

UTILIDAD DEL TEST

El ácido ascórbico (vitamina C) es un potente antioxidante que se utiliza durante el proceso de fabricación para eliminar rápidamente cualquier presencia de O₂ disuelto que podría oxidar compuestos fenólicos, especialmente los derivados del ácido cinámico, resultando en un oscurecimiento del vino. El ácido ascórbico convierte de forma muy eficiente dicho oxígeno en peróxido de hidrógeno que posteriormente es neutralizado por el SO₂ presente en el vino (se recomienda que el vino contenga entre 30 y 50 mg/L de SO₂ antes de la adición de ascórbico para ser eficaz en la eliminación del peróxido de hidrógeno formado). También evita la oxidación de los iones hierro como prevención de la quiebra férrica. Un exceso de ascórbico puede afectar negativamente al color del vino y su evolución posterior.

MÉTODO

En medio ácido, el ascórbico (y otros agentes reductores) reacciona con la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazoli-2)-2,5-difeniltetrazolio) produciendo un complejo coloreado cuya concentración es proporcional a la concentración de los mismos. Para diferenciar entre ascórbico y el resto de otros complejos, el resultado (RT) se compara con el que se obtiene de una muestra en la que se ha eliminado completamente el ascórbico mediante la acción específica de la ascorbato oxidasa (RB). La diferencia de absorbancia a 578 nm entre los dos métodos corresponde a la concentración de ácido ascórbico

CONTENIDO

R1	1 x 30 mL	Tampón pH 7.0
R2	1 x 25 mL	Tampón pH 7.0
R3	1 x 5 mL	Ascorbato oxidasa
R4	1 x 8 mL	MTT, PMS
ASC	1 x tubo	Ácido ascórbico

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

RB: Añadir el vial R3 al vial marcado como R2. Esta mezcla es estable un mes a 2-8 °C evitando la contaminación.

Los reactivos R1 y R4 están listos para el uso. R4 es muy sensible a la luz. Manténgalo alejado de fuentes de luz directas.

ASC: Pese una cantidad exacta de ascórbico (150 mg) y disuélvala en 100 mL de agua destilada. Esta solución es estable 8 horas a 2-8 °C o una semana congelada a -20 °C. Consérvese bien tapada y protegida de la luz. Diluya esta solución 1/5 para ser usada como calibrador. **El uso de calibrador no es necesario si se trabaja con modo de calibración con factor.**

MUESTRAS

Las muestras deben estar libres de turbidez y partículas. Centrifugar o filtrar en caso necesario. La presencia de CO₂ introduce inestabilidad en la medida. Muestras que contengan CO₂ se deben desgasificar previamente. Muestras con concentración superior al rango de medida deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar el resultado final por el factor de dilución.

PROCEDIMIENTO

Trate calibradores, controles y muestras como 'Muestra'. Utilice agua destilada como 'Blanco'. Una vez establecido el factor de calibración dicho factor puede utilizarse en análisis posteriores sin necesidad de recalibrar. El factor de calibración depende del paso de luz y longitud de onda utilizada.

Los volúmenes referidos pueden ajustarse a otros procedimientos analíticos. La funcionalidad esperada puede variar si se utilizan razones S:RB/R1:R4 diferentes.

Utilizar el reactivo RB preparado para la reacción de blanco y R1 para la reacción muestra como reactivos 1, respectivamente y R4 como Reactivo 2. Pipetear según el esquema:

	Reac. Blanco (RB)		Reac. Muestra (RS)	
	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra
Reactivo 1/RB	1000 µL	1000 µL	--	--
Reactivo 1/R1	--	--	1000 µL	1000 µL
Agua destilada	50 µL	--	50 µL	--
Muestra/Std	--	50 µL	--	50 µL

Mezclar e incubar durante 1 minuto a 37 °C. Leer la absorbancia a 578 nm (A₁). Después añadir a la cubeta:

	Reac. Blanco	Reac. Muestra
Reactivo 2	150 µL	150 µL

Mezclar e incubar durante 5 minutos a 37 °C. Leer la absorbancia a 578 nm (A₂).

La concentración de ascórbico viene determinada como

$$T_{RB} = \frac{(A_2 - 0.87xA_1)_{\text{sample}} - (A_2 - 0.87xA_1)_{\text{blank}}}{(A_2 - 0.87xA_1)_{\text{standard}} - (A_2 - 0.87xA_1)_{\text{blank}}} \times C \text{ mg/L}$$

$$T_{RS} = \frac{(A_2 - 0.87xA_1)_{\text{sample}} - (A_2 - 0.87xA_1)_{\text{blank}}}{(A_2 - 0.87xA_1)_{\text{standard}} - (A_2 - 0.87xA_1)_{\text{blank}}} \times C \text{ mg/L}$$

$$\text{Ascorbic} = (T_{RB} - T_{RT}) \text{ mg/L}$$

El factor 0.87 se usa para corregir la absorbancia por la dilución tras añadir R2.

APLICACIÓN PARA ANALIZADORES DIONYSOS®

Modelo Dionysos	150	240	150	240
Nombre	ASCORB-RB		ASCORB-RT	
Método	Punto Final A		Punto Final A	
Dirección	Creciente		Creciente	
Onda Principal	578		578	
Onda Secundaria	--		--	
Muestra	10		10	
Reactivo 1	200		200	
Reactivo 2	30		30	
Calibración	Factor*		Lineal/Factor*	
Ciclo Blanco [150 240]	3 - 4	3 - 4	3 - 4	3 - 4
Ciclo Lectura [150 240]	20 - 21	28 - 29	20 - 21	28 - 29
Unidades	mg/L		mg/L	
Decimales	0		0	
Rango medida	0 ~ 300		2 ~ 300	
R1 Lim. Abs	5000		5000	
Ratio Dil. Auto.	--		--	
Vol. Muestra Dil. Auto	--		--	

*En caso de no realizar calibración, usar Factor = 270 (Dio150) o Factor=300 (Dio240), para RB y RT. El factor real obtenido por calibración puede diferir ligeramente de este valor en función del instrumento y lote de reactivos utilizado.

Utilizar la opción de métodos calculados para ASCORBICO como:
 [ASCORBICO] = [ASCORB-RT]-[ASCORB-RB]

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Límite de Cuantificación (LoQ): 0,5 g/L

Límite de Linealidad: 300 g/L

NOTAS

El O₂ en muestras o reactivos reacciona rápidamente con el ascórbico, interfiriendo con el análisis. Evite la agitación vigorosa de muestras y reactivos.

