

Eljárás C-vitamin-tartalom meghatározására az oszazonok papírkromatográfiás elválasztása útján

II. Az oszazonok papírkromatográfiás elválasztása és az aszkorbinsav mennyiségi meghatározása

SZOTYORI KATALIN

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Előző munkámban (1) közölt eredmények alapján igazoltnak tekinthető, hogy az aszkorbinsav dehidroaszkorbinsavvá történő oxidációja után a dehidroaszkorbinsav-oszazon keletkezése és kiválása a vizsgált körülmények között hőkezelt vagy besűrített anyagok kivonatában – melyek gyakran sok zavaró anyagot tartalmaznak – hasonlóan megy végbe, mintha tiszta aszkorbinsav oldatból indulunk ki. További vizsgálataim ezért arra irányultak, hogy a kristályos állapotban kiváló oszazon mennyiségét meghatározzam. A mennyiségi meghatározás előtt szükségessé vált az egyidejűleg keletkező cukoroszazonok elválasztása.

A Roe-féle eljárással (2) előállított dehidro aszkorbinsavoszazon elkülönítésével először *Probst* és munkatársa (3) foglalkozott, akik bázikus alumíniumfoszfát oszlopon több színes oszazont izoláltak állati szövetek kivonatából. *Vastag* és munkatársa (4) ugyancsak 1950-ben Alukol elnevezésű készítmény segítségével választottak el hőkezelt növényi anyagok kivonatából oszazonokat. *Gordon* és *Noble* (5) 1959-ben magnéziumfoszfát, *Mapson* (6) 1961-ben savas alumíniumoxid-oszlop segítségével különítette el dehidro aszkorbinsavoszazonját egyéb anyagokétól.

Az adsorbens beszerzés nehézségeinek elkerülésére papírkromatográfiás eljárást kívántam alkalmazni az elválasztáshoz, amelyre eljárás az irodalomban nem ismeretes. *Patschky* (7) 1952-ben megjelent rövid közleményében kloroform-klórbenzol elegyét ajánlja erre a célra az arányok megjelölése nélkül. Vizsgálataim szerint a javasolt oldószerkeverék a legkülönbözőbb arányban alkalmazva sem biztosítja a kívánt elválasztást, mivel néhány 5 és 6-szénatom számú cukorból képződő sárga színű oszazon R_f értéke igen közel esik a dehidro aszkorbinsav-oszazonéhoz és így a kiértékelést zavarja. Az általam választott oldószerkeverékek segítségével és a *Lindner* (8) által bevezetett kétszeres futtatással tökéletes elválasztást sikerült elérnem, amely a mennyiségi kiértékelést lehetővé teszi.

A módszer leírása

A módszer elve: növényi vagy állati szövetből 1%-os oxálsav és 96%-os etanol azonos térfogatú elegyével készített homogenizátum alikvot részéből a dehidroaszkorbinsav meghatározása esetén közvetlenül, az aszkorbinsav és dehidroaszkorbinsav együttes mennyiségének mérése esetében brómos vízzel történő oxidáció után oszazont képezünk *Roe* (4) eljárása szerint. Az eredeti módszertől eltérően a kiváló oszazonokat leszűrjük, majd a reagens főlöslegnek savas kimosással történő eltávolítása után etilacetátban oldjuk és a cukorféleségek oszazonjaitól papírkromatográfia segítségével választjuk el. Az elválasztott oszazon mennyiségét denzitométerrel 0,1–0,6 μg határok között közvetlenül a

papíron meghatározhatjuk. Denzitóméter hiányában a 0,5–2,0 μg aszkorbinsavnak megfelelő foltokat kivágjuk, az elkülönített oszazonokat kioldjuk és az oldat fénylevelését mérjük.

Az oszazon előállítása: oxálsav (1%-os) és etilalkohol 1:1 arányú elegyével ismert koncentrációjú homogenizátumot készítünk. A homogenizátumból centrifugálással vagy szűréssel nyert tiszta kivonat 5 ml-e legalább 100–150 μg C-vitamint tartalmazzon. Aszkorbinsav és dehidroaszorbinsav együttes meghatározása esetében 5 ml kivonathoz néhány csepp brómos vizet adunk halvány sárga szín megjelenéséig, majd 1–2 perc után a felesleges brómot néhány csepp 1%-os (vizes) tiokarbamid oldat hozzáadásával távolítjuk el, amikor is az oldat sárga színe eltűnik. A tiokarbamid főlöslég hozzáadását kerülni kell. Ezután 5 ml 2%-os 2,4-dinitrofenilhidrazin oldatot (9 n kénsavban) adunk a reakcióelegyhez. Összerázás után három órán át 37 C°-on tartjuk, majd vízfürdőbe helyezve szobahőmérsékletre hűtjük a reakcióelegyet és a kivált csapadékot G4-es jelzésű szűrőn – az oldat cseppenként történő eltávolítását biztosító vákuum alkalmazása mellett – lassan leszűrjük. A csapadékot 4,5 n kénsavval addig mossuk, míg a lecsepegő oldat szintelen lesz, majd a savat desztillált vízzel moszuk ki. A csapadékot a szűrőről etilacetáttal oldjuk le, szivatas nélkül. Az etilacetátos oldatot ismert térfogatra (10–15 ml) töltjük fel.

Dehidroaszorbinsav meghatározása esetében a kivonat brómos oxidálása elmarad, azonban a reagens hozzáadása előtt 0,03–0,06 ml tiokarbamid oldat hozzáadása ebben az esetben is szükséges, mivel ez akadályozza a jelen levő aszkorbinsavnak dehidroaszorbinsavvá történő átalakulását. A továbbiakban teljesen a leírt módon járunk el. A várhatóan kisebb dehidroaszorbinsav mennyiségnek megfelelően célszerű azonban töményebb kivonathól kiindulni.

A kromatográfiás elválasztás: A vizsgálandó etilacetátos oldat alikvot részét, valamint megfelelő mennyiségű összehasonlító oldatot mikropipettával Schleicher-Schüll 2043/b jelzésű papírra viszünk. Az oldószer elpárolgását meleg levegővel (hajszáritó) segítjük elő.

A kromatogram kifejllesztése felfelé történik.

Az első futtatás diklórmetán: klórbenzol 60:40 arányú elegyében történik. Amíg az oldószerfront kb. 16 cm-re fut, és a dehidroaszorbinsavoszazon néhány zavaró anyagtól kísérve kb. R_f 0,25 értékkel elválik, a zavaró anyagok egy része kisebb R_f értékkel mozdul el, illetve a startvonalban marad. Szobahőmérsékleten történő szárítás után a dehidro aszkorbinsavoszazon foltok alatt kb. 1 cm-rel levágjuk a papírt a zavaró anyagok foltjaival. A második futtatás hangyasav, szízforsav és víz 40:20:40 arányú elegye. A futtatást addig végezzük, amíg a lazac színű oszazon teljesen elkülönül a kisebb R_f értékű cukoroszonoktól, de még nem éri el az előző oldószerkeverékben az oldószerfronttal együtt futó reagensfőlöslég foltját.

Igen nagy mennyiségű cukrot tartalmazó anyagoknál (szörpöknél) az első oldószerben történő futtatás után keletkezett sárga cukoroszon foltok a kromatografáló papírt úgyszólván az oldószerfrontig teljesen betöltik. Ilyen esetben a dehidro aszkorbinsavoszazonnak megfelelő sávot a papírról kivágjuk, majd egy kb. 16 cm-es szűrőpapírsávra rávarrjuk. Ily módon a második futtatás alatt a dehidro aszkorbinsavoszazon teljes mennyisége átkerül a tiszta szűrőpapírra és tökéletesen elválik az első futtatás során vele együtt futó sárga cukoroszon foltoktól.

Egyidejűleg analitikai tisztaságú aszkorbinsavból 1%-os oxálsavval megfelelő töménységű (pl. 2 mg/100 ml) oldatot készítünk. A frissen készült aszkorbinsav oldat 5 ml-ét ugyanúgy kezeljük, mint a vizsgálandó kivonatot. Az így kapott ismert mennyiségű aszkorbinsavnak megfelelő etilacetátos oldat szolgál összehasonlításként a kromatogramok mennyiségi értékelésénél.

A mennyiségi meghatározás kivitelezése

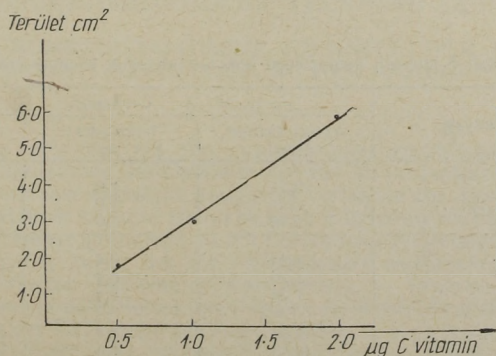
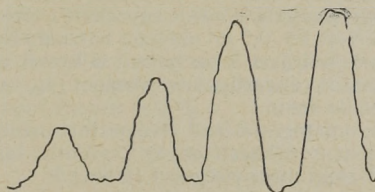
Kevés zavaró anyagot tartalmazó termékek vizsgálata esetében az 'első oldószerezrel kielégítő mértékben megtörténik a dehidro aszkorbinsavszapon elválása. Ilyen esetekben 0,1–0,6 μg aszkorbinsavnak megfelelő oszazon folt kiértékelése közvetlenül a papírról is történhet alkalmas denzitométer segítségével. Az 1. ábrán az Intézetünkben rendelkezésre álló Locarte (London) gyártmányú készülékkel felvett denzitogramot és annak segítségével szerkesztett kalibrációs görbét mutatom be.

Az 1. táblázat néhány zöldséfgéle denzitometriásan meghatározott C-vitamin-tartalmát mutatja. A módszer pontossága a hozzáadott és visszanyert C-vitamin mennyisége alapján $\pm 10\%$ körül van.

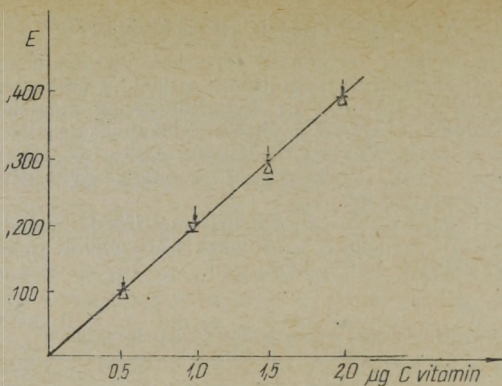
1. táblázat

Denzitometriásan meghatározott C-vitamin-tartalom

A vizsgált anyag	C-vitamin mg/100 g	C-vitamin		
		az extraktban μg	hozzáadott μg	talált %
Burgonya	12,0 \pm 3,0	25,5	25,0	112,0
Káposzta	18,3 \pm 5,5	16,3	25,0	90,6
Sóska	24,4 \pm 6,6	41,3	50,0	109,4
Pritamin	350,0 \pm 27,5	88,5	50,0	109,5
Paprika	120,8 \pm 12,5	57,7	50,0	96,5



1. Dehidro aszkorbinsavszapon denzitogramja és kalibrációs görbéje



2. Aszkorbinsav kalibrációs görbéje 2 ml diklórmetánban 5 cm rétegvastagság mellett S_{50} -es szűrővel mérve Pulfrich fotométeren

Sok zavaró anyagot tartalmazó termékek vizsgálata esetében a szükségessé váló második oldószerben történő futtatás után (vagy denzitométer hiányában az első oldószerben bekövetkező tökéletes elválás után), a kb. 3 cm-es sávban felvitt, 0,5–2,0 μg aszkorbinsavnak megfelelő oszazonfoltokat kivágjuk és kioldjuk. Háromszorosa adagolt kb. 2,5 ml diklórmentánnal az oszazon a papírról teljesen eltávolítható. A papírról leöntött egyesített oldatokat 2 ml-re töltjük fel mivel e papír nedvesítésére kb. 0,5 ml oldószer használódik el és az extinkciót Pulfrich fotométeren S_{50} -es szűrővel 5 cm hosszú mikroküvetében olvassuk le. Látszólag tiszta oldatoknál is célszerű a zavarósságot (S_{66} -os szűrővel) leolvasni és az értékelésnél figyelembe venni.

A 2. ábra a kettős kromatografálással elválasztott oszazon kalibrációs görbéje. A 2. táblázatban néhány hőkezelt anyag C-vitamin-tartalmát, valamint a hozzáadott és talált C-vitamin mennyiségeket láthatjuk.

A módszer hibája, a közvetlen denzitometráláshoz hasonlóan, nem haladja meg a $\pm 10\%$ -ot.

2. táblázat

A hozzáadott és talált C-vitamin mennyisége hőkezelt anyagok kromatográfiás vizsgálatánál

A vizsgált anyag	C-vitamin		
	az extraktban μg	hozzáadott μg	talált %
Eperdzsem	0,75	1,0	95,0
	0,75	1,0	98,0
	0,75	1,0	103,0
Ribizkedzsem	1,20	0,4	112,5
	1,20	0,4	90,0
	1,20	0,4	93,5
Sárgabarackpüré	0,58	0,4	97,5
	0,58	0,4	92,5
	0,58	0,4	111,0

- (1) Szotyori Katalin: ÉVIKE, 13.
- (2) Roe J., Kuether J.: J. Biol. Chem., 147, 399, 1943.
- (3) Probst G. W., Schultze M. O.: J. Biol. Chem., 187, 453, 1950.
- (4) Vastag G., Varga E.: Magyar Kémiai Folyóirat 56, 234, 1950.
- (5) Gordon J., Noble I.: Food Res. 24, 1, 1959.
- (6) Mapson L. W.: Biochem. J. 80, 459, 1961.
- (7) Patschky A.: Z. Angew. Chem. 62, 50, 1952.
- (8) Lindner K.: Die Nahrung, 3, 299, 1959.

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

II. ОТДЕЛЕНИЕ ОСАЗОНОВ СПОСОБОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕМ КОЛИЧЕСТВА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

К. Сотьори

Автор разработал способ отделения осазонов дегидроаскорбиновой кислоты помощью бумажной хроматографии образующихся окислинием из аскорбиновой кислоты и способ определения их количества. Осазоны полученные методом Роэ в растворе этилового спирта после фильтрации отделяются помощью бумажной хроматографии в двух навесках растворителя. Количество осазона соответствующее аскорбиновой кислоте — совершенно отдельно от мешающих веществ — отделяются помощью денситометра непосредственно из бумаги или извлечением пятен помощью денситометра и изменением экстинкции.

Этим методом автор из материала содержащего большое количество мешающих веществ определили добавленное количество витамина „С” с максимальным расхождением $\pm 10\%$.

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES VITAMIN C-GEHALTES DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER OSAZONE

II. PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER OSAZONE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ASCORBINSÄURE

K. Szotyori

Verfasserin arbeitete ein für papierchromatographische Trennung und quantitative Bestimmung des Osazones der aus Ascorbinsäure durch Oxidation gebildeten Dehydroascorbinsäure geeignetes Verfahren aus. Die mit der Methode von Roe dargestellten Osazone trennt sie nach Filtrierung und Lösung in Aethylacetat papierchromatographisch, durch Chromatographierung in zwei Lösungsmittelsystemen. Die Menge des der Ascorbinsäure entsprechenden — von den störenden Substanzen vollkommen abgetrennten — Osazons kann vermittels eines Densitometers unmittelbar am Papier oder nach Herauslösung der Flecke durch Messung der Extinktion bestimmt werden.

Mit der Methode kann die zugefügte Vitamin-C Menge auch in-größere Mengen störender Substanzen enthaltenden-Stoffen mit einer Fehlergrenze von max. $\pm 10\%$ bestimmt werden.

METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE CONTENT OF VITAMIN C BY THE PAPER CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF THE OSAZONES IV.

SEPARATION OF THE OSAZONES BY PAPER CHROMATOGRAPHY AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASCORBIC ACID

K. Szotyori

A method suitable for the paper chromatographic separation and quantitative determination of the osazone of dehydroascorbic acid formed by the oxidation of ascorbic acid has been evolved by the author. The osazones prepared by the Roe method are filtered, dissolved in ethyl acetate, and separated in a paper chromatographic way, by chromatography with two solvent systems. The quantity of the osazone which can be completely separated from the interfering substances and which corresponds to the amount of ascorbic acid, is determined with the aid of a densitometer, directly on the paper or indirectly, by extracting the spots and measuring the extinction values of the extracts.

By the suggested method, the amount of vitamin C added, can be determined with a maximum deviation of $\pm 10\%$, even in the presence of great amounts of interfering substances.

PROCÉDÉ POUR LE DOSAGE DE LA TENEUR EN VITAMINE C PAR LA SÉPARATION DES OSAZONES PAR LA CHROMATOGRAPHIE DU PAPIER

II. SÉPARATION DES OSAZONES PAR CHROMATOGRAPHIE ET DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBINIQUE

K. Szotyori

L'auteur a élaboré un procédé pour la separation et le dosage par la chromatographie au papier de l'osazone de l'acide dehydroascorbinique qui se forme par l'oxydation de l'acide ascorbinique. Elle sépare après filtration, les osazones obtenur par le procédé *Roe*, dissous dans de l'acétate d'éthyle, par la chromatographie en deux mélanges de solvants. L'osazone correspondant à l'acide ascorbinique, qui se sépaare complètement des matières perturbatrices, peut être dose directement sur le papier par densitométrie ou bien par élution des taches et mesurage de l'extinction.

Par ce procédé l'on peut doser la quantité d'acide ascorbinique ajoutée avec un écart maximum de $\pm 10\%$ même dans des matières contenant des corps perturbateurs en grande quantité.