

Eljárás C-vitamin tartalom meghatározására az oszazonok papírkromatográfiás elválasztása útján

III. A dehidroaszcorbinsav-oszazon állandósága és izomerizációja savanyú közegben

SZOTYORI KATALIN

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

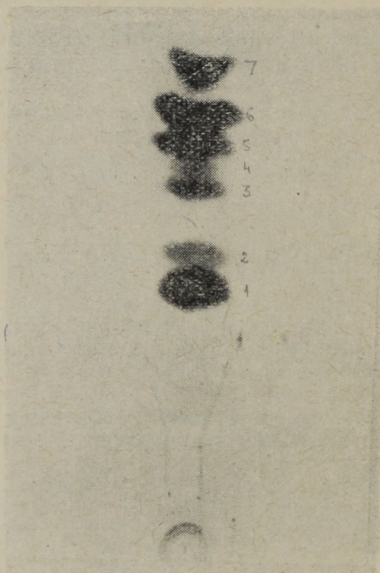
Előző közleményemben (1) a hőkezelt növényi anyagok C-vitamin tartalmának meghatározására alkalmas módszert ismertettem, amely az oszazonok papírkromatográfiás elválasztásán alapszik. Kiegészítésképpen vizsgáltam az összehasonlítként használt tiszta aszkorbinsavból oxidáció után előállított oszazon állandóságát az alkalmazott oldószerben. A kérdés tanulmányozását két szempontból tartottam fontosnak. Egyfelől meg akartam határozni azt az időtartamot, amely alatt az összehasonlító oldatban bomlási jelenségek még nem lépnek fel. Másfelől vizsgálni kívántam a dehidroaszcorbinsav oszazonjával azonos színű oszazont képező 2-3-diketogulonsav megjelenésének és elválasztásának lehetőségeit.

A kérdés fontosságára *Mapson* (2), majd *Patschky* (3), később *Drevon* (4) vizsgálatai is felhívják a figyelmet, mivel az említett szerzőknek természetes anyagok kivonatából, illetve aszkorbinsav oldatból oxidálás és hőbehatás után két teljesen azonos lazac színű oszazont sikerült izolálni, amelyeknek megjelenését az aszkorbinsav zárt és nyílt láncú formájával magyaráznak. *Ohle* és munkatársai (5) szerint ugyanis enyhén savanyú közegben a zárt lakton és a nyílt láncú 2-3-diketogulonsav forma között egyensúlyi állapot alakul ki és a dinitrofenilhidrazinnal történő reakció után a fényelnyelés mérése alapján ezek összegét határozzuk meg. Az említett szerzők megfigyelései és az általam kidolgozott eljárás alapján felvetődik annak lehetősége, hogy kromatográfiás úton az aszkorbinsav, ill. a dehidroaszcorbinsav a nem antiskorbutoz hatású diketogulonsavtól elválasztható és így a módszer specifikussága teljes mértékben igazoltnak tekinthető, mivel eddigi tudásunk szerint egyedül a diketogulonsav ad a dehidroaszcorbinsavéval teljesen azonos színű oszazont.

Kísérleteim szerint a dehidroaszcorbinsav-oszazon etilacetátos oldatából néhány hétig tartó tárolás után papírkromatográfiával, az említett szerzőktől eltérően, nem két, hanem négy azonos – lazac – színű oszazon választható el kloroform-klórbenzol-etilacetát 50 : 25 : 25 arányú elegyével. A négy oszazon papírkromatográfiával 0,90; 0,70; 0,35 és 0,15 R_f értékekkel igen jól szétválik. Megfigyelésem szerint az izomerek frissen készített savmentesre mosott oszazon etilacetátos oldatában soha nem jelennek meg, ezért összefüggést próbáltam keresni az oszazonok megjelenése és az oldat savkoncentrációja között.

A savtartalmú oldatokat Stahl-féle (G jelzésű) szilikagélből készített vékony rétegen kromatografáltam, mivel a felvitelnél a bekoncentráldott sav a szűrőpapírt elroncsolta és így a szétválasztás nem volt megfelelő. Az alkalmazott futtatószer petroléter-etilacetát 60 : 40 arányú elegye volt. Etilacetátos oldatból ecetsavval történő savanyítás és több napos állás után 7 azonos színű, feltehetőleg izomer vegyületet sikerült szétválasztanom (1. ábra). Megjegyzendő, hogy

ugyanazon izomerek kénsav jelenlétében is megjelentek, mivel azonban az ecetsav az oldószerül használt etilacetáttal jól elegyedik és így a savkoncentráció tetszés szerint növelhető, a továbbiakban ezzel végeztem a savanyítást.



1. ábra

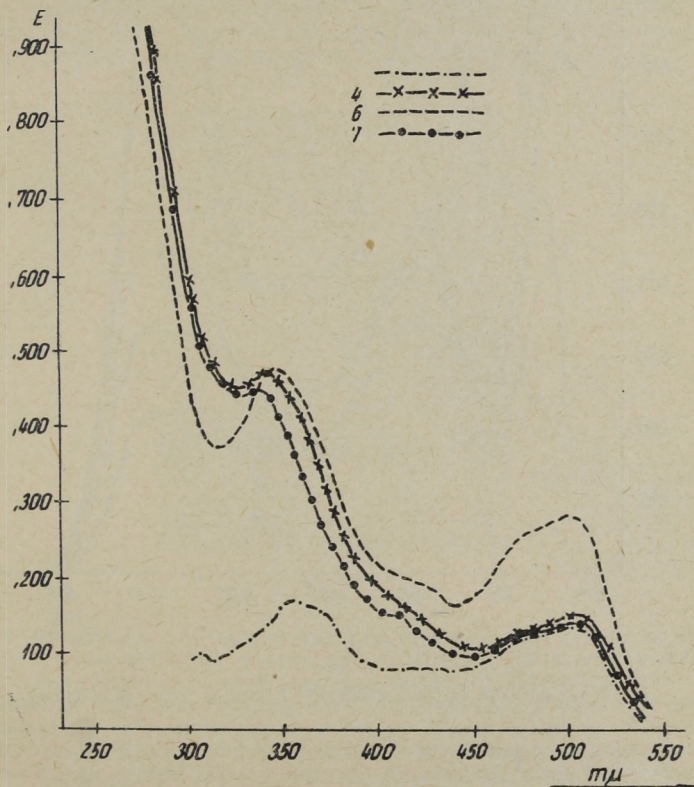
Szilikagélen elválasztott dehidroaszorbinsavoszazon izomerek
Futtatószer: heptan: etilacetát 60 : 40

A szétváló vegyületeket a startvonalától kiindulva 1–7 sorszámmal jelöltem. A starttól számított 2. folt narancs színű, a többi azonos lazac színű. Vastagabb rétegű (kb. 1 mm-es) szilikagélen az 1., 2., 4., 6. és 7. számmal jelölt vegyületeket sikerült olyan mennyiségben elválasztanom, hogy extinkciós görbéjüket a látható és az ultraibolya fényben megvizsgálhattam. A 3. és 5. számú anyagból olyan kis mennyiségek váltak el, hogy ezeknek tulajdonságaival eddig nem volt módomban behatóbban foglalkozni. Mivel a vegyületek apoláros oldószerben nem oldódnak, elnyelési görbéiket etilacetátban és ecetsavban vettem fel.

A 2. és 3. ábra extinkciós görbéinek alakján látható, hogy a vizsgált vegyületek szerkezete közel azonos, mivel teljesen azonos hullámhossznál adnak elnyelési maximumokat. Valószínűleg szerkezeti izomerek megjelenéséről van szó. A főbb maximumok a látható hullámhosszon 495 m μ -nál és ultraibolyában 345, 275, illetve 265 m μ -nál jelennek meg. Ezek a görbék – az oldószer hatásának következtében ugyan kissé a rövidebb hullámhossz felé eltolódva – de lényegében megegyeznek az irodalomból (6) ismert, a kénsavas és ecetsavas közegben felvett oszazon görbéekkel.

A spektroszkópiai elemzéseknél használatos módszerrel a főbb maximumok egymáshoz való arányát, valamint a látható hullámhosszon mért maximális és

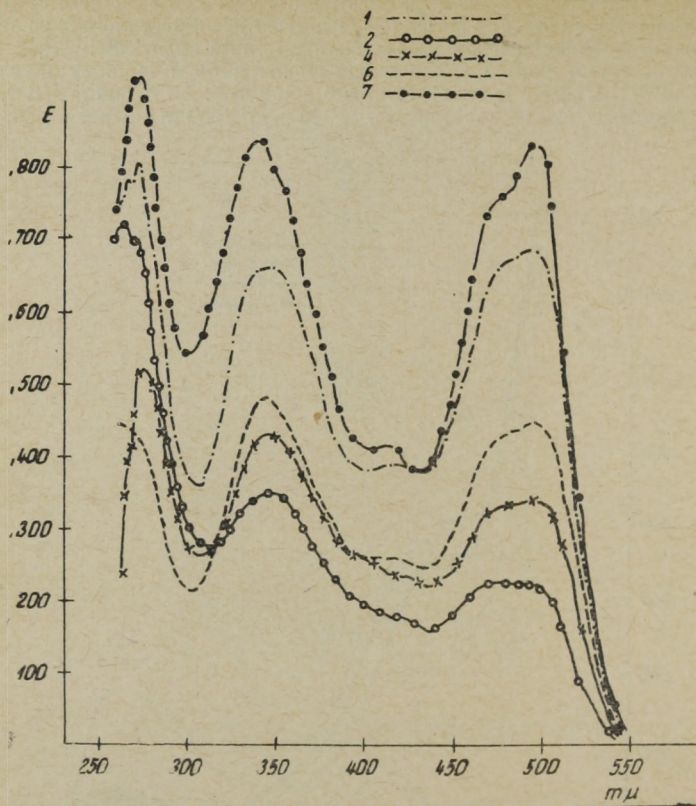
minimális elnyelés arányát is megvizsgáltam. A vegyületek szerkezetében található kismértékű eltérésre és feltehetőleg izomerek jelenlétére utalnak az abszorpciós maximumok egymáshoz való arányában mutatkozó különbségek is. Az 1. táblázat adatai alapján a 2-es számú izomer görbéje és ennek megfelelően valószínűleg szerkezete is tér el leginkább a többitől. Az E 500 m μ /E 430 m μ értéke ennél a legalacsonyabb, míg az E 345 m μ /E 500 m μ ennél a legnagyobb értékű.



2. ábra

A dehidroaszorbinsav-oszazon izomerek extinkciós görbéi
50%-os ecetsavban

A 2. sz. izomer szerkezetében várható nagyobb eltérés hatása a vegyület színében és kémiai viselkedésében is megfigyelhető. Narancssárga színe néhány napos szobahőmérsékleten történő állás alatt a többihez hasonló élénk lazacszínűvé válik. Ez az átalakulás valószínűleg oxidatív jellegű, savgőzök hatására nem gyorsul meg. E feltevést alátámasztja az a megfigyelés, hogy a nitrogén atmoszférában az átalakulás több napos állás után sem következik be.



3. ábra

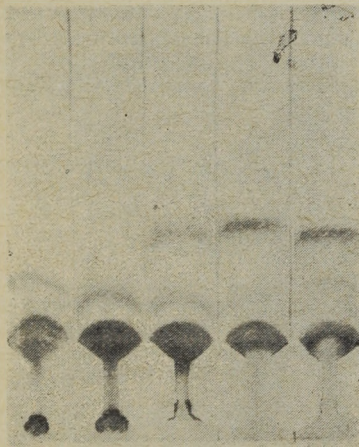
1–50%-ig növekvő ecetsavkoncentráció hatása az izomerek alakulására

1. táblázat

Dehidroaszorbinsav-oszazon izomerek főbb jellemzői

Izomerek		E 500 m μ / E 430 m μ	E 345 m μ / E 500 m μ
jele	színe		
I.	lazac	1,79	0,99
II.	narancs	1,31	1,67
IV.	lazac	1,50	1,28
VI.	lazac	1,81	1,12
VII.	lazac	2,20	1,00

A szerkezetben levő nagyobb mértékű eltérésre utal továbbá az a megfigyelés is, hogy piridinnel történő befűvés után valamennyi folt barnás színűvé válik, a 2. sz. izomer azonban megkékül. Ez a kék színeződés savnyomoktól mentes, alaposan kimosott oldatból történő futtatás esetén is fellép, jelezve, hogy ennek az izomernek jóval alacsonyabb az átcsapási pH-ja mint a többié. Levegőn való állás és lazac színűvé való átalakulás után a 2. sz. izomer piridin hatására nem kékül meg, hanem a többihez hasonlóan barnává válik. A piridin elpárolgása után valamennyi folt ismét lazac színű lesz, amely jelenség a lúg hatására bekövetkező proton átrendeződésnek és spontán visszaalakulásnak tulajdonítható. Ez az izomer lúgra történő megkékülése alapján valószínűleg azonos a Herman (7) által kimutatott oxidációs termék oszazonjával.



4. ábra

Megfigyeléseim szerint az izomerek megjelenése az oldat savkoncentrációjától függ. Frissen előállított oszazon savmentes oldatából kromatografálásakor mindig csak egyetlen folt jelenik meg az 1. számmal jelölt helyen akár 3 óráig 37 C° hőmérsékleten, akár 10 percig 100 C°-on megy végbe a reakció. A többször átkristályosított oszazon oldatában is megjelennek azonban az izomerek, ha hosszabb ideig etilacetátos oldatban tartjuk, valószínűleg az etilacetát bomlása következtében megjelenő ecetsav hatására. Az izomerek megjelenését sav jelenléte meggyorsítja és az átalakulási termékek között kialakuló egyensúlyt meghatározott irányban eltolja.

Ecetsav jelenlétében vizsgáltam az izomerek megjelenését, 1-ről fokozatosan 50%-ra növelve a sav koncentrációját. A 4. ábrán látható, hogy a sav mennyiségének növekedésével az 1. és 2. számú izomer mennyisége fokozatosan csökken, ezzel szemben a 4., 6. és 7. számúaké növekszik. Kis savkoncentrációknál (20%-ig) csak 4 izomer mutatható ki, 33%-nál megjelenik az 5. és 6. számú, 50%-nál pedig a 7. számú izomer is kimutatható néhány hetes állási idő után. Az átalakulási reakció hő hatására meggyorsul, a hőmérséklet emelése azonban főleg nagyobb savkoncentráció mellett – a kisebb R_f értékű izomerek teljes eltűnéséhez vezet.

Az izomerek keletkezési feltételeinek tanulmányozása alapján lehetőség nyílik arra, hogy infravörös vagy tömegspektroszkópiai vizsgálatok alapján az egyes vegyületek pontosabb szerkezete megállapítható legyen. A kérdés tisztázása szerkezetkutató szempontból érdeklődésre tarthat számot, mivel az irodalomból eddig csak két izomer ismeretes, bár elvben igen nagyszámú sztereoizomer kialakulásának lehetősége áll fenn. Mivel azonban ezeket ezideig nem sikerült szétválasztani, az a feltevés alakult ki, hogy a számos, elméletileg lehetséges izomer közül csak az eddig elválasztott két – a nyílt és zárt láncú – forma stabil.

Az izomerek megjelenési körülményeinek tisztázása a C-vitamin analitikájának szempontjából szintén jelentős, mert az irodalomban leszögezett állásponttal szemben sikerült bebizonyítanom, hogy természetes anyagokban csak egyetlen vegyület, a dehidroaszorbinsav adja a lazac színű oszazont. A reakció elegyből kimutatott második hasonló színű és eddig a 2-3-diketogulonsavnak tulajdonított vegyület az analízisre felhasznált oldat helytelen kezelése, illetve savnyomok hatására a vizsgálat folyamán keletkezhet, mint a dehidroaszorbinsav oszazon átalakulási terméke és nem valamely aszorbinsav-izomer oszazonja.

I R O D A L O M

- (1) Szotyori K.: ÉVIKE, 13, 148 és 209, 1967.
- (2) Mapson L. W.: Biochem J., 80, 459, 1961.
- (3) Patschy A.: Z. Angew. Chem., 62, 50, 1952.
- (4) Drevon, B., C. Nofre, A. Cier: C. R. Akad. Sc., 243, 607, 1956.
- (5) Ohle, H., G. Böckmann: Ber. deutsch. chem. Ges., 67, 1750, 1934.
- (6) Gordon, J., I. Noble: Food Res., 24, 1, 1959.
- (7) Hermann, I., W. Andae: Die Nahrung, 7, 243, 1963.

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА „С” ОТДЕЛЕНИЕМ ОСАЗОНОВ ПОМОЩЬЮ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

III. Постоянство и изомеризация осазонов дегидроаскорбиновой кислоты в кислой среде

К. Сотьори

Автор исследовал постоянство осазонов дегидроаскорбиновой кислоты. Установил, что после несколько недельного хранения при комнатной температуре при наличии кислоты, применением автором разработанной смеси гептон: этилацетата в соотношении 60:40 на силикагеле изолируются 7 изомеров. Взаимное соотношение количества изомеров является зависимостью применяемой концентрации кислоты.

В случае применения условий определения аскорбиновой кислоты получается только одна самая меньшая величина формы Rf.

В литературе описанный осазон присвоенный 2–3 дикетогулоновой кислоте вследствие неправильного ухода раствора и наличия в нем следов кислот образующих осазонов, является изомером.

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES VITAMIN C GEHALTES
DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER OSAZONE
STABILITÄT UND ISOMERISADION DES
DEHYDROASCORLINSÄURE-OSAZONS IN SAUEREM MEDIUM

K. Szotyori

Verfasserin prüfte die Beständigkeit des Osazons der Dehydroascorbinsäure. Sie stellte fest, dass bei Zimmertemperatur in Säueranwesenheit nach mehrwöchentlichem Stehen 7 Isomere auf Silicagel mittels der von ihr zusammengestellten Mischung Heptan: Aethylacetat 60:40 separiert werden können. Das Verhältnis der Menge der Isomere zueinander ist von der verwendeten Säurekonzentration abhängig.

Unter den bei der Bestimmung der Ascorbinsäure herrschenden Umständen erscheint nur eine einzige Form, diejenige mit dem kleinsten R_f Wert. Das in der Literatur beschriebene, der 2-3 Diketogulonsäure zugeschriebene Osazon ist ein durch falsche Behandlung der Lösung, infolge der Anwesenheit von Säurespuren gebildetes Osazon-Isomer.

METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE CONTENT OF
VITAMIN C BY THE PAPER CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF
THE OSAZONES, III. STABILITY AND ISOMERIZATION OF DEHYDRO-
ASCORBIC ACID IN AN ACID MEDIUM

K. Szotyori

On investigating the stability of the osazone of dehydroascorbic acid it was found that after allowing the system to stand at room temperature for several weeks, it is possible separate seven different isomers on silica gel, using the solvent mixture heptane: ethyl acetate of 60:40 evolved by the author. The ratio of isomers to each other appeared to be a function of the acid concentration applied.

Under the conditions applied in the determination of ascorbic acid, only one form, namely that of minimum R_f value appeared. The osazone described in literature, attributed to 2,3-diketogulonic acid proved to be actually an isomeric osazone formed by the inadequate treatment of the solution, due to the presence of acid traces.

PROCÉDÉ POUR LE DOSAGE DE LA VITAMINE C PAR LA
SÉPARATION DES OSAZONES PAR CHROMATOGRAPHIE AU PAPIER
III. CONSTANCE ET ISOMÉRATION DE L'OSAZONE DE L'ACIDE
DÉHYDROASCORBIQUE DANS DES MILIEUX ACIDES

K. Szotyori

L'auteur a étudié la constance de l'osazone de l'acide déhydroascorbique. Elle a établi qu'à la température de la chambre en présence d'acide l'on peut séparer après un délai de plusieurs semaines 7 isomères sur du gel silicique, avec un mélange heptane-acétate éthylique 60:40 élaboré par elle. Le rapport des quantités des divers isomères est une fonction de la concentration de l'acide employée.

Dans les circonstances observées lors du dosage de l'acide ascorbique il ne se présente qu'une seule forme, celle à valeur R_f minima. L'osazone attribué à l'acide 2-3 diketogulonique, décrit dans la littérature, est un isomère d'osazone produit par des traces d'acide en cas d'un traitement erroné de la solution.