

FLUORIMETRIÁS ELJÁRÁS ROSTOS GYÜMÖLCSLEVEK C-VITAMIN TARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSÁRA

DR. VAMOS KÁROLYNÉ*—SÁROSINÉ DR. POLÁK ARANKA*

A kémiai analízis fluoreszcenciás módszerei gyakran felülmúlják a spektrofotometriás módszereket érzékenység és szelektivitás szempontjából. Szelektivitásuk azért nagyobb, mivel az azonos hullámhosszúságú fényt elnyelő anyagok közül viszonylag kevés bocsájt ki azonos hullámhosszúságú sugárzást.

Az utóbbi időben igen gyorsan elterjedtek ezek a módszerek, ami részben a műszerek fejlődésének köszönhető, részben annak, hogy számos fluoreszkáló vegyületet fedeztek fel.

A fluoreszcens módszerek összetett rendszerek elemzésére is használhatók a nagy szelektivitás következtében, így főlegessé válnak az elválasztások sokszor hosszadalmas, sok hibaforrást jelentő műveletei.

A fluoreszcencia jelensége akkor lép fel, ha a gerjesztett molekula energiájának egy részét sugárzás formájában emittálja, miközben a molekula alapállapotba tér vissza. A gerjesztést leggyakrabban az ultraibolya vagy látható fény abszorpciója hozza létre, a fluoreszcens fény hullámhossz eloszlása jellemző a molekula minőségére, a fény intenzitása pedig bizonyos körülmények között a fluoreszkáló anyag koncentrációjával arányos.

A C-VITAMINTARTALOM MÉRÉSE FLUOROMETRIÁS MÓDSZERREL

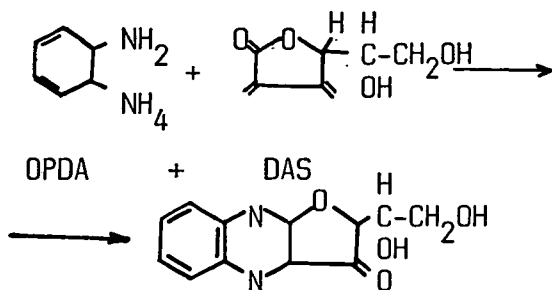
A módszer elve:

Az eljárással az összes C-vitamintartalom mérhető. Első lépésben az eredetileg L-askorbinsavként jelenlevő vitamintartalmat oxidáljuk savasan kezelt aktív szénnel, L-dehidroaskorbinsavvá. Az így nyert L-dehidroaskorbinsav orto-fenilén-diaminnal (OPDA) az alábbi reakció szerint fluoreszkáló vegyületet ad:

Egy kontroll kísérlet során, bórsav jelenlétében (H_3BO_3) a fenti fluoreszcenciát mutató vegyület kialakulása elmarad. Ugyanis a DAS (L-dehidroaskorbinsav) bórsavval olyan komplex vegyületet hoz létre, amely az OPDA-val már nem tud reakcióba lépni.

Bórsav adagolással így lehetővé válik a háttér fluoreszcencia mérése, a főreakció kiküszöbölésével.

* Élelmiszeripari Főiskola, Kémiai Osztály



3-/1,1 dihidroxi-etil/
FURN-/3,4-b/ kinoxalin 1-N₂O

1. ábra: L-dehidro-askorbinsav és OPDA reakciója

Reagensek:

- nátriumacetát-oldat (NaOAc) 500 g/dm³,
- bórsav 50%; NaOAc 3% = 1:1,
- metafoszforsav—ecetsav extraháló oldat készítése:
1 literes főzőpohárba bemérünk 30 g metafoszforsavat (HPO₃), majd 80 cm³ 99,5%-os ecetsavat adunk hozzá, és kb. 500 cm³ desztillált vizet.
Teljes oldás után cc. H₂SO₄-al a pH=1,2 értékre állítjuk be.
- savasan mosott aktív szén, vagy NORITE.

A mérés menete:

A vizsgálandó anyagból analitikai pontossággal annyit mérünk be, hogy a C-vitamintartalom 50—80 mg között legyen. Extrahálószerrel a térfogatát 250,00 cm³-re egészítjük ki, kb. 300 cm³-es jódszámlombikba átvisszük és 2 g körüli aktív szenet adunk hozzá, összerázás után gyorsan leszűrjük.

A szűrlet 5,00—5,00 cm³-ét 100 cm³-es mérőlombikba pipettázzuk és megfelelő reagensek hozzáadásával elkészítjük az összehasonlító és a fluoreszcenciás mérésekhez használandó oldatokat.

Összehasonlító oldat:

5 cm³ dehidro-askorbinsavvá alakított szűrlet + 5 cm³ bórsavas nátriumacetát oldat. 15 perc után 100 cm³-es normál lombikban metafoszforsavval jelig töltve.

Mérendő oldat:

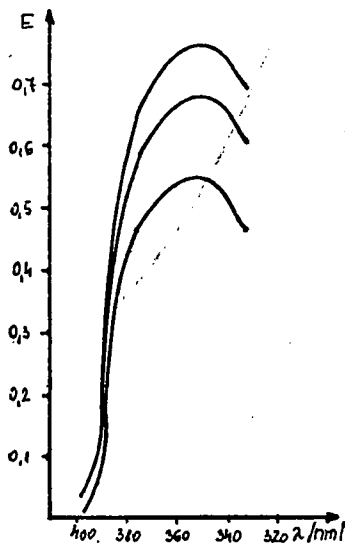
5 cm³ szűrlet + 5 cm³ nátrium-acetát-oldat. 15 perc állás után extraháló oldattal jelig töltve.

Fenti oldatokból csiszolatos kémcsőbe 3×2,00 cm³-ket pipettázunk és 5 cm³ frissen készített OPDA-oldatot adunk hozzá. 35 percig sötétben állni hagyjuk, majd fluoreszcenciáját mérjük.

A MÉRÉSI KÖRÜLMÉNYEK KIVÁLASZTÁSA

Kísérleteink során első lépésben az adott készülékre és az adott körülményekre vonatkozóan meg kellett határozni az összefüggést az össz C-vitamin-tartalom és a készülékkel (Pye Unicam SP—8—100 Spectrofotometer, fluoreszcenciás feltétellel) mért emissziós értékek között.

Ennek megállapítására ismert, különböző mennyiségű C-vitamint tartalmazó oldattal folytattuk le az adott receptúra szerint a méréseket.



2. ábra. DAS—OPDA komplex alakulása 400—330 nm között, különböző koncentrációju DAS oldalak felhasználásával

50 mg %-os aszkorbinsav-oldatok felhasználásával vizsgáltuk a reakció lefutását. A hullámhosszfüggvény felvételével 600—270 nm között megnéztük a fluoreszcencia alakulását a megfelelő szűrők alkalmazásával.

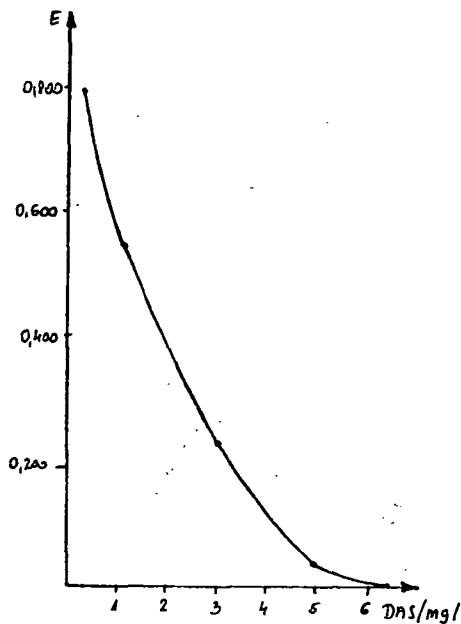
KALIBRÁCIÓS MÉRÉSEK

1 mg/cm³ L-aszkorbinsav tartalmú oldatból különböző mennyiségeket bemérve vizsgáltuk a DAS—OPDA komplex fluoreszcenciáját. A C-vitamintartalom és az oldat extinkciója (E), illetve az oldatok transzmittanciája között a következő adatokat kaptuk:

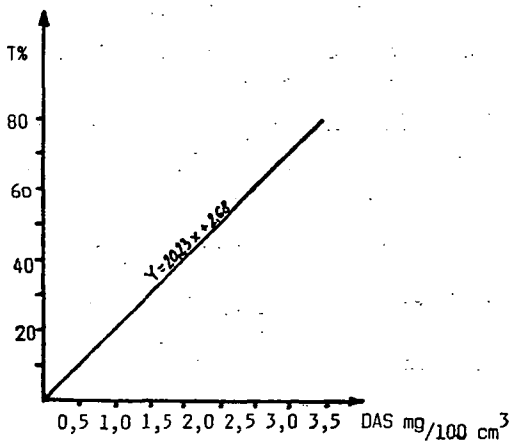
1. TÁBLÁZAT

Fluoreszcencia alakulása a koncentráció függvényében

DAS bemérés mg	Extinkció (E)	Transzmittancia %
2,00	0,380	65,0
3,00	0,230	82,0
4,00	0,140	107,0
5,00	0,030	130,0
6,00	0,010	142,0



3. ábra. Koncentráció—extinkció közötti összefüggés



4. ábra. Koncentráció—Transzmittancia % közötti összefüggés

Az adatokból szerkesztett kalibrációs összefüggést az 4. ábra szemlélteti.
A kalibrációs diagrammot a legkisebb négyzetek módszerével pontosítottuk.
Kiszámoltuk a regressziós egyenes egyenletét, amely a következőnek adódott:

$$Y = 20,23x + 2,68.$$

ISMERETLEN C-VITAMINTARTALMÚ ROSTOS IVÓLEVEK VITAMINTARTALMÁNAK VIZSGÁLATA

A módszer kidolgozása után a kalibráció egyenes birtokában alkalmaztuk az eljárást ismeretlen C-vitamintartalmú ivólevelek vizsgálatára.

Az ismeretlen C-vitamintartalmú anyag vitamintartalmának mérése a következő recept alapján történik:

A várható C-vitamintartalomtól függően a vizsgálandó anyagból bemérünk olyan mennyiséget, hogy annak vitamintartalma 20—80 mg között legyen. Ebből metafoszforsavas extrahálószerrel 200 cm³-es törzsoldatot készítünk, 300 cm³-es jódszámlombikba átvisszük és 2 g körüli aktív szénen adunk hozzá, összerázás után gyorsan leszűrjük. A szűrlet 10—10 cm³-es részleteit 100 cm³-es mérőlombikba pipettázzuk és a megfelelő reagensek hozzáadásával elkészítjük a kísérleti és kontroll oldatot.

Kísérleteink során meghatároztuk sárgabarack, körte, őszibarack, alma, paradicsom, sütőtök rostos nektárok, rostos narancs juice, és csipkeshörp vitamintartalmát.

Ezen vitamintartalmakat hígítás nélkül tudtuk felhasználni az eljáráshoz, mivel vitamintartalmuk 2—10 mg között volt. Összehasonlító mérésenként minden esetben meghatároztuk a nektárok L-askorbinsavtartalmát, 0,005 n jóddal mérve, dead stop végpontjelzéssel.

Mérési eredményeinket a 2. táblázat mutatja.

2. TÁBLÁZAT

Minta	Transzm. %	Vitamin- mennyiség mg	Ivólé vitamintart. mg/100 cm ³	
			Fluorometriás módszerrel	Jodometriás
1.	2.	3.	4.	5.
Sárgabarack	16,50	0,68	6,8	6,25
	17,02	0,71	7,1	6,10
	16,00	0,66	6,6	5,95
	15,90	0,65	6,5	6,20
	14,70	0,59	5,9	6,00
Átlag:	16,03	0,66	6,58	6,10
szórás:			0,44	0,13
Körte nektár	7,76	0,25	2,5	1,85
	7,80	0,25	2,5	2,05
	7,85	0,26	2,6	2,20
	7,87	0,26	2,6	2,00
	7,82	0,25	2,5	2,15
Átlag:	7,82	0,254	2,54	2,05
szórás:			0,05	0,14
Őszibarack	12,20	0,47	4,7	3,95
	11,90	0,46	4,6	4,00
	12,20	0,47	4,7	4,25
	11,90	0,46	4,6	4,20
	12,35	0,48	4,8	4,60
Átlag:	12,11	0,468	4,68	4,20
szórás:			0,08	6,26

	1.	2.	3.	4.	5.
Alma nektár		11,4	0,40	4,3	3,05
		10,8	0,40	4,0	3,00
		10,5	0,39	3,9	2,95
		9,7	0,35	3,5	3,15
		9,25	0,32	3,2	3,10
Átlag: szórás:		10,33	0,378	3,78 0,40	3,05 0,08
Paradicsom ital		13,68	0,54	5,4	4,45
		12,51	0,49	4,9	4,00
		12,51	0,49	4,9	4,15
		13,10	0,51	5,1	4,25
		12,00	0,46	4,6	4,10
Átlag: szórás:		12,76	0,50	4,98 0,29	4,19 0,17
Sütőtök ital		5,23	0,13	1,3	2,79
		4,99	0,11	1,1	2,75
		5,01	0,12	1,2	2,60
		5,42	0,14	1,4	2,70
		5,20	0,12	1,2	2,64
Átlag: szórás:		5,17	0,12	1,24 0,11	2,70 0,08
Szilva nektár		10,45	0,38	3,8	3,00
		9,40	0,33	3,3	3,10
		10,15	0,37	3,7	3,04
		10,07	0,37	3,7	3,15
		9,90	0,34	3,4	3,10
Átlag: szórás:		9,92	0,36	3,58 0,22	3,08 0,06
Narancs juice		93,3	4,48	89,6	82,8
		94,3	4,53	90,6	85,2
		90,8	4,36	87,2	86,5
		94,3	4,53	90,6	85,0
		90,8	4,36	87,2	86,5
Átlag: szórás:		92,7	4,48	89,04 1,78	85,2 1,51
Csipkeszörp		59,25	2,80	56,0	55,5
		60,18	2,84	56,8	54,0
		61,55	2,91	58,2	52,5
		58,10	2,74	54,8	55,0
		61,00	2,88	57,6	54,5
Átlag: szórás:		60,00	2,83	56,68 1,28	54,3 1,15

ÖSSZEFOGLALÁS, ÉRTÉKELES

Kísérleteink célja az összes C-vitamin fluoremetriás eljárással történő meghatározása volt. A vitamin mennyiséget az L-askorbinsavval ekvivalens mennyiségű L-dehidroaskorbinsav o-fenilén-diaminnal alkotott komplexének fluoreszcenciája alapján mutattuk ki. Kísérleteink első lépéseként a mérési körülményeket, mérési paramétereket határoztuk meg. Különböző mennyiségű C-vitamint tartalmazó oldatok emissziós értékeit vizsgálva a hullámhossz λ függvényében minden esetben —355 nm-nél tapasztaltuk a legnagyobb extinkció értékeket.

További méréseinket ezen a hullámhosszon végeztük. Megfelelő szűrőnek a KODAK—2B bizonyult.

Az adataink szerint 20—80 mg/100 cm³ askorbinsav koncentráció intervallumban csak a transzmittancia % mutat linearitást a koncentráció függvényében. A kalibrációs egyenes egyenlete:

$$Y = 20,23x + 2,68.$$

Ennek birtokában, az eljárást ismeretlen C-vitamintartalmú ivólevek vizsgálatára alkalmaztuk. A mérések pontosságáról úgy győződünk meg, hogy egy klasszikus módszerrel összevetettük az adatokat.

A kétféle metodikával kapott adatok közül a fluorometriás érték a várakozásnak megfelelően nagyobb, mivel ezzel a módszerrel az L-askorbinsav és L-dehidroaskorbinsav mennyiségét együttesen mérjük. A jodometriás titrálásakor viszont csak az L-askorbinsav lép reakcióba a jóddal, ill. az ivólében levő egyéb oxidáló anyagok zavaró anyagként reagálhatnak a mérőoldattal.

A fluorometriás eljárással az összes C-vitamintartalom mérése igen jól alkalmazható, gyors módszerhez jutottunk. A minták előkészítése, a vitamintartalom extrahálása nem időigényes, a mérések jól reprodukálhatónak bizonyultak.

Az adatok szórása az átlagértékek százalékában kifejezve 5—10% közötti.

A módszer fluoriméter birtokában az ipar számára is jól hasznosítható gyorsaságára való tekintettel.

FELHASZNÁLT IRODALOM

1. *Strohecker—Pies*: Lebensmitt. Unt. u. Forsch, 118, 394 (1962).
2. *Csányi—Farsang—Szakács*: Műszeres analízis. Tankönyvkiadó, Budapest (1969).
3. *Strohecker—Hennig*: Vitamin Bestimmungen. Verlag Chemie GmbH. Weinheim 235 (1963).

FLUORIMETRIC PROCEDURE FOR DETERMINATION OF THE VITAMIN C CONTENT OF FIBROUS FRUIT JUICES

Dr. K. Vámos and Dr. A. Polák—Sárosi

Experiments were performed to determine the total vitamin C content by a fluorimetric procedure. The vitamin was detected on the basis of the fluorescence of the complex formed by o-phenylenediamine with a quantity of dehydroascorbic acid equivalent to the L-ascorbic acid content. As the first step in the experiments, the experimental conditions and parameters were determined. It was found that in the ascorbic acid concentration interval 20—80 mg/100 cm³ the transmittance % exhibits linearity as a function of the concentration. The equation of the calibration plot is $Y = 20.23X + 2.68$. This was utilized to investigate juices with unknown vitamin C contents.

FLUORMETRISCHES VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES C-VITAMIN GEHALTES DER FASERIGEN FRUCHTSÄFTE

Dr. Vámos Károlyné—Sárosiné dr. Polák Aranka

Zweck unserer Experimente war die Bestimmung des gesamten C-Vitamins durch Fluorimetrisches Verfahren. Wir wiesen die Vitaminquantität auf Grund des Fluoreszenzkomplexes, der aus O-Fenilendiamin und aus Dehydroaskorbinsäure in gleicher Quantität wie die L-Askorbinsäure besteht, nach. Nach unseren Daten zeigt das Transmittanzprozent eine Linearität mit der Konzentrationsfunktion im Interwall 20—80 mg/100 cm³ Askorbinsäurekonzentrat.

Die Gleichung der Kalibrationsgerade lautet: $Y = (20,23X + 2,68)$. Im Besitz dieser Gleichung verwendeten wir das Verfahren bei Untersuchung der Fruchtsäfte unbekanntem C-Vitamingehalts.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ФРУКТОВЫХ СОКАХ С МЯКОТЬЮ

Вамош Каройнэ—Шарошинэ Аранка Полак

Целью наших экспериментов было определение витамина С всеми флуориметрическими методами. Количество витамина нами было показано на основе флуоресценции комплекса, образованного дегидроаскорбиновой кислотой о-фенилен-диамина, эквивалентному количеству L-аскорбиновой кислоты. В качестве первого шага наших экспериментов мы определяли условия и параметры измерения.

По нашим данным в интервале 20—80 мг/100 см³ концентрации аскорбиновой кислоты трансмиттанция % показывает линейность в функции концентрации.

Уравнение калибрационной прямой:

$$Y = 20,23X + 2,68$$

Располагая этими показателями, этот метод мы использовали при исследовании питьевых соков с неизвестным содержанием витамина С.