

L-aszorbinsav mennyiségi meghatározása berlinikék színreakció alapján, fotometriás kiértékeléssel I.

VÁMOS KÁROLYNÉ és GÁBOR MIKLÓSNÉ

Élelmiszeripari Főiskola, Szeged

Érkezett: 1972. július 7.

A C-vitamin tartalom meghatározás egyik legnehezebb kérdése még ma is az élelmiszeranalitikusoknak. A vegyület könnyen oxidálódik, természetes forrásaiban, főleg a növényekben, igen sok zavaróanyag, elsősorban az ún. reduktonok teszik bizonytalanná a mérési eredményeket.

Az eddig kidolgozott eljárásokról igen jó rendszerező-elemző tájékoztatót ad Keveiné (1), mely munkában a jelenleg ismert fontosabb eljárásokat ismer-teti, illetve értékeli.

Az L-aszorbinsav (L-AS) és kálium-ferri-cianid reakciója már régebbről ismert (5, 6). A kellő biztonság eléréséhez a potenciometrikus eljárásnál ügyelni kell a reakcióelegy pH értékére. A végpont észlelése lehetséges azonban keményítő indikátor felhasználásával is.

Megpróbáltuk az eljárás végpontjelzés és kiértékelés részét úgy megváltoztatni, hogy sorozatvizsgálatra alkalmasan kellő gyorsaságú és pontosságú legyen, mely követelmények a gyakorlatban való alkalmazhatóság elengedhetetlen feltételei.

Az eljárást a többi oxidimetriás módszerrel szemben azért tartottuk előnyösebbnek, mert a ferri-cianid/ferro-cianid rendszer normál redox-potenciálja azonos körülmények között közelebb esik az L-dehidroaszorbinsav/L-aszorbinsav rendszeréhez. A különbség ugyanakkor elegendő a reakció viszonylag rövid idő alatti teljes lefolyásához. Így lehetőséget láttunk a reduktonok és egyéb zavaró anyagok eredményt befolyásoló hatásának csökkentésére.

Munkánk első részében az L-AS tartalom mérésére dolgoztunk ki eljárást.

A kapott adatokat egyrészt jodometriás titrálással (jód oldat, dead-stop végpontjelzés), másrészt polarográfiásan kontrolláltuk (2, 3, 4).

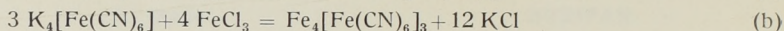
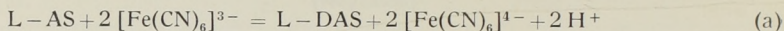
1. A meghatározás kémiai alapjai

Az L-DAS/L-AS és ferri-cianid/ferro-cianid redox rendszerek normál potenciáljainak alakulását mutatja az 1. ábra, a pH függvényében (5).

Vizsgálatainkat célszerűnek tartottuk a 3,5–4 pH értékek között lefolytatni, ahol az L-AS viszonylag még stabilis, s a ferri-cianid/ferro-cianid rendszer pH-tól való függése gyakorlatilag megszűnik.

Az általunk kidolgozott eljárás első részében az L-AS-t reagáltatjuk kálium-ferri-cianiddal, mely sztöchiometrikus arányban kálium-ferro-cianiddá redukálódik (a). A feleslegben maradt ferri-cianidionok zavaró hatását fluoridionok adagolásával küszöböljük ki (ferri-ionokkal barna elszíneződés), majd

ferri-klorid oldatot adva a reakcióelegyhez, a ferro-cianidot ferri-ferro-cianiddá alakítjuk, mely intenzív kék színű vegyület: berlinikék néven ismert (b).



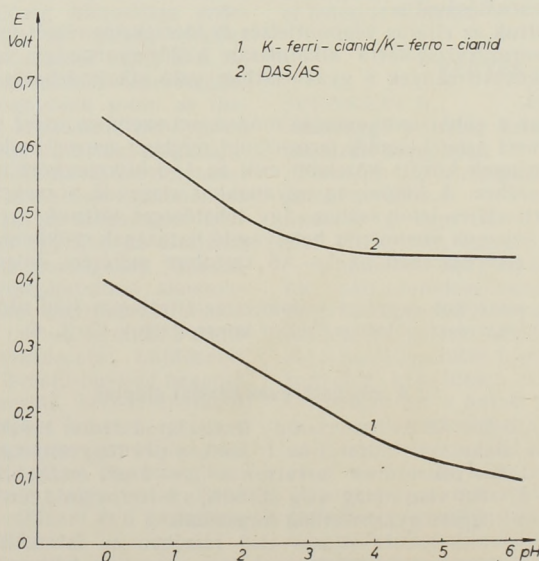
Utóbbi reakciónál szintén nagyon fontos a fluorid-ionok jelenléte, ugyanis optimális koncentráció esetén megakadályozzák a berlinikék csapadék formájában történő kiválását. (Ügyelni kell azonban, mert nagy F^- koncentrációban a reakció egyáltalán nem játszódik le) (7).

A keletkező $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ kék színe rövid idő alatt stabilizálódik, és modell oldatokban 20–25 percig állandó intenzitású, mely az előzőek értelmében arányos a vizsgálandó oldat L-AS tartalmával.

2. A meghatározás menete

100 kcm-es mérőlombikba 10,00 kcm puffert ($\text{pH} = 3,69$) mérünk, melyhez ismert mennyiségű vizsgálandó oldatot pipettázunk (L-AS tartalma 0,2–1,5 mg között legyen). 1,00 kcm kálium-ferri-cianid oldat hozzáadása után a reakcióelegyet összerázzuk, a reagens-felesleget 1,00 kcm nátrium-fluorid oldattal lekötjük, majd desztillált vízzel 80–90 kcm-re egészítjük ki, s végül 2,00 kcm ferri-klorid oldatot adunk hozzá. Jelig töltjük, összerázzuk és 5 perc elteltével fotométerrel mérjük az oldat standard oldattal szembeni extinkcióját, 10 mm-es küvettában, 710 nm értéknél. Az L-AS mennyiséget a kapott extinkció alapján kalibrációs diagramból olvassuk le.

A kalibrációs diagram megszerkesztése:



1. ábra. L-DAS/L-AS és ferri-cianid/ferro-cianid redox rendszerek normál potenciáljának alakulása a pH függvényében

2.1 Standard oldat

10,00 kcm puffert, 1,00 kcm kálium ferri-cianidot, 1,00 kcm nátrium-fluoridot, 2,00 kcm ferri-kloridot összemérünk 100 kcm mérőlombikba és jelig töltjük.

2.2 L – AS oldatok

20 mg%-os frissen készített L – AS törzsoldatból 1, 2, 3, ... 8 kcm-t pipettázunk 100 kcm-es mérőlombikokba, és a fentiek szerint (2.1 pont) mérünk hozzá egyéb reagenseket. A fotométeres mérés 10 mm küvettában 710 nm értéken történik.

A kapott extinkció értékeket diagramban ábrázoljuk a számított L – AS tartalom függvényében.

2.3. Felhasznált oldatok

Pufferoldat, pH = 3,69 / 0,1 m nátrium-citrát 0,1 n HCl (1:1)

Kálium-ferri-cianid oldat, 1% (mindig frissen készítve),

Nátrium-fluorid oldat, 2%,

Ferri-klorid oldat, 2%,

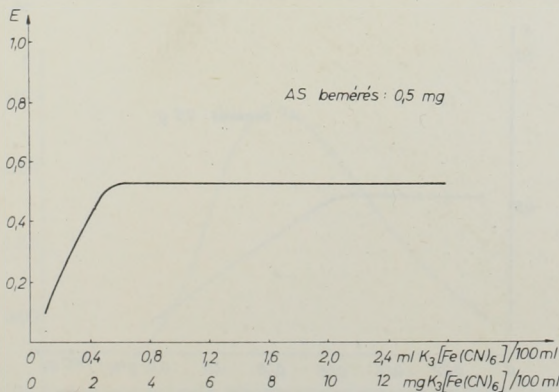
L – AS törzsoldat kalibrációhoz, 20 mg% (esetenként frissen készítve).

4. A módszer pontosságát, illetve reprodukálhatóságát befolyásoló tényezők vizsgálata

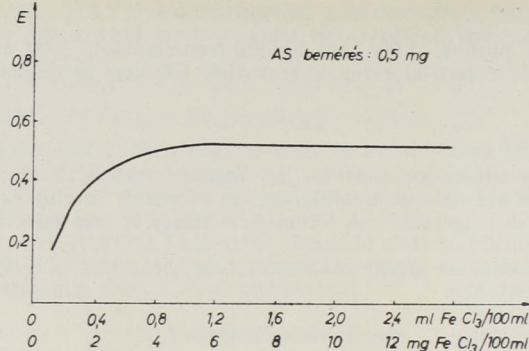
4.1 A kémszerek befolyása a kiértékelésre

A kálium-ferri-cianid, ferri-klorid és nátrium-fluorid koncentrációkat külön-külön változtatva figyeltük az extinkció alakulását, egyébként azonos körülmények között. Kapott adatainkat a 2., 3. és 4. ábrákon szemléltetjük.

A 2. ábrán a kálium-ferri-cianid növekvő mennyiségének függvényében látható az extinkció alakulása, mely 0,80 kcm-től vehető stabilisnak. Az általunk javasolt 1 kcm elegendő a vizsgálandó anyag L – AS tartalmának oxidálására, s a viszonylag kis reagens-felesleg zavaró hatását nátrium-fluoriddal ki tudjuk küszöbölni.



2. ábra. Az extinkció értéke alakulása a kálium-ferri-cianid növekvő mennyiségének függvényében



3. ábra. Az extinkció értékek alakulása a ferri-klorid növekvő mennyisége függvényében

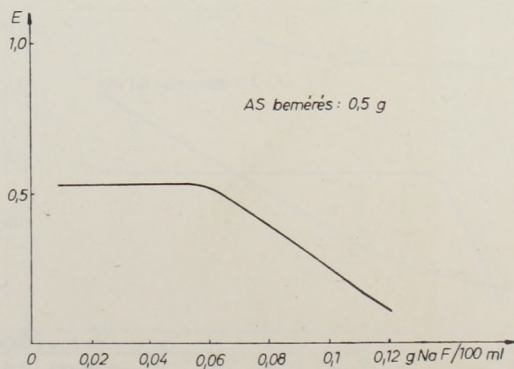
A 3. ábrából leolvasható a ferri-klorid optimális mennyisége: 1,6 – 2,0 kcm.

A nátrium-fluorid nagyobb koncentrációban megakadályozza a berlinikék-reakció létrejöttét. Vizsgálataink alapján 0,02 g NaF/100 kcm koncentráció megfelelőnek bizonyult. Az adatokat a 4. ábra szemlélteti.

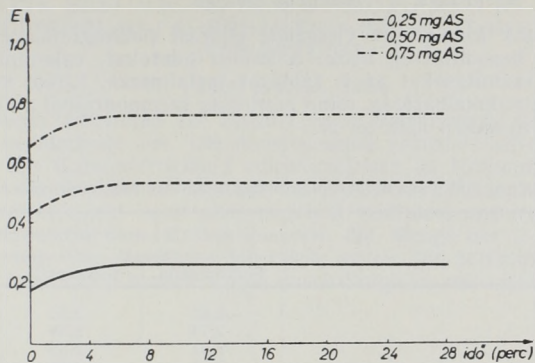
4.2 Az optimális reakcióidő megállapítása

Különböző L – AS koncentrációjú oldatokban kifejlesztett szín intenzitásának alakulását vizsgáltuk az idő függvényében. Méréseinket az 5. ábra mutatja.

Megállapítható, hogy az L – AS koncentrációjától függetlenül 5 perc eltelte után a reakció teljessé válik, a színintenzitás stabilis. Optimális időtartamnak 5 – 10 percet találtunk. Főleg természetes anyagok vizsgálatánál jelentős ez, ahol éppen a kisebb reakciósebességgel reagáló zavaró anyagok befolyásoló hatását kívántuk módszerünkkel csökkenteni.



4. ábra. Az extinkció értékek alakulása a nátrium-fluorid növekvő mennyiségének függvényében



5. ábra. Az extinkció értékek alakulása különböző L-AS koncentrációjú oldatokban az idő függvényében

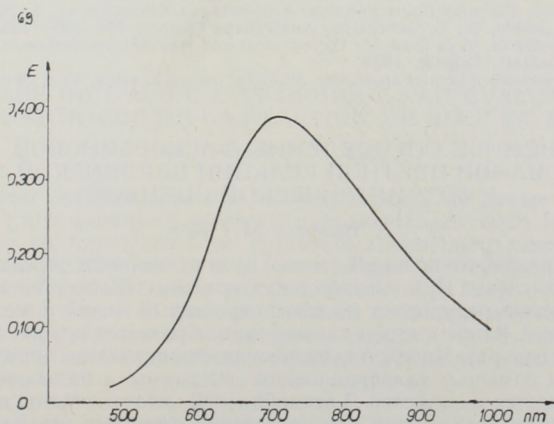
4.3 Egyéb külső körülmények

A reakcióelegy 20 °C körüli hőmérsékletének viszonylagos kisebb ingadozása nem befolyásolja a reakció lefutását, de feltétlenül óvniuk kell oldatainkat a direkt napsugárzástól.

4.4 Az optimális hullámhossz megállapítása

Ennek kimérésére adott körülmények között felvettük a spektrumot, melyet a 6. ábra szemléltet.

Az oldatnak a 700–730 nm értékek között maximuma van. A görbe meredekségét figyelembe véve a 710 nm értéket tartottuk legmegfelelőbbnek vizsgálatainkhoz.



6. ábra. A berlinikék spektruma a látható tartományban

4.5 A módszer pontossága és reprodukálhatósága

Az általunk kidolgozott vizsgálati eljárást polarográfiás és jodometriás módszerekkel hasonlítottuk össze. A kapott adatokat, valamint az eszközölt matematikai számításokat az 1. táblázat tartalmazza. Ebből megállapítható, hogy mind reprodukálhatóság, mind pontosság szempontjából a többi eljáráshez viszonyítva lényegesen nem tér el.

1. táblázat

L – AS tartalom alakulása modell oldatokban különböző meghatározási eljárásokkal

	L – AS tartalom, mg		
	Polarográfia	Jodometria	K-ferri-cianid
	2,81 2,78 2,81 2,78 2,85	2,90 2,85 2,85 2,88 2,92	2,85 2,85 2,80 2,80 2,85
Középérték: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	2,81	2,88	2,82
Szórás: $s = \sqrt{\frac{1(x-\bar{x})^2}{n-1}}$	0,029	0,031	0,030
Relatív hiba %: $= \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$	1,03	1,07	1,06

A továbbiakban módszerünk pontosságát természetes anyagi rendszerekben fogjuk kimérni és az eljárást az L – DAS meghatározására kívánjuk továbbfejleszteni.

I R O D A L O M

- (1) Kevei Jánosné: Élelmezési Ipar, 24, 161, 1970.
- (2) Proszk J., Cielezsky V. és Györbiró K.: Polarográfia, Akadémiai Kiadó, Budapest 1964.
- (3) Fragner, J.: Vitamine VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965.
- (4) Török Attiláné: Élelmiszeripari Főiskola, Tudományos Közlemények, 1, 1971.
- (5) Erdéy L. és Svehla, G.: Zeitschrift für Analytische Chemie, 150, 408, 1956.
- (6) Berka, A., Vullerin, J. és Zyka, J.: Oxydations- und Reduktionsmethoden, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1964.
- (7) Erdéy L.: Bevezetés a kémiai analizisbe, Minőségi kémiai analizis, Tanykönyvkiadó Budapest, 1953.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ Л-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВАНИИ ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКОЙ

К. Вамош и М. Габор

Авторы разработали новый метод количественного определения Л-аскорбиновой кислоты. При определенных условиях Л-аскорбиновая кислота стехиометрически редуцирует железосинеродистый калий в железистосинеродистый калий. В присутствии ионов ферри образуется цианид ферри-ферро (берлинский лазурь). Красящую интенсивность возможно определить фотометрически и помощью калибрационной диаграммы а из величин экстинкций отсчитывается количество Л-аскорбиновой кислоты. Метод является быстрым и поэтому подходящий для проведения серийных испытаний. Репродуцируемость удостоверяют результатами сравнений других способов.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER L-ASCORBINSÄURE AUFGRUND DER BERLINERBLAU-FARBREAKTION MIT PHOTOMETRISCHER AUSWERTUNG

K. Vámos und M. Gábor

Die Verfasser arbeiteten zur quantitativen Bestimmung der L-Ascorbinsäure eine neue Methode aus. Die Ascorbinsäure reduziert unter bestimmten Bedingungen das Kaliumferricianid stöchiometrisch zu Kaliumferrocianid. In Anwesenheit von Ferri-Ionen entsteht das blaue Ferri-Ferrocianid (Berlinerblau). Die Farbintensität kann photometrisch bestimmt und vermittels einer Kalibrationskurve aus dem Extinktionswert die Menge der L-Ascorbinsäure abgelesen werden. Das Verfahren ist rasch, daher für Serienuntersuchungen geeignet. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Vergleich mit anderen Verfahren bewiesen.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID ON THE BASIS OF THE PRUSSIAN BLUE COLOUR REACTION, USING PHOTOMETRIC EVALUATION. I.

K. Vámos and M. Gábor

A novel method was developed for the quantitative determination of L-ascorbic acid. Under defined conditions potassium iron(III) cyanide is stoichiometrically reduced to potassium iron(II) cyanide by ascorbic acid. In the presence of iron(III) ions blue iron(III)-iron(II) cyanide (Prussian blue) is formed. The colour intensity can be determined by photometry, and on using a calibration diagram the amount of L-ascorbic acid can be read from the extinction value. The method is rapid and thus suitable for routine tests. The reproducibility of the method was proved by comparison of the results with those given by other methods.

DOSAGE DE L'ACIDE L-ASCORBIQUE PAR ÉVALUATION PHOTOMETRIQUE DE LA RÉACTION DE BLEU DE PRUSSE

K. Vámos et M. Gábor

Les auteurs ont développé une méthode nouvelle du dosage de l'acide L-ascorbique. Entre conditions définies l'acide ascorbique réduit le ferrocyanure de potassium en ferrocyanure de potassium stoechiométriquement. Dans la présence d'ions de fer trivalent il se forme le bleu de Prusse. L'intensité de la couleur bleue se fait déterminer par photométrie et, à l'aide d'un diagramme d'étalonnage, on obtient la quantité de l'acide ascorbique à partir des valeurs de la densité optique. La méthode est rapide et se prête à des analyses de série. La reproductibilité a été prouvée en comparant les résultats à ceux obtenus par d'autres méthodes.