

C-vitamin gyors meghatározása élelmiszerekben rétegekromatográfiás úton I.

PETRÓ OTTÓNÉ*

Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet, Budapest

Érkezett: 1968. február 3.

A kromatográfiás eljárások egyre nagyobb teret hódítanak a vitaminok analitikájában is.

Elterjedésük oka az, hogy az élelmiszerek vitaminok mellett rendszerint sok olyan zavaró anyagot tartalmaznak, melyektől a hagyományos elválasztási módszerekkel csak nagyon körülményesen és csak részben lehet az értékes anyagot megszabadítani.

Számos kromatográfiás módszert dolgoztak ki a C-vitaminnak zavaró anyagoktól történő elválasztására is.

A szerzők egy része közvetlenül a vitamin tartalmú kivonatot kromatografálja. Ilyen *Strohecker* és munkatársai (1), *Herrmann és Zobel* (2, 3) papírkromatográfiás és *Crossland* (4) oszlopkromatográfiás eljárása. Ezeknél a módszereknél a C-vitamin megóvása okoz gondot. Emiatt az eljárások hosszadalmasak, körülményesek, különleges felszerelést igényelnek.

Más szerzők az askorbinsavat (AS) először oxidálják és a keletkező dehidroaskorbinsavnak (DAS) 2,4-dinitrofenilhidrazinnal nyert oszazonját (*Roe és Kuether* (5) választják el kromatográfiás úton a jelen levő cukorfészeségek oszazonjaitól és az egyéb karbonilok fenilhidrazonjaitól. Ezt a reakciót használják fel *Szöke Szotyori* (6) papírkromatográfiás, *Strohecker és Pies* (7), *Vuilleumier és munkatársai* (8) rétegekromatográfiás módszereiknél.

Az élelmiszerből a C-vitamin kivonására és az oszazonok leválasztására *Szöke Szotyori* (6) által javasolt eljárás megfelelőnek bizonyult. Módszerét azonban nehézkessé teszi a papírkromatográfiás eljárás, amellyel a DAS-oszazont a zavaró anyagoktól elkülöníti. Megfelelő elválasztást ugyanis csak úgy tud elérni, hogy a felvitt anyagot kétszer, két különböző oldószerkeverékben futtatja. Kísérleteink szerint az így kapott DAS-oszazon foltok alakja elnyúló, színe halvány és ezért nehezen értékelhetők (1. ábra).

Megpróbáltuk az oszazonok szétválasztását rétegen, a *Strohecker-ék* (7) által javasolt futtató keverékben is. Az eljárás így lényegesen rövidebb, de a foltok egybefolynak s a DAS-oszazon halvány rózsaszínű foltját erősen fedi a zavaró anyagok sárga színe (2. ábra).

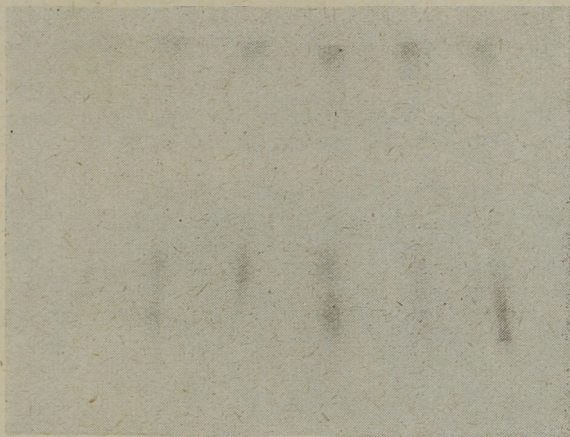
Vuilleumier és munkatársai (8) által leírt módszer olyan hosszadalmas, azonkívül anyag és felszerelés igényes, hogy sorozatvizsgálatokra semmiképpen sem alkalmas.

Célul tűztük ki olyan rétegekromatográfiás eljárás kidolgozását, amely egyszerű, gyors és megbízhatóan elválasztja a DAS-oszazont a zavaró anyagok foltjaitól.

A módszer elve: Oxálsav és etanol elegyével oldjuk ki a C-vitamint. A kivonatot brómmal oxidáljuk, majd az így keletkezett DAS-ból 2,4-dinitrofenil-

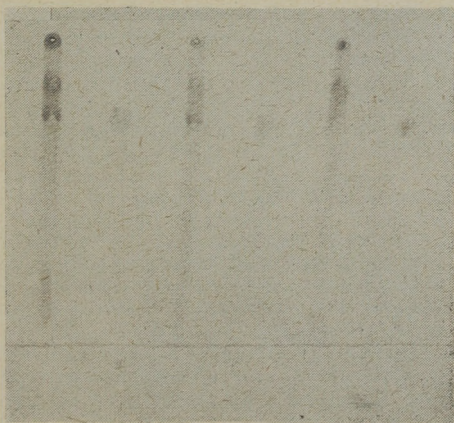
* A vizsgálatokban részt vett: Szárföldi Józsefné, Kovács Miklósné és Gábor Istvánné.

hidrazinnal oszazont képezünk. Az oszazon csapadékot etilacetátban oldjuk, s a zavaró anyagoktól rétegekromatográfia segítségével választjuk el, mennyiségét vele párhuzamosan futtatott, ismert koncentrációjú DAS-oszazon foltokkal történő összehasonlítás útján állapítjuk meg.



1. ábra

Dehidroaszkorbinsav-oszazon papírkromatogramja Szöke Szotyori (6) szerint



2. ábra

Sok zavaró anyagot is tartalmazó C-vitamin tartalmú minta rétegekromatogramja Strohecker (7) szerint

Kémszerek:

1%-os vizes oxálsav oldat és 96%-os etilalkohol 1 : 1 arányú elegye,
4,5 n kénsav,

2,4-dinitrofenilhidrazin 2%-os oldata 9 n kénsavban, használat előtt ha szükséges, leszűrendő.

Telített brómos víz.
Tiokarbamid 1%-os vizes oldata.
Etilacetát.

Futtató keverék:

Benzol-aceton-piridin (80 : 12 : 8). A piridin pontos adagolása pipettával történjék!

Réteg:

0,25 mm-es Kieselgel G réteg (20 × 20 cm-es üveglapon).

Előkészítés:

Az előzetesen apróra vágott vagy porított és homogenizált mintából a várható C-vitamin tartalomtól függően 0,5–20 g-ot mérünk be, 0,01 pontossággal. Az anyagot 1%-os oxálsav és 96%-os etanol 1 : 1 arányú elegyével 100 ml-es Stift lombikba mossuk, jelig töltjük és alaposan összerázzuk. 5–10 percig állni hagyjuk, miközben a rázogatót többször megismételjük. Ezután vagy lecentrifugáljuk, vagy szűrőpapíron átszűrjük.

Meghatározás

Az alkohol-oxálsavas kivonattól szűrés vagy centrifugálás útján nyert oldat 5 ml-ét (mely legalább 100–150 µg AS-t tartalmaz) kémcsőbe pipettázzuk. Hozzáadunk néhány csepp telített brómos vizet, majd 5–10 perc várakozás után a főlegesen levő brómot pár csepp tiokarbamid oldattal elbontjuk. Ezután hozzáadunk 5 ml 2,4-dinitrofenilhidrazin reagens oldatot és összerázás után a kémcsöveket 37 °C-os vizet tartalmazó főzőpohárba helyezzük, majd a poharat 3 órán át 37 °C-ra beállított termosztátban tartjuk. Ezt követően a kémcsöveket hideg vízben lehűtjük és a kivált oszazonokat gyenge vákuum mellett G4-es üvegszűrőn leszűrjük. A csapadékot 4,5 n kénsavval addig mossuk, míg a lecsapogó oldat már nem sárga színű. Ezután desztillált vízzel többször átöblítjük és szárazra szivatjuk.

A csapadékot etilacetáttal oldjuk le. Az oldószert apró részletekben öntjük a szűrőre, és rövid várakozások után szivatjuk le. Teljes leoldás után az oldat térfogatát 25 ml-re egészítjük ki. Az oszazonok etilacetátos oldata hűtőszekrényben több napig változatlanul eltartható. Ennek az oldatnak 0,5–2,0 µg AS-t tartalmazó alikvot részét (legfeljebb 0,1 ml-ben) visszük fel az előző nap elkészített Kieselgel G rétegre. A réteget előzetesen aktiválni nem kell! A minták rétegre vitelét 50–60 °C-os levegő árammal történő szárítással gyorsítjuk.

A kromatografálást előzőleg szűrőpapírral gondosan kibélelt és 100 ml futtató keverékkel tartalmazó üvegcsőben végezzük. Az oldószert frontot egészen a réteg felső széléig futtatjuk, a futtatás ideje kb. 60 perc.

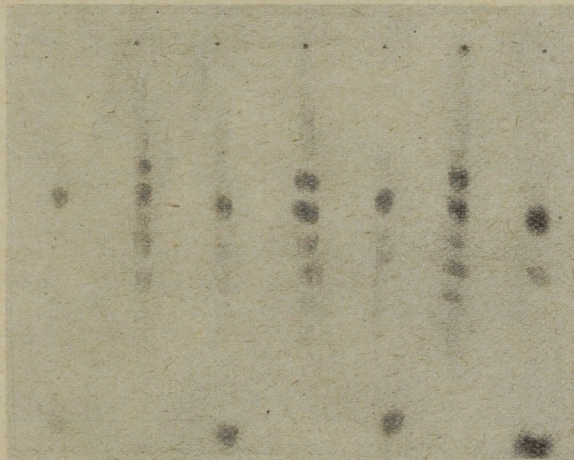
A szétválasztott foltok élesen határolt köralakúak, a DAS-oszazon foltja – a jelen levő piridin hatására – kékes lila, így jól megkülönböztethető a zavaró anyagok sárga, narancssárga és világoskék foltjaitól (3. ábra).

A foltok kiértékelésére egy félkvantitatív módszert alkalmaztunk. A rétegre az ismeretlen vizsgálati mintából három különböző oldatmennyiséget vittünk fel, a növekvő koncentráció sorrendjében. E foltok közé – a várható C-vitamin tartalomnak megfelelően – ismert koncentrációjú, a mintával azonos módon kezelt és tiszta aszkorbinsavból előállított DAS-oszazon oldatot vittünk fel, ugyancsak a növekvő koncentráció sorrendjében. A kromatografálás után a standardok és a mintából nyert DAS-oszazon foltok nagyságát és erősségét össze-

hasonlítva, az ismeretlen oldat koncentrációja megállapítható. Célszerű a bírálatot több személlyel elvégeztetni és az így nyert értékek átlagát venni figyelembe.

Az új eljárást kipróbáltuk több friss, mélyhűtött és hőkezelt terméknél oly módon, hogy minden mintából párhuzamosan másik két hagyományos módszerrel is meghatároztuk a C-vitamin tartalmát. Az összehasonlító vizsgálatokra *Tillmans* (9) titrimetriás, valamint *Spanyár* és munkatársai (10) intézetünkben korábban kidolgozott fotometriás eljárását használtuk.

A vizsgálatokhoz a homogenizált mintákból minden módszerhez négy bemérést készítettünk és minden bemérésből két párhuzamos vizsgálatot végeztünk. A kapott eredményekből kiszámoltuk minden mintánál a módszerek szórását.



3. ábra

Sok zavaró anyagot is tartalmazó C-vitamin tartalmú minta rétegekromatogramja az új eljárás szerint

Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeit tartalmazza az 1. táblázat.

A táblázatban feltüntetett átlagértékek között egyedül a paradicsompürénél tapasztalunk nagyobb eltérést. Itt a rétegekromatográfias úton nyert értékek lényegesen kisebbek, mint a másik két módszerrel kapott eredmények. Valószínűnek látszik, hogy a kisebb értékek a helyesek, mivel sok zavaró anyagot tartalmazó, hőkezelt termékről van szó és feltehetően a másik két módszerrel ezek egy részét is mint C-vitamint mértük.

Ennek a feltevésnek az igazolása további kísérleteket igényel.

A táblázatból látható, hogy az új módszer szórása valamivel nagyobb, mint a másik két módszeré. Ez várható is volt, hiszen a rétegekromatográfias eljárás, a kiértékelés módja miatt fél kvantitatív módszernek tekinthető.

Vitathatatlan előnye azonban, hogy sok zavaró anyag esetén is biztonságos, szemmel látható elválasztást ad.

Az adatok alapján (a paradicsompürét figyelmen kívül hagyva) elvégeztük a különböző vizsgálati módszerek átlagértékei között mutatkozó különbségek szignifikancia vizsgálatát. A statisztikai próbák eredményeit a 2. táblázat tartalmazza. Természetesen messzemenő következtetéseket levonni a közölt néhány minta vizsgálata alapján nem lehet.

	Tillmans módszerrel (9) mg%	α, α' -dipiri- diles mód- szerrel (10) mg%	Réteg- kron ato- gráfiasan mg%
Friss kelkáposzta	45,7	38,1	46,1
	45,9	40,0	42,4
	47,2	41,1	43,8
	46,5	42,6	49,9
	49,5	40,0	55,6
	50,1	38,1	45,8
	45,7	40,9	61,1
	46,0	40,0	52,1
átlag	47,1	40,1	49,6
s	1,76	1,51	6,40
Friss zöldpaprika	121,1	110,0	139,0
	120,6	108,2	136,3
	125,3	104,4	122,8
	126,5	104,4	124,8
	114,8	108,2	132,4
	115,4	108,2	123,0
	119,3	104,4	133,6
	120,1	106,3	136,5
átlag	120,4	106,8	131,1
s	4,13	2,19	6,55
Friss citromlé	50,4	55,0	50,0
	51,0	53,2	51,7
	50,7	54,5	51,3
	50,3	55,6	43,5
	50,7	55,8	48,1
	50,3	54,6	46,1
	50,5	55,2	44,7
	50,4	54,1	51,3
átlag	50,5	54,7	48,3
s	0,25	0,85	3,23
Friss paradicsompaprika	178,6	220,0	225,3
	177,6	227,5	208,8
	174,5	201,4	186,4
	173,5	208,9	195,0
	172,5	222,3	187,0
	171,8	214,8	187,0
	178,6	217,8	191,4
	178,8	213,4	205,0
átlag	175,7	215,8	198,2
s	2,97	8,12	13,83
Fagyasztott málna	nem titrál- ható	19,8	17,2
		20,3	21,0
		15,5	19,7
		16,0	17,0
		16,5	20,0
		16,5	20,2
		16,9	22,2
		16,9	18,8
átlag	—	17,3	19,5
s	—	1,76	1,79

	Tillmans módszerrel (9) mg %	α, α' -dipiridiles módszerrel (10) mg %	Rétegkromatográfiásan mg %
Fagyasztott karfiol	33,7	32,8	36,1
	33,4	33,6	34,4
	30,8	32,7	36,8
	30,7	33,0	34,2
	32,8	34,3	34,2
	32,6	35,1	31,7
	32,6	32,6	32,7
	32,4	—	34,1
átlag	32,4	33,4	34,3
s	1,09	0,95	1,64
Paradicsompüré konzerv	45,7	55,6	21,6
	48,3	56,0	19,0
	46,2	54,8	20,9
	43,1	55,1	22,2
	42,6	57,5	18,8
	41,1	57,5	17,9
	42,1	57,7	22,3
	40,6	—	22,6
átlag	43,7	56,3	20,7
s	2,72	1,23	1,83

2. táblázat

A statisztikai vizsgálatok eredményei

Minta	A Tillmans-féle és a rétegkromatográfiás módszerekkel kapott átlagértékek között		Az α, α' -dipiridiles és a rétegkromatográfiás módszerekkel kapott átlagértékek között		A Tillmans-féle és az α, α' -dipiridiles módszerekkel kapott átlagértékek között	
	t	az eltérések szignifikancia szintje 100 p.	t	az eltérések szignifikancia szintje 100 p.	t	az eltérések szignifikancia szintje 100 p.
Friss kelkáposzta	1,066	68,2	4,090	99,7**	8,542	>99,9***
Friss zöldpaprika	3,909	99,8**	9,947	>99,9***	8,230	>99,9***
Friss citromlé	1,926	90,5	5,419	>99,9***	13,410	>99,9***
Friss paradicsompaprika	4,500	99,8**	3,104	99,2**	13,118	>99,9***
Fagyasztott málna	—	—	2,479	97,3*	—	—
Fagyasztott karfiol	2,730	98,3*	1,275	77,7	1,880	91,8

Látható azonban, hogy bármelyik két módszert hasonlítjuk egymáshoz, legtöbb esetben van szignifikáns különbség a különböző eljárásokkal nyert átlagértékek között. Az eltérések mértéke anyagonként más és más. Ennek oka részben a C-vitamin kivonására használt savak (oxálsav, ecetsav) eltérő kioldó és stabilizáló hatásában, részben a meghatározások saját hibájában kereshető.

Tudjuk azt, hogy a Tillmans-féle módszer színes anyagok vizsgálatára alkalmatlan, de még tiszta folyadékok titrálásánál sem ad éles átcsapást, s emellett az esetleg jelen levő reduktonok meghamisíthatják az eredményt.

Az α, α' -dipiridiles fotometriás eljárásnál a reduktonok értékét csak megközelítően vesszük figyelembe. Molekulasúlyukat ugyanis nem ismerjük, így önkényesen választott molekulasúlyval, az aszkorbinsav molekulasúlyával számolunk. Ennek értéke a reduktonok átlagos molekulasúlyától esetenként, különböző mértékben eltérő lehet, s ez az eredményt meghamisíthatja.

Megbízható adatokhoz csak akkor juthatunk, ha a reduktonokat a vizsgálat során ténylegesen elválasztjuk. A rétegekromatográfiai eljárással ez elérhető.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy az új rétegekromatográfiai eljárás alkalmas a C-vitamin gyors vizsgálatára. A felhasznált oldószerveverékben történő egyszeri futtatással — sok zavaró anyag jelenléte esetén is — a DAS-oszazon foltja élesen elkülönül az egyéb anyagok foltjaitól és így könnyen értékelhető.

I R O D A L O M

- (1) Strohecker, R., Heimann, W., Matt, F.: Z. Analyt. Ch. 145, 401, 1955.
- (2) Herrmann, J., Zobel, M.: Z. U. L. 116, 477, 1962.
- (3) Herrmann, J., Zobel, M.: Z. U. L. 117, 1, 1962.
- (4) Crossland, I.: Acta Chem. Scand. 14, 805, 1960.
- (5) Roe, J. H., Kuether, C. H.: J. Biol. Chemistry, 147, 399, 1943.
- (6) Szőke Szotyori, K.: Die Nahrung, 11, 139, 1967.
- (7) Strohecker, R., Pies, H.: Z. U. L. 118, 394, 1962.
- (8) Diemair, W.: Handbuch der Lebensmittelchemie Zweiter Band, Teil 2. Springer-Verlag Berlin — Heidelberg — New York, 1967. p. 786.
- (9) Tillmans, J.: Z. U. L. 54, 33, 1927.
- (10) Spanyol, P., Kevei, E., Blazovich, M.: Z. U. L. 123, 93, 1963.

БЫСТРОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА — С В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ПОМОЩЬЮ СЛОИСТОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Автор произвел окисление аскорбиновой кислоты в витамин — С содержащем экстракте пищевых продуктов, потом образовал осазон из образующегося дегидроаскорбиновой кислоты. Это помощью слоистой хроматографии отделил от мешающего вещества. Надёжное отделение получил однократной наводкой смеси бензоальстон — пиридина (80 : 12 : 8) применяемой в качестве наводного вещества — в случае присутствия ещё разных мешающих веществ —.

Пятна осазона ДАС резко ограничены кругообразной формой и по влиянию пиридина приобретает сине-фиолетовый цвет. Содержание витамин-С с образцов отделил полуквантитативным методом.

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE SCHNELLBESTIMMUNG VON VITAMIN C IN LEBENSMITTELN

O. Petró

Der Verfasser reduzierte die Ascorbinsäure im Vitamin C-haltigen Extrakt der Lebensmittel, hernach bildete er aus der entstehenden Dehydroascorbinsäure das Osazon. Dasselbe wurde von den störenden Begleitstoffen dünnschicht-

chromatographisch getrennt. Die als Fließmittel verwendete Mischung von Benzol-Aceton-Pyridin (80:12:8) – gab bei einmaligen Hochsteigen – selbst im Falle noch vieler anderer störender Substanzen – eine zuverlässige Trennung.

Der Fleck des DAS-Osazons ist scharf umrandet, kreisförmig und durch den Einfluss des anwesendem Pyridins blau-lila gefärbt. – Der Gehalt der Proben an Vitamin C wurde durch eine halbquantitative Methode bestimmt.

RAPID DETERMINATION OF VITAMIN C IN FOODS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

O. Petró

In the food extracts containing vitamin C, ascorbic acid was oxidized by the author, then the formed dehydroascorbic acid was converted into osazone. Subsequently, the osazone was separated from the interfering substances by means of thin-layer chromatography. With one single run, reliable separation could be achieved even in the presence of a number of interfering substances, on using a 80:12:8 mixture of benzene: acetone: pyridine as a running agent.

The spot of the osazone of dehydroascorbic acid showed sharp borders, was of circular form and on the effect of the pyridine present it showed a bluish violet tint. The ascorbic acid content of the samples was determined by a semiquantitative method.

DOSANGE RAPIDE DE LA VITAMINE-C DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE

O. Petró

L'auteur a oxydé l'acide ascorbonique dans les extraits des denrées alimentaires contenant de la vitamine C puis il a transformé l'acide dehydroascorbique en un osazone. Il a séparé ce corps des matières troublantes par chromatographie en couche. Le mélange de benzène-acétone-pyridine (80:12:8) a donné, même en présence de beaucoup de matière troublante, une isolation sure, même à la première épreuve.

La tâche de l'osazone DAS a des contours nets, elle est circulaire et d'une couleur lila-bleuâtre à cause de la pyridine présente. Il a exécuté le dosage de la teneur en vitamine-C des échantillons par une méthode demi-quantitative.

FERREN, W. P. – SHANE, N. A.:

Differenciál-spektrométeres eljárás koffein meghatározására kávéból és gyógyszerkeverékből

Differential Spectrometric Determination of Caffein in Soluble Coffee and in Drug Combinations

J. A. O. A. C. 51, 573, 1968.

Természetes anyagokból a koffeint csak kimerítő elválasztási műveletek (folyt. ellenáramú extrakció, kromatográfia stb.) után tudjuk meghatá-

rozni. A szerzők egyszerűsített módszere: NH_3 -val lúgosított 5 ml-nyi folyadékból 3×25 ml CHCl_3 -mal kirázzák a koffeint. Ezt $10 \times$ -esre hígítják metanollal, majd 20–20 ml-t 10 ml 12n HCl-val (A) és 10 ml vízzel (B) elegyítenek. A-t az összehasonlító-, B-t a mérőcellában 283 mm-en értékelik, kalibrált diagramból. Az izoszbeszt pont felhasználásával, és az abszorpció pH-függése alapján az élelmi anyagokban előforduló zavaró vegyületek hatása kiküszöbölhető.

Kismarton K. (Miskolc)