

Eljárás a C vitamin tartalom meghatározására az oszazonok papírkromatográfiás elválasztása útján

I. Az oszazonok képződését befolyásoló tényezők

SZOTYORI KATALIN

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Az aszkorbinsav meghatározására legjobban elterjedt redukcióképeségen alapuló eljárások (1, 2, 3), valamint a dienol csoport színreakciói (4, 5) nem bizonyultak eléggé specifikusnak, ezért a tárolt, szárított és hőkezelt élelmi anyagok C-vitamintartalmának meghatározása még a legutóbbi években megjelent munkák szerint is bizonytalannak látszott. A papírkromatográfiás elválasztás segítségével ugyan az aszkorbinsav valamennyi hasonló típusú vegyülettől elkülönítve határozható meg (6), azonban főképpen hőkezelt termékeknél és kis C-vitamintartalmú anyagoknál a zavaró anyagok relatív nagy mennyisége miatt az aszkorbinsav direkt kromatográfiás meghatározása sem jár mindig megfelelő eredményel.

A dehidro aszkorbinsavnak *Roe* és *Kuether* eljárása (7) szerint előállított oszazonját előző közleményemben közölt eredmények alapján (8) alkalmasnak találtam arra, hogy papírkromatográfia segítségével a cukorfeleségek oszazonjaitól történő elválasztás után kvantitatív meghatározás alapjául szolgáljon.

Jelen munkámban az oszazon keletkezésének körülményeit kívántam tanulmányozni abból a szempontból, hogy a kvantitatív meghatározás feltételeit milyen körülmények között lehet a legjobban megvalósítani. Feladatomból tudtam ki, hogy felülvizsgáljam az oszazonképződést a *Roe* és *Kuether* (7) által megadott körülmények között. Az oszazon előállítása az eredeti eljárás szerint norittal, vagy brómos vízzel dehidroaszorbinsavvá oxidált aszkorbinsavból triklórecet-savas közegben történik. A 2-4-dinitrofenilhidrazinnal történő reagálás kénsav jelenlétében 37 C°-on 3 óráig tart. Ezen idő alatt azonban a reakció nem kvantitatív, szükségesnek látszott ezért megvizsgálni, hogy a reakció körülményei milyen mértékben befolyásolják az oszazonképződés sebességét és ezáltal az aszkorbinsav kvantitatív meghatározásának lehetőségét.

A könnyen bomló aszkorbinsav extrahálásához a legalkalmasabb oldószer megválasztása volt első feladatomban, amely amellel, hogy az oxidatív bomlást gátolja, a későbbiekben nem befolyásolja az oszazonképződés sebességét. A továbbiakban tanulmányozni kívántam, hogy a megfelelően bizonyult oldószerrel történő kivonás alatt a hőfok, a különféle természetes anyagok kivonatában jelen levő oszazonképző anyagok és az ezek egy részének eltávolítására alkalmazott derítószer milyen mértékben befolyásolják az oszazon képződését. Majd vizsgáltam az oszazon oldhatóságának kérdését, mivel a tökéletes elválasztáshoz szükséges kromatográfiás eljárás előtt az elkülönítés első fázisa a kristályos anyag centrifugálása, illetve szűrése útján megy végbe és így a jelen levő különféle anyagoknak az oldhatóságra gyakorolt hatása nem lehet közömbös a keletkezett dehidro aszkorbinsavoszazon kvantitatív elkülönítésére.

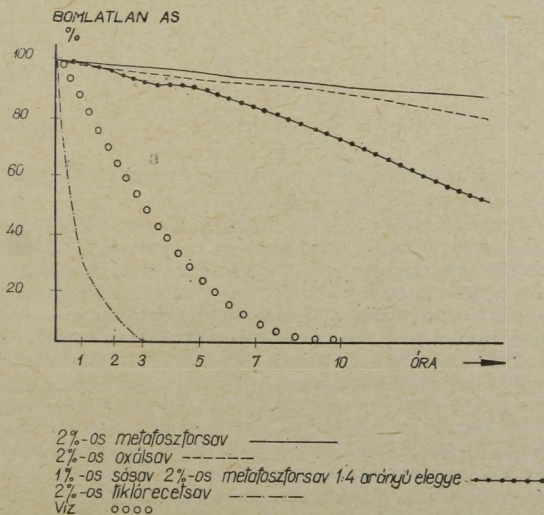
Végezetül vizsgálni kívántam azt a kérdést, hogy *Roe* és munkatársai által megadott, valamint az általam alkalmazott körülmények között az oszazonképzés módszere alkalmas-e az aszkorbinsavnak és a dehidroaszorbinsavnak egy-

más mellett való meghatározására, mivel az irodalomban már felmerült aggály (9) azzal kapcsolatban, hogy az oxidáció után oszazonként reagáló aszkorbinsav izomereknek (aszkorbinsav, dehidroaszkorbinsav és diketogulonsav) 2-4-dinitrofenilhidrazinnal történő reakciója, valamint a szétválasztáshoz szükséges redukciós, illetve oxidációs eljárások alatt végbemenő átalakulása nem mindenben felel meg az elméletben lefektetett elveknek, még modell oldatoknál sem.

A fent felsorolt kérdések tisztázása után egyszerű papírkromatográfiás elválasztási módszer kidolgozása látszott célszerűnek a dehidro aszkorbinsavoszazonnak a cukorfélék oszazonjaitól való elválasztására és a C vitamin tartalom mennyiségi meghatározására.

Az extrahálószer megválasztása és az oszazonképződésre való befolyása

Az aszkorbinsav kivonására általában alacsony pH-jú oldatokat használnak, amelyek amellet, hogy az analitikai eljárásokhoz a megfelelő közeget biztosítják, az oxidáz enzim működését is gátolják és bizonyos fokig derítik is az oldatot. Leggyakrabban ecetsavat, szulfoszalicilsavat és oxálsavat használnak erre a célra. Egyes szerzők (10) — főleg sötét színű anyagok extrahálásánál — előnyben részesítik a 4–10%-os triklórecetsavval történő oldást, mások a metafoszforsavat találják megfelelőnek (11). A különféle savaknak az autoxidációra gyakorolt hatását az 1. ábrán láthatjuk. *Schwartz* és *Günther* (12) adatai szerint az oxálsav-metafoszforsav és a sósav-metafoszforsav elegy bizonyult a legmegfelelőbb védőhatásúnak az aszkorbinsav bomlás megakadályozására. Mivel az irodalomban ellentmondó adatokat is találhatunk, — így pl. *Barker* és *Mapson* (13) a metafoszforsav alkalmazása esetében mutatott ki C-vitamin veszteséget, míg *Baker* és társai (14) fény hatásának kitett oxálsavas aszkorbinsav oldatban is bomlást figyeltek meg — szükségesnek tartottam vizsgálatokat végezni annak eldöntésére, hogy az általában alkalmazandó módszerrel a leggyakrabban használt oxálsavas és meta-



1. ábra

foszforsavas oldás között mutatható-e ki különbség az aszkorbinsav stabilitásában.

A vizsgálatokat 100–100 µg aszkorbinsavat tartalmazó 1%-os oxálsavas, illetve 5%-os frissen készített metafoszforsavas modelloldatokkal végeztem. Az aszkorbinsav oldatokat különböző hőfokon, különböző ideig tartó hőhatásnak tettem ki és vizsgáltam az el nem bomlott C-vitamin mennyiségét az eredeti C-vitamin tartalom százalékában kifejezve. A megmaradó aszkorbinsav mennyiségének meghatározására az eredeti Roe-féle módszert használtam, a keletkezett oszazonszapadéknak 85%-os kénsavval történő oldása után végzett extinkció méréssel. A modelloldatnál ugyanis a csapadék eltávolítását nem láttam szükségesnek, mivel elővizsgálataim szerint – amelyeket papírkromatográfiásan végeztem – a hőkezelés hatására bekövetkező aszkorbinsav bomlás alatt nem keletkezett az extinkció mérését zavaró anyag, egyéb idegen oszazon jelenlétével pedig ilyen körülmények között nem kellett számolnom.

Az 1. táblázatban a hőkezelés után visszamaradó aszkorbinsav mennyiségeket tüntettem fel. A megadott értékek 4–4 párhuzamos meghatározás középértékei, a standard eltérések a ± 4%-ot nem haladják meg. Mint látható 37 C°-on, – amelyen a reakció is végbemegy – nincs lényeges különbség az oxálsavas és metafoszforsavas oldatban mért aszkorbinsav bomlás között. Ezen a hőfokon 4 órás állás után is csak néhány százalékos veszteséggel kell számolnunk mindkét közegben, a jelentéktelen mértékben fellépő bomlás miatt.

1. táblázat

Hőkezelés után visszamaradó aszkorbinsav mennyisége az eredeti aszkorbinsav tartalom százalékában

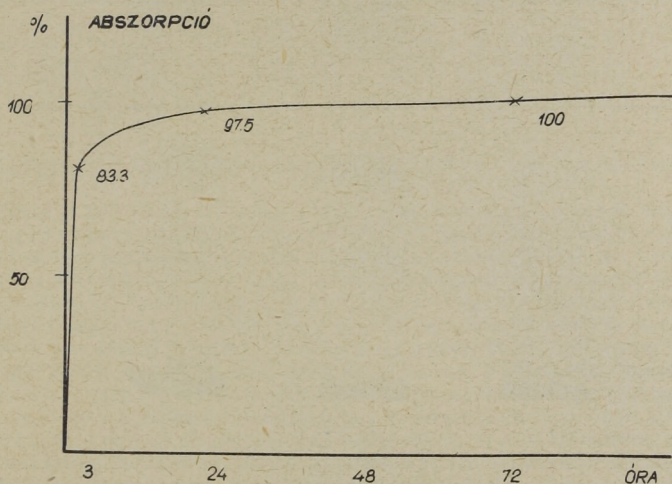
Hőmérséklet C°	Oldószer	A hőbehatás ideje				
		30'	60'	120'	180'	240'
37	Oxálsav	100	98	98	97	97
	Foszforsav	100	98	98	97	97
50	Oxálsav	100	99	98	96	95
	Foszforsav	100	96	93	90	82
70	Oxálsav	98	93	89	87	85
	Foszforsav	93	87	68	45	37
100	Oxálsav	73	63	20	18	9
	Foszforsav	32	18	–	–	–

Nagyobb hőmérsékleten nem azonos hatású a két vizsgált sav az aszkorbinsav stabilizálásában. A hőmérséklet emelése sokkal nagyobb mértékben növeli a C-vitamin bomlását foszforsavas közegben, mint oxálsavasban. Míg 4 óra alatt 50 C°-on oxálsav jelenlétében csak 5%-os veszteséget találtunk, ugyanilyen körülmények között metafoszforsavas oldatban a vitaminnak mintegy 18%-a elbomlik. A hőmérséklet további emelésével a foszforsav gyengébb stabilizáló hatása fokozott mértékben figyelhető meg, így 4 óra után mintegy fele mutatható ki az azonos módon kezelt oxálsavas oldatban visszamaradó aszkorbinsavnak. Modelloldatban a tiszta aszkorbinsav 100 C°-on igen rövid idő alatt nagyfokú bomlást szenved, fél óra alatt közel 30%-a bomlik el oxálsavas- és 70%-a foszforsavas oldatban. Oxálsav jelenlétében 2 óra múlva 80%-os, foszforsavban pedig 100%-os veszteséggel kell számolnunk.

A kapott eredmények alapján az oxálsav kedvezőbb hatásának bizonyult az aszkorbinsav bomlás megakadályozására, ezért a továbbiakban az extrakciót minden esetben 1%-os oxálsavval végeztem.

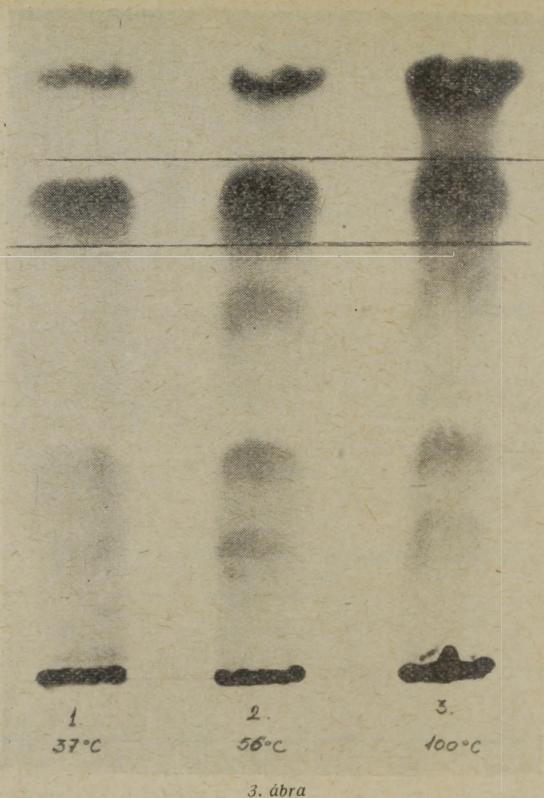
A hőfok, a reakció-idő és az oldószer hatása az oszazonképzés reakció-sebességére

Mint az már ismeretes, a dehidroaszorbinsavoszazon keletkezése az eredeti eljárásban megadott 3 órás reakció idő alatt 37 C°-on korántsem tekinthető quantitativnak (15). A reakció lényegesen kisebb sebességgel ugyan, de még hosszú ideig tovább folyik. Erre vonatkozó vizsgálataimmal – amelyeket a már ismertett elgondolás alapján ugyancsak az extinkció mérésével végeztem – megállapítottam, hogy 37 C°-on az alkalmazott körülmények között az oszazonképződés befejezéséhez mintegy 72 óra szükséges. A reakció idő további növelése esetében már oszazonkiválás nem figyelhető meg. A 2. ábra alapján megállapítható, hogy az összes keletkező oszazon mennyiségének mintegy 83%-a csapódik ki az első 3 óra alatt, további 21 óra alatt kb. 14%-a és újabb 48 óra alatt a fennmaradó 3%.



2. ÁBRA

A reakció sebessége a hőmérséklet emelésével természetesen nagymértékben növelhető. Luzzatto és munkatársai (16) az azonos extinkciók eléréséhez szükséges hevítési időt vizsgálták különböző hőfokon. Modelloldattal végzett méréseik alapján az oszazon keletkezésének és így a meghatározásnak az ideje is lényegesen rövidíthető. Polk és munkatársai (17) állati szövetekben végzett vizsgálataik alapján azonosnak találták az extinkciót, ha 37 C°-on 3 óráig, 56 C°-on 1 óráig vagy 100 C°-on 10 percig tartó reakcióidőt alkalmaztak. Növényi anyagok kivonatában azonban főképpen hőkezelt termékeknél a rövidített eljárás saját tapasztalataim szerint nem alkalmazható. A 3. ábra paradicsomkivonatokban különféle hőfokon és reakció-idő alatt képződött oszazonok papírkromatográfiás képét mutatja. Jóllehet a Roe-féle eljárás szerint mért extinkcióban nem találtam lényeges különbséget a kétféle hőfokon végzett reakció esetében, az ábrán látható, hogy dehidroaszorbinsav-oszazonjénel kisebb R_f értékkel elváló sárga színű cukor-oszazonok keletkezésének sebességét a hőfok emelése sokkal nagyobb mértékben fokozza, mint a dehidroaszorbinsav-oszazonét. Így a hőfok emelése a zavaró anyagok mennyiségének viszonylag nagyobb mértékben való növekedését vonja maga után.



3. ábra

E vizsgálataim alapján tehát megállapítottam, hogy a dehidroaszcorbinsav-oszazon keletkezéséhez a 37°C kedvezőbb, mivel ezen a hőfokon viszonylag lassú a cukrok oszazonjának képződése.

A tiszta aszcorbinsavból oxidáció után nyert dehidroaszcorbinsav-oszazonjának különféle hőfokon történő előállításával egyébként arra a Schaffert (18) által felvetett kérdésre is feleletet tudtam adni, amely szerint a dinitrofenilhidrazinnal történő reakció 50°C alatt túlnyomóan diketogulonsav formában megy végbe, a hőmérséklet emelése a reakciókészséget a dehidroaszcorbinsav felé tolja el és 100°C-nál már csak az utóbbi reagál. Vizsgálataim szerint a különböző hőfokokon előállított oszazonok között kromatográfias úton kimutatható különbség nincsen, amely jelenség a később részletesen tárgyalandó izomerképződések vizsgálata alapján ennek a feltevésnek valószínűségét nem igazolja.

A továbbiakban az oxálsav jelenlétének a reakció sebességére való befolyását tanulmányoztam. A kérdés tisztázása céljából a reakcióelegy 1/4 részét kitevő (1 ml) aszcorbinsav oldatot különféle savakkal, ecetsavval és oxálsavval készítettem, ez utóbbit háromféle koncentrációban. Az oldatokhoz 2–2 ml 4%-os triklórecetsavat és 1–1 ml reagenst adtam. A 2. táblázatban feltüntetett adatok

szerint az aszkorbinsavból brómos oxidáció után előállított oszazon képződésének sebességére a vizsgált koncentrációkban az oxálsavnak nincs befolyása a 3 órás reakció idő alatt. Az extinkciók a különféle koncentrációkban alkalmazott oxálsav esetében 5%-on belül megegyeznek az ecetsavas oldatnál mért értékekkel.

2. táblázat

Szerves savak befolyása az aszkorbinsavból brómos oxidáció után előállított oszazon extinkciójára

Oldószer	E			
1%-os ecetsav	0,680	0,685	0,712	0,700
1%-os oxálsav	0,700	0,690	0,709	0,690
2%-os oxálsav	0,692	0,710	0,699	0,705
5%-os oxálsav	0,686	0,686	0,680	0,690

Viszkózus oldatok derítésére használt alkohol befolyása az oszazonképződésre

Egyes – főleg nagy fehérje- és keményítőtartalmú – anyagok kivonatánál szükség van a nagymolekulájú anyagok eltávolítására, mivel enélkül az előállított oszazonok nem különíthetők el sem szűréssel, sem centrifugálással. Vizsgálataim szerint az 1%-os oxálsav oldatnak és 96%-os etanolnak 1:1 arányú elegyéből a nagymolekulájú kolloidok egy része kiválik és az oldat viszkozitása olyan mértékben megváltozik, hogy a szűrés, vagy centrifugálás akadály nélkül elvégezhető.

Modelloldatokon végzett extinkciómérésekkel megállapítottam, hogy az oszazonképződés sebességét az alkohol jelenléte nem befolyásolja. Mivel azonban az etanol az oszazon bizonyos mértékben oldja, szükség volt annak megállapítására is, hogy a keletkezett oszazon teljes mennyiségben kivált-e és szűréssel eltávolítható-e a reakció elegyéből, vagy pedig egy része az oldatban marad. A kérdés tisztázására modelloldat helyett cukorféléket is bőségesen tartalmazó sűrített paradicsomot választottam, hogy egyben a reakciónál zavaró anyagoknak az oszazon oldhatóságára gyakorolt hatását is figyelembe vegyem.

Előzetes méréseim szerint a reakció elegy végtérfogatára számított 25% alkohol jelenlétében a keletkezett oszazon csapadék mennyisége nem csökkent, ezért ennél a koncentrációnál vizsgáltam a kérdést több oldalról. Megvizsgáltam, hogy sok zavaró anyagot tartalmazó kivonatban a hozzáadott különböző mennyiségű tiszta aszkorbinsav milyen eltérésekkel határozható meg. Ezért egyfelől az extinkciómérés alapján tanulmányoztam, hogy adott kísérleti körülmények között alkoholos közegben az oszazon keletkezésének reakciósebességét egyéb, az oldatban jelen levő vegyületek milyen mértékben befolyásolják. Másfelől vizsgáltam, hogy a szüredékbe jutó anyagok extinkcióját a hozzáadott aszkorbinsavból oxidáció után képződő oszazon megváltoztatja-e. Méréseim alapján, amelyeket a 3. táblázatban foglaltam össze, megállapítható, hogy a hozzáadott aszkorbinsav kielégítő pontossággal meghatározható, tehát az alkohol jelenléte nem befolyásolja az oszazonképződési reakció sebességét.

A 4. táblázatban a szüredék extinkciója látható az eredeti kivonatból előállított oszazon eltávolítása után. Mellette az eredeti aszkorbinsav tartalommal kb. azonos, illetve nagyobb mennyiségű hozzáadott aszkorbinsavat nyert szűrletek extinkcióit, tüntettem fel. Az extinkciók azonos nagysága azt bizonyítja, hogy a vizsgált körülmények között a jelenlevő anyagok nem befolyásolják, de a hidro aszkorbinsav oszazon oldhatóságát.

Aszkorbinsav meghatározása alkohol jelenlétében

Aszkorbinsav az eredeti oldatban μg	Hozzáadott aszkorbinsav μg	Talált aszkorbinsav %	Hozzáadott aszkorbinsav μg	Talált aszkorbinsav %
17,5	10	106,0	15	95,0
23,0	10	101,5	15	113,0
16,3	10	89,3	15	107,0
50,6	10	90,6	50	106,1
44,2	10	107,7	50	99,0
66,3	10	96,3	50	101,6

4. táblázat

A dehidro aszkorbinsav-oszazon kiválásának vizsgálata

Az eredeti kivonattól kapott szűrlet extinkciója	Az aszkorbinsavval dúsított kivonatból kapott szűrletek extinkciója		
	Hozzáadott aszkorbinsav		
	10 μg	15 μg	30 μg
0,215	0,227	0,217	0,220
0,322	0,335	0,330	0,328
0,228	0,225	0,238	0,233

A dehidroaszkorbinsav meghatározásának lehetősége oszazonképzés alapján

Az eredeti Roe-féle módszer közvetlenül a dehidroaszkorbinsav meghatározására is alkalmazható (15). További vizsgálataimat abban az irányban is kiterjesztettem, hogy a kioldáshoz alkalmazott sav minősége és koncentrációja befolyásolja-e az aszkorbinsav dehidroaszkorbinsav átalakulást. Frissen készített aszkorbinsav oldatot közvetlenül, tehát brómos oxidálás nélkül reagáltattam. (Az extinkció értékek itt is 50 μg aszkorbinsavra vonatkoznak, az összes aszkorbinsav vizsgálatoknál megadott koncentráció és térfogatviszonyok mellett.)

Az adatokból, amelyeket az 5. táblázatban láthatunk, két következtetést lehet levonni. Míg a dehidro aszkorbinsavval végzett reakciónál az oxálsavnak semmi befolyása sem volt az oszazonképződés reakciósebességére az aszkorbinsav dehidroaszkorbinsav átalakulást nagyobb koncentrációban katalizálja.

A táblázatból másfelől az is kitűnik, hogy az eredeti Roe-módszer szerint a dehidroaszkorbinsavnak aszkorbinsav mellett történő meghatározása csak nagyobb dehidroaszkorbinsav koncentráció esetén ad reális értéket, mivel a nem oxidált aszkorbinsavnak mintegy 7–8%-a szintén dehidroaszkorbinsavvá alakul át az alkalmazott körülmények között. Ez a jelenség egyébként az irodalomból ismert (19); aszkorbinsav molekulánként 3 molekula fenilhidrazin alkalmazása esetén először az aszkorbinsav oxidációja következik be, majd 2 molekula fenilhidrazinnal végbemegy az oszazon képződés. Így a kísérleti feltételek mellett a reagens nagy fölöslege lehetőséget nyújt oxidálószer alkalmazása nélkül is az átalakulásra.

A Roe-féle módszer a dehidroaszkorbinsav meghatározásánál a reagensfölösleg okozta aszkorbinsav oxidáció kiküszöbölésére tiokarbamidot alkalmaz. Az aszkorbinsav és dehidroaszkorbinsav együttes meghatározásánál a fölös oxidálószer brómot a 2-4-dinitrofenilhidrazin reagens hozzáadása előtt ugyancsak tiokarbamiddal reagáltatja (néhány csepp 1%-os oldat), amellyel a fent említett

Szerves savak befolyása az oxidálószer nélküli aszkorbinsav – dehidroaskorbinsav átalakulásra

Oldószer	Extinkció			
1 %-os ecetsav	0,051	0,051	0,060	0,061
1 %-os oxálsav	0,060	0,066	0,065	0,062
2 %-os oxálsav	0,072	0,069	0,070	0,069
5 %-os oxálsav	0,110	0,110	0,116	0,120

oxidáció megakadályozására enyhe redukáló közeget igyekszik biztosítani (20). Az 5. táblázat alapján azonban kiderül, hogy az á mennyiségű – rendszerint 0,05–0,1 ml – 1%-os tiokarbamid oldat, amely a bróm főlöslegét eltünteti, nem tudja megakadályozni a dinitrofenilhidrazin oxidáló hatását.

Annak eldöntésére, hogy a tiokarbamid mennyisége milyen mértékben növelhető anélkül, hogy a már oxidált formában levő dehidroaskorbinsavat vissza-redukálná, különböző mennyiségű tiokarbamidot adtam aszkorbinsav és dehidroaskorbinsav oldatokhoz. A kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze, amelyben 100 µg/ml tiokarbamid koncentrációjú oldat extinkciójához viszonyítva adtam meg oxálsav, ill. ecetsav jelenlétében a dehidroaskorbinsav-oszazon extinkcióját. A vonatkoztatási tiokarbamid koncentrációja a Roe-féle eredeti eljárásban leírtak felett meg.

A 6. táblázatból kitűnik, hogy tiokarbamid hiányában oxidálószer alkalmazása nélkül is nagymértékű az aszkorbinsav dehidroaskorbinsav átalakulás. Tiokarbamid jelenlétében ugyanis akár ecetsavas, akár oxálsavas közegben ment végbe a reakció – kivéve az igen nagy, 5%-os oxálsav koncentrációt – az aszkorbinsavnak csak mintegy 7–8%-a alakult át dehidroaskorbinsavvá oxidálószer előzetes alkalmazása nélkül. Tiokarbamid hiányában ez az érték oxálsav jelenlétében 70% körül van, ecetsavas közegben pedig 60%-ot ér el.

Tiokarbamid hatása az oszazonképződésre

Vizsgált vegyület	tiokarbamid mennyisége µg/ml	Extinció alapján meghatározott aszkorbinsav, ill. dehidroaskorbinsav a 100 µg/ml-es tiokarbamidot tartalmazó oldat aszkorbinsav tartalmára vonatkoztatva	
Aszkorbinsav	0	71,9± 1,9%	60,2± 2,4%
Dehidroaskorbinsav .	100	100,0%	100,0%
Dehidroaskorbinsav .	1 000	101,0± 2,3%	99,3± 3,3%
Dehidroaskorbinsav .	4 000	100,2± 4,2%	92,0± 4,6%
Dehidroaskorbinsav .	10 000	94,2± 3,5%	74,9± 2,8%

Kis mennyiségű tiokarbamid jelenléte (100–1000 µg/ml) nem csökkenti az oxidált forma mennyiségét sem oxálsav, sem ecetsav jelenlétében, így a tiokarbamid koncentrációnak az említett határok között való emelése nem nyújt teljes védelmet az aszkorbinsav dehidroaskorbinsav átalakulással szemben. Nagyobb mennyiségű tiokarbamid (10 000 µg/ml) oxálsav jelenlétében viszont a már oxidált termék kis részét, mintegy 6%-át visszaredukálja. Ecetsav jelenlétében ez a redukáló hatás nagyobb mértékben érvényesül, 10 000 µg/ml-es tiokarbamid kon-

centráció mellett a dehidroaszorbinsavnak mintegy 25%-a visszaredukálódik. Ez a megállapítás egyébként összhangban van azzal a már említett megfigyeléssel, hogy oxálsav jelenlétében az aszorbinsav – dehidroaszorbinsav átalakulás nagyobb mértékű, mint ecetsav alkalmazásakor.

Ezen vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az oxidáláshoz szükséges bróm fölöslegének eltávolítására alkalmazandó tiokarbamid mennyisége csak adott határok között ingadozhat és hogy annak megengedhető mennyisége függ a jelen levő savféleségtől.

I R O D A L O M

- (1) Tillmans J.: Z. U. L. 54, 33, 1927.
- (2) Schulek F., Floderer J.: Angew. Chem. 52, 616, 1939.
- (3) Spanyol P., Kiszely M., Demel J.: Magyar Kémiai Folyóirat 59, 43, 1952.
- (4) Schmall M., Pifer Ch. W., Wollisch E. G.: Anal. Chem. 25, 1487, 1953.
- (5) Roe J. H., Kuether C. H.: Science, 95, 77, 1942.
- (6) Zobel M.: Z. U. L. 116, 477, 1962.
- (7) Roe J. H., Kuether C. H.: J. Biol. Chem., 177, 399, 1943.
- (8) Szöke K.: ÉVIKE, 6, 121, 1960.
- (9) Tewari C. F.: J. Food Sci, 26, 11, 1961.
- (10) Birch Th., Harris L. J., Ray S. N.: Biochem. J. 27, 590, 1933.
- (11) Fujita A., Ebihara T.: Biochem. Z., 290, 172, 1936.
- (12) Schwarze W. K., Günther E.: Pharmazie, 1, 153, 1946.
- (13) Barker J., Mapson L. W.: New Phytologist, 58, 58, 1959.
- (14) Baker L. C., Lampitt L. H., Wittenberg E.: J. Sci. Food Agric., 6, 682, 1955.
- (15) Roe J. H., Mill M. B., Oesterling M. J., Damron C. M.: J. Biol. Chem., 174, 201, 1948.
- (16) Luzzatto L., Dalla Valle C., Colajacomo A.: Bollettino della Societe Italiano di Biologica Sperimentale, 33, 564, 1957.
- (17) Polk A., Flanagan T. L., Van Loon R. J.: Clinical Chemistry, 6, 558, 1960.
- (18) Schaffert R. R., Kingsley G. R.: J. Biol. Chem. 212, 59, 1957.
- (19) Euler H., Eistert B.: Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate. F. Enke, Stuttgart, 1957.
- (20) Roe J. H., Oesterling J.: J. Biol. Chem., 152, 511, 1944.

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА „С“ ОТДЕЛЕНИЕМ ОСАЗОНОВ ПУТЕМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ, I. ФАКТОПЫ ВЛИЯНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ОСАЗОНОВ

К. Сотьори

Автор изучал влияние скорости реакции на образование осазонов образующимся дегидроаскорбиновой кислотой 2—4 динитрофенилидрозимом.

Установил, что если в модельных растворах повышением температуры время реакции возможно уменьшить с 3-х часов на 10 минут, то в экстрактах растительного материала, повышением температуры скорость образования прочих сахарных осазонов, поэтому сокращение времени реакции, повышением температуры, не советуется. В примененной концентрации налмчие щавелевой кислоты оказывает влияние на определение аскорбиновой кислоты, в больших концентрациях повышает образование осазонов без окислителя, непосредственным влиянием реагента.

Нализие тиокарбамида в концентрации указанной в литературе, не влияет на преобразование аскорбиновой кислоты и дегидроаскорбиновой кислоты, но в больших концентрациях, главным образом в среде уксусной кис-

лоты, легко способствует редукции обной части уже окисленной аскорбиновой кислоты.

Для осветления экстрактов с большим содержанием крахмала и белка самым подходящим является смесь 1%-ной щавелевой кислоты и этанола в соотношении 1:1; этот смесь не влияет ни на скорость реакции образования осазонов, ни на растворимость осазонов.

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES VITAMIN C GEHALTES DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER OSAZONE I. BILDUNG DER OSAZONE BEEINFLUSSENDE FAKTOREN

K. Szotyori

Die Verfasserin studierte den Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Bildung des mit 2-4-Dinitrophenylhydrazin gebildeten Osazons der Dehydroascorbinsäure.

Sie stellte fest, dass – während in Modellösungen durch Erhöhung der Temperatur die Reaktionszeit von 3 Stunden auf 10 Minuten vermindert werden kann, – in pflanzlichen Extrakten mit dem Ansteigen der Temperatur die Bildungsgeschwindigkeit anderer Zuckerosazone diejenige des Osazons der Dehydroascorbinsäure übertrifft und deshalb die Kürzung der Reaktionszeitdauer durch Erhöhung der Temperatur nicht empfehlenswert ist. Anwesenheit von Oxalsäure in der verwendeten Konzentration beeinflusst die Bestimmung der Ascorbinsäure nicht, in höherer Konzentration hingegen erhöht sie die ohne Oxidationsmittel, unmittelbar durch das Reagens hervorgerufene Osazonbildung.

Anwesenheit von Thiocarbamid in der von der Fachliteratur angegebenen Konzentration beeinflusst die Umwandlung der Ascorbinsäure-Dehydroascorbinsäure nicht, in höherer Konzentration jedoch, besonders in einem essigsäuren Milieu verursacht es äusserst leicht die Reduktion eines Teiles der bereits oxidierten Ascorbinsäure.

Zur Klärung von Extrakten mit hohem Stärke- und Eiweissgehalt erwies sich ein Gemisch von 1%-iger Oxalsäure und Aethanol 1:1 für geeignet: dieses beeinflusst weder die Geschwindigkeit des Osazonbildungsvorganges, noch die Löslichkeit des Osazons.