoico) es un líquido siruposo, incoloro, ligeramente amarillento, inodoro o con ligero olor no desagradable. Se utiliza como acidulante, neutralizante de pH, inhibidor bacteriano y como agente emulsionante. (Cerna y Rodríguez, 2005)

### Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil que actúa como portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil, los componentes de esta solución migran de acuerdo a las interacciones no covalentes de los

compuestos con la columna, estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. Esta técnica está indicada para la separación de los compuestos orgánicos semivolátiles. (Miranda y Martín, 2013).

Si bien es cierto que, para realizar una cromatografía líquida, tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficiencia, requiere de la utilización de dispositivos, los componentes básicos son:

- » Bomba.
- » Dispositivo de mezclado de eluyentes.
- » Dispositivo de inyección.
- » Conducciones y conexiones.
- » Detector y registrador.
- » Columna.

El HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos poli funcionales de alto peso molecular. Ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. (Ozores, 2016)

Las técnicas utilizadas para determinar la vitamina C y el contenido de ácidos orgánicos incluyen métodos volumétricos, enzimáticos, colorimétricos, espectrofotometría, microfluorimétricos, polarográficos y cromatográficos, siendo éstos últimos los que más se utilizan actualmente. (Romero et al., 2019)

La separación de ácidos orgánicos con cromatografía líquida de alta eficiencia y sus determinaciones cuantitativas son extremadamente difíciles porque no hay diferencia entre sus similitudes estructurales y características espectrales.

Además, los valores de pKa de la mayoría de los ácidos orgánicos son bastante similares y esta situación limita el uso del pH para la separación cromatográfica. (Nour et al., 2010)

El presente estudio se realizó en base a una muestra de jarabe con la finalidad de lograr el desarrollo de un método analítico por medio del HPLC para la determinación y cuantificación de los ácidos orgánicos contenidos en él, en este caso, el ácido cítrico, láctico y ascórbico en una muestra "x" de jarabe.

## Metodología

### Preparación de los estándares

Se preparó una solución de cada ácido y cada uno se llevó a un volumen de 10 mL. De ácido cítrico se pesaron 19.34 mg, de ácido ascórbico se pesaron 10.30 mg y de ácido láctico se pesaron 35.78 mg. Posteriormente se preparó una mezcla de los 3 ácidos llevándolo a un volumen de 10 ml.

### Preparación de las muestras:

Se utilizaron dos muestras de jarabe desconocido llamándolas 1C y 2D (con distintas concentraciones de los ácidos), se pesaron 5 g de cada muestra, se colocaron en un matraz volumétrico de 50 ml y se aforaron con agua grado tipo 1.

### Condiciones del equipo.

Se utilizó una fase reversa, en un equipo Agilent 1220 con una columna C18 (5 µm x 4.5 mm x 15 cm). El detector se estableció a una λ: 254nm para el ácido ascórbico y λ: 214nm para el ácido cítrico y láctico.

La determinación fue realizada en condiciones isocráticas a una temperatura de 25°C, usando una fase móvil de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ajustando el pH a 2.8 con ácido fosfórico (A), y acetonitrilo (B) en una proporción (A)95: (B)5 con un flujo de 0.7ml/min para todas las separaciones cromatográficas. El volumen de inyección fue de 5µL en un tiempo de corrida de 5 min, tanto para los estándares como para las muestras, e inyectando por triplicado cada uno.

## Resultados y discusión

Inicialmente se analizaron los tres estándares de los ácidos por separado para demostrar que el método es capaz de detectar cada uno de ellos, posteriormente se inyectó una solución que contenía la mezcla de los tres ácidos, para comprobar que las señales no se interponían entre ellas (figura 1 y figura 2).

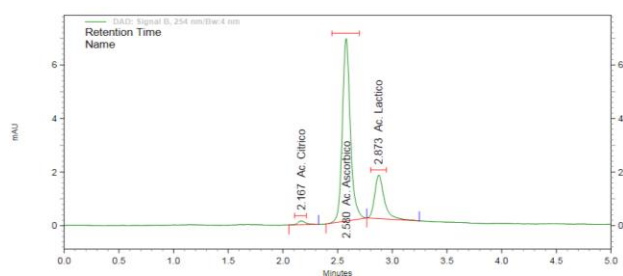


Figura 1. Cromatograma de mezcla de ácidos a 254nm.

Tabla 1. Resultados cromatográficos en 254nm.

Tiempo de retención	Área	Porcentaje de área (%)	Altura de pico
2.167	1445	1.52	298
2.580	72992	76.62	14279
2.873	20834	21.87	3405
Total	95271	100	17982

En la tabla anterior se puede observar el tiempo de retención de cada uno de los ácidos, así como el área bajo la curva, altura y porcentaje de área en una longitud de onda de 254nm.

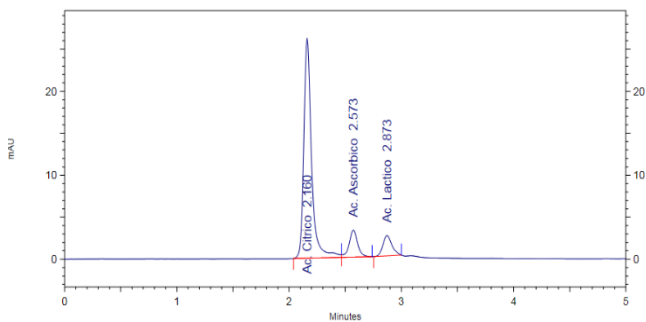


Figura 2. Cromatograma de mezcla de ácidos a 214nm.

La tabla 2 muestra los resultados cromatográficos obtenidos de la mezcla de los ácidos en una longitud de onda de 214nm.

Tabla 2. Resultados cromatográficos en 214nm.

Tiempo de retención	Área	Porcentaje de área (%)	Altura de pico
2.167	192882	79.76	39319
2.580	20595	8.52	4312
2.873	28364	11.73	4839
Total	241841	100	48470

Se obtuvo un tiempo de retención para vitamina C (ácido ascórbico) de 2.600 min, a una longitud de onda de 254nm, el estándar analizado se preparó a una concentración de 1030 ppm con respecto al estándar, con un área bajo la curva de 82,324 como se puede observar en la figura 3.

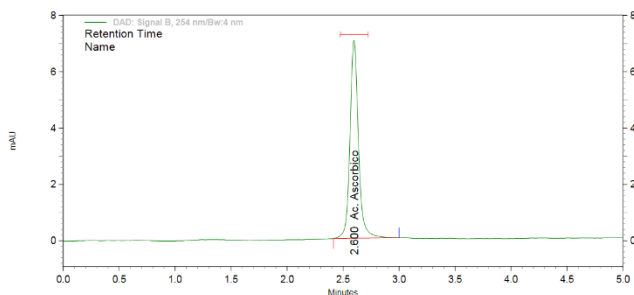


Figura 3. Cromatograma de ácido ascórbico.

Para el ácido cítrico y ácido láctico se observaron los dos picos en una longitud de onda de 214nm, presentando tiempos de retención de 2.1 para el caso del ácido cítrico (Figura 4) y 2.8 para el ácido láctico (Figura 5).

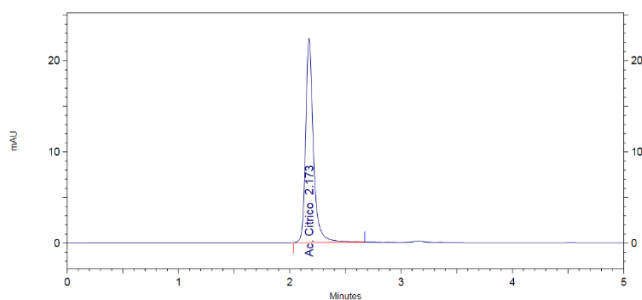


Figura 4. Cromatograma de ácido cítrico.

El estándar del ácido cítrico obtuvo un área bajo la curva de 227493 de una concentración de 1,934 ppm, con una altura de pico de 46967.

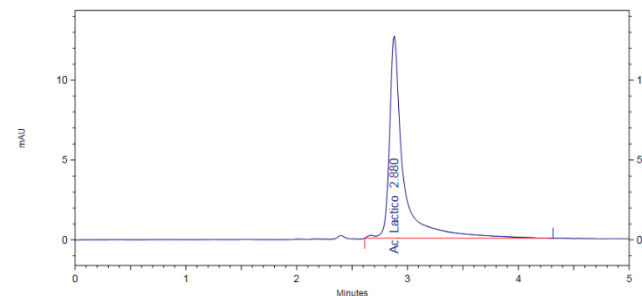


Figura 5. Cromatograma de ácido láctico

El estándar del ácido láctico en una concentración de 3,578 ppm, obtuvo un área bajo la curva de 231877 de con una altura de pico de 26548.

Se analizaron dos muestras de jarabe, las cuales se nombraron como muestra 1C y 2D. En la figura 6 se puede observar el cromatograma del ácido cítrico y láctico, en la muestra 1C, el ácido cítrico cuenta con un tiempo de retención de 2.167 min con un área bajo la curva de 3,643 y una concentración de 29.159 ppm, mientras que el ácido láctico cuenta con un tiempo de retención de 2.953 min con un área bajo la curva de 20,422 y una concentración de 315.123 ppm, dichas concentraciones se promediaron de las tres inyecciones del equipo y fueron calculadas con respecto al estándar.

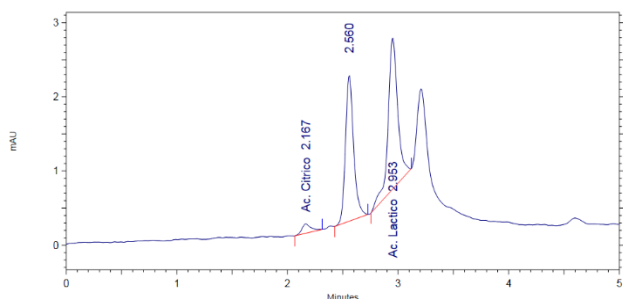


Figura 6. Cromatograma de la muestra 1C a 214nm.

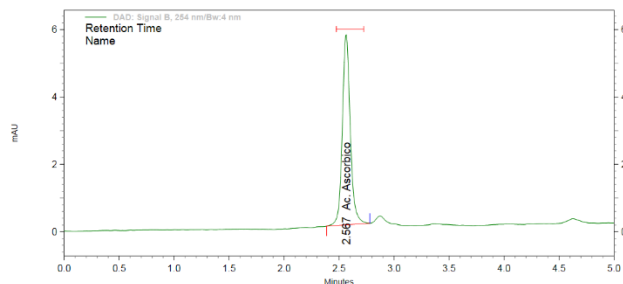


Figura 7. Cromatograma de la muestra 1C a 254nm.

En la figura 7, se encuentra el pico del ácido ascórbico, de muestra 1C, la cual cuenta con un tiempo de retención de 2.567 min, con un área bajo la curva de 79,497 en una concentración de 994.629 ppm con respecto al estándar.

Para la muestra 2D, En la figura 8 se puede observar el cromatograma del ácido cítrico y láctico de dicha muestra, el ácido cítrico cuenta con un tiempo de retención de 2.167 min, con un área bajo la curva de 1,478 y una concentración de 12.565 ppm, mientras que el ácido láctico cuenta con un tiempo de retención de 2.953 min con un área bajo la curva de 27,283 y una concentración de 398.186 ppm ambas concentraciones se con respecto a los estándares.

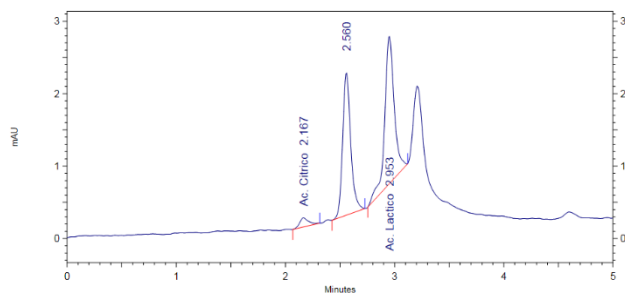


Figura 8. Cromatograma de la muestra 2D a 214nm

En la figura 9, se encuentra el pico del ácido ascórbico, en la muestra 2D, que cuenta con un tiempo de retención de 2.560 min, con un área bajo la curva de 72,200 y una concentración de 903.333 ppm.

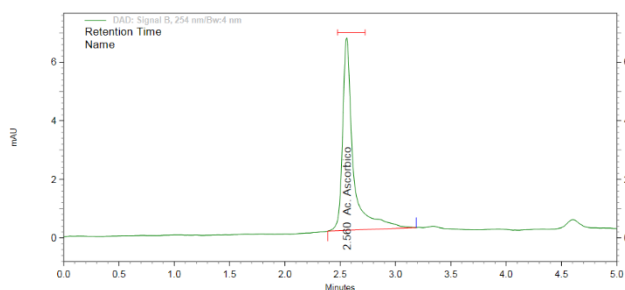


Figura 9. Cromatograma de la muestra 2D a 254nm

### Conclusiones

El presente trabajo es una contribución al desarrollo de un método analítico en HPLC para la determinación y cuantificación de tres de los ácidos orgánicos en un jarabe. Considerando la facilidad de la preparación de la muestra, así como los estándares, el método analítico podría considerarse como rápido y eficiente para la determinación de los ácidos ya mencionados anteriormente, ya que minimiza el tiempo de la determinación, cumpliendo cada uno de los objetivos planteados, en donde se pudo observar que el ácido ascórbico es el que cuenta con mayor concentración en ambas muestras de jarabe, mientras que, por otro lado, en los estándares, el ácido con mayor concentración fue el láctico. Con este desarrollo se espera validar el método

analítico y así se pueda utilizar para la determinación de los tres ácidos en el control de calidad de los jarabes.

### Referencias

Cerna C., Rodríguez de Stouvenel., (2005). "Producción biotecnológica del ácido láctico. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos.

García P., Cañete R., Vila C., Dávila P., (2019). "Vehículos en formulaciones orales líquidas para pacientes pediátricos". Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria.

<https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspañol.pdf>

Miranda A., Martin O., (2013). Cromatografía líquida (HPLC). UCM.

Nour Violeta, Trandafir Ion, Mira Elena Ionica1. (2010). HPLC OrganicAcidAnalysis in Different Citrus JuicesunderReversedPhaseConditions. NotulaeBotanicaeHortiAgrobotanici Cluj-Napoca.

Ozores Belmonte. (2016). Cromatografía de líquidos HPLC. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA.

Ramesh T.; Kalaiselvam M. (2011) "An Experimental StudyonCitricAcidProductionby Aspergillus nigerUsingGelidiella acerosa as a Substrate" en Indian Journal of Microbiology, 51, 289-293.

Romero Rodriguez, Vazquez Oderiz, Lopez Hernandez, Simal Lozano. (2019). Determination of Vitamin C and OrganicAcids in VariousFruitsby HPLC. de Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia.