

Stanovenie vitamínu C vo farebných roztokoch

DANICA ZUFFOVA

Na stanovenie vitamínu C používa sa bežne metóda Tillmansova, pracujúca s 2,6 - dichlórfenolindofenolom. Ako sa už viac rás spomenulo, je to metóda konvenčná. Stanovenie sa prevádza v kyslom prostredí a titruje sa do ružového zafarbenia, čo je príčinou, prečo sa nehodí tento spôsob stanovenia na titráciu kyseliny askorbovej v roztokoch, zfarebných prirodzenými farbivami typu antocyanového a karotinoidného.

Roku 1948 Bessey vypracoval metódu kolorimetrickú, založenú na stanovení nadbytku 2,6 - dichlórfenolindofenolu. K farebnému roztoku, obsahujúcemu vitamín C, pridáva známe, ale prebytočné množstvo 2,6 dichlórfenolindofenolu, ktoré extrahuje xylénom a stanoví ho kolorimetricky. Podstatou metódy je skutočnosť, že prirodzené rastlinné farbivo, až na karotinoidné, nerozpúšťa sa v organických rozpúšťadlách a ostáva vo vodnej vrstve, kým 2,6 - dichlórfenolindofenol prejde do vytrepávacieho roztoku.

Uvedená metóda dáva však skreslené výsledky; predlžuje reakčný čas, čím umožňuje oxidáciu nielen samotného vitamínu C a ľahko oxidovateľných sulfhidrilových látok, ale aj iných redukujúcich látok, ktoré sa vždy vyskytujú vo farebných roztokoch, a to látok nielen typu antocyanového, ale i karotinoidného, antracénového, antrachinónového a naftochinónového.

Pokusmi sa ukázalo, že farebné extrakty antocyanov, dokonale zbavené ľahko oxidovateľnej askorbovej kyseliny a sulfhidrilových látok prehánaním vzduchu cez zahriaty roztok, vykazovali pri xylénovej extrakcii vždy určitú spotrebu 2,6 - dichlórfenolindofenolu.

Tieto výsledky som overila na čučoriedkach, plodoch i výrobkoch z nich, na červenom víne, na čiernom hrozne a zvlášť dôkladne na extrakte z červenej kapusty.

Tak sa zistila spotreba 2,6 - dichlórfenolindofenolu:

1. na 10 ccm extraktu červenej kapusty	0,40	ce	>	>	0,35
2. na 20 ccm extraktu červenej kapusty	0,75	ce	>		0,20
3. na 30 ccm extraktu červenej kapusty	0,95	ce	>		0,25
4. na 40 ccm extraktu červenej kapusty		ce	>		0,35
5. na 50 ccm extraktu červenej kapusty	1,55	ce			

Priemerná spotreba na 10 ccm extraktu je teda 0,30/10 cc. K tomu istému extraktu sa potom pridala vitamín C v množstve 0,0220 g/250 ccm. Pomocou nájdenej priemernej korekcie našla som tieto hodnoty askorbovej kyseliny:

ccm vitamínové- ho extraktu	ccm 2,6 - dichlór- fenolindofenolu	g askorbovej kyseliny v 250 ccm s korekciou	Bessey-metóda
10 cc	2,15	0,0236	0,0330
20 cc	4,20	0,0231	0,0294
30 cc	5,70	0,0208	0,0261
40 cc	7,10	0,0195	0,0254
50 cc	10,60	0,0230	0,028

Priemerný rozdiel javí sa teda $\pm 0,002$ g, t. j. $\pm 9\%$, kým podľa Besseyho metódy sa pohybuje od 0,003 do 0,011 g, čo znamená od 13,6 do 50% a tak predstiera vyššiu hladinu vitamínu C než roztok v skutočnosti má.

Avšak ani navrhovaná metóda s použitím korekcie nevyhovuje pre jej zdĺhavosť. Bolo by treba totiž vždy previesť aj slepý pokus preháňaním vzduchu cez roztok a ani sama extrakcia nie je práve najrýchlejším spôsobom stanovenia askorbovej kyseliny.

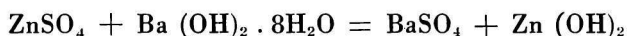
V porovnaní k uvedenému treba pokladať staršiu metódu za správnejšiu, pretože hľadá to najmenšie množstvo indofenolu, potrebné na oxydáciu vit. C. Pracovný postup sa vedie tak, že k alikvotnému dielu farebného extraktu pridávame známe, ale malé množstvá indofenolu, ktoré extrahujeme do chloroformu a hľadáme to množstvo indofenolu, ktoré sfarbí chloroformovú vrstvu celkom slabo ružovo.

Avšak obe metódy zlyhávajú, ak pracujeme s extraktmi plodov, obsahujúcich karotincidné farbivá. Karotinoidy extrahujú sa totiž z vodných roztokov organickými rozpúšťadlami. Z uvedeného dôvodu treba farebný extrakt ešte pred pridaním 2,6 - dichlórfenolindofenolu extrahovať organickými rozpúšťadlami.

Keďže spomínaná metóda môže u extraktov rastlinného farebného materiálu spôsobiť pomerne veľké chyby, bolo potrebné nájsť iný, vhodnejší pracovný postup.

Chomútová vypracovala metódu na princípe adsorpcie farbiva do srazeniny, vzniknutej v roztoku. Metóda je založená na srážaní niektorých redukujúcich látok a odfarbení rastlinného extraktu soľami síranu cínocnatého a hydroxydu barnatého s nasledujúcou oxydáciou síranom železitoamónnym. Pracovný postup podľa spomenutej autorky je tento: rastlinný materiál (10 g) sa extrahuje 1,5% kyselinou octovou a doplní sa na 100 ccm, sfiltruje a k 5 ccm filtrátu sa pridá najprv 2 cc 20% $ZnSO_4$ a potom 10 — 15 ccm 5% $Ba(OH)_2$. Reakčná smes sa premieša a centrifuguje. Tým sa z roztoku odstráni takmer okamžite proteíny, pigmenty a redukujúce látky. Z čistého filtrátu sa odstráni nadbytok Ba^{++} iónov 6% kyselinou sírovou, znovu sa centrifuguje a po pridaní 1 ccm 10% roztoku jodidu draselného a 0,5 cc 1% škrobu sa titruje roztokom síranu železitoamónneho (5,48 g $Fe(SO_4)_2 \cdot NH_4$ na 1 lit. vody, 2,5 cc kyseliny dusičnej a 2 — 3 kvapky 0,01 n $KMnO_4$). Titer tohto roztoku je 1,05 ccm/1 mg askorbovej kyseliny. Ako autorka udáva, nájdené hodnoty pri známom množstve askorbovej kyseliny súhlasia na 86 — 97%.

Hneď pri porovnaní pridaného množstva ZnSO_4 a hydroxydu barnatého naskytne sa otázka, či značný nadbytok Ba(OH)_2 , ktorý treba z roztoku odstrániť kyselinou sírovou, nebude reagovať s askorbovou kyselinou tak, že jej množstvo nie je možné stanoviť Tillmansovou metódou. Z toho dôvodu bola prepočítaná rovnica:



Z nej vyplýva, že teoretické množstvo Ba(OH)_2 , potrebné do tejto reakcie, je 8,8 cc 5% roztoku. Tento teoretický výpočet bol podrobený praktickým skúškam na askorbovej kyseline v prostredí 2% octovej kyseliny. Najdené hodnoty sú v nasledujúcej tabuľke (1).

Tabuľka č. 1.

20% ZnSO_4	5% Ba(OH)_2	mg najdené	% ask. kys. pridané
2 cc	15 cc	21,48	100,0
2 cc	15 cc	21,48	100,0
2 cc	12 cc	60,96	100,0
2 cc	12 cc	59,30	100,0
2 cc	10 cc	52,24	100,0
2 cc	10 cc	50,46	100,0
2 cc	10 cc	50,46	100,0
2 cc	8 cc	100,16	100,0
2 cc	8 cc	99,62	100,0
2 cc	8 cc	99,62	100,0

Praktické pokusy teda len poukazujú, že Chomútová používala veľký nadbytok hydroxydu barnatého.

Uvedená metóda nejavi sa však ako príliš lákavá pre zdĺhavý pracovný postup, sprevádzaný filtráciami a centrifugovaním.

Po úprave je srážajúca metóda pomerne rýchla a presná.

Upravený pracovný postup je tento:

K alikvotnému podielu rastlinného extraktu sa pridajú 2 ccm ZnSO_4 (20%) a 8 ccm 5% Ba(OH)_2 a doplní sa na určitý objem destilovanou vodou. Roztok sa premieša a hneď sfiltruje. Z filtrátu odobraný podiel sa zriedi 2% kyselinou octovou a po pridaní nasýteného roztoku oxalátu sódného sa titruje 2,6-dichlórfenolindofenolom do ružového sfarbenia.

Slepý pokus bez pridanía askorbovej kyseliny nedáva nijakú spotrebu 2,6-dichlórfenolindofenolu.

Metóda bola overená na najtypickejších a najintenzívnejších predstaviteľoch antocyanových a karotinoidných farbív a ako z tabuľky č. 2 vidieť, dáva veľmi dobré výsledky.

Tabuľka 2.

Farbivo druh	Plod	Pridaný vit. C	Najdený vit. C	mg% ask. kys.
antocyanidné	červ. kapusta	50 mg/100 cc	49,97 mg/100 cc	99,94
		50 mg/100 cc	50,09 mg/100 cc	100,17
		50 mg/100 cc	49,94 mg/100 cc	99,87
		50 mg/100 cc	50,35 mg/100 cc	100,7
antocyanidné	čierne hrozno	50 mg/100 cc	49,88 mg/100 cc	99,95
		50 mg/100 cc	50,23 mg/100 cc	100,45
		50 mg/100 cc	49,88 mg/100 cc	99,95
		50 mg/100 cc	50,23 mg/100 cc	100,45
antocyanidné	cvikla	50 mg/100 cc	49,88 mg/100 cc	99,95
		50 mg/100 cc	49,90 mg/100 cc	99,80
		50 mg/100 cc	49,92 mg/100 cc	99,83
		50 mg/100 cc	50,23 mg/100 cc	100,45
karotinoidné	karotka	50 mg/100 cc	49,88 mg/100 cc	99,95
		50 mg/100 cc	50,23 mg/100 cc	100,45
		50 mg/100 cc	49,91 mg/100 cc	99,82
		50 mg/100 cc	50,21 mg/100 cc	100,41
karotinoidné	paradajky	50 mg/100 cc	49,95 mg/100 cc	90,91
		50 mg/100 cc	50,21 mg/100 cc	100,41
		50 mg/100 cc	49,93 mg/100 cc	99,85
		50 mg/100 cc	50,21 mg/100 cc	100,41

Teraz sa však vyskytla otázka, ako sa budú chovať iné srazeniny.

Pri hľadaní iných adsorpčných solí bolo potrebné si uvedomiť, že ako odfarbovač či adsorbens prirodzeného farbiva nemôže sa použiť ani živočíšne uhlie, ani beliaci hlinka, keďže sú práškovité a preto majú na svojom povrchu zachytené veľké množstvo vzduchu, či lepšie vzdušného kyslíka, postačujúceho na oxydáciu v roztoku prítomnej askorbovej kyseliny.

Pri nových skúšaných sraždľách najprv som skúšala ich odfarbovaciu schopnosť, a to na najintenzívnejšie zafarbenom roztoku: červenom víne. Ako zásadu som použila najprv hydroxyd strontnatý, za horúca nasýtený. Ako kyslú soľ možno najlepšie použiť sírany. Hydroxyd strontnatý, ktorý sa sraža so:

1. Síranom kademnatým $CdSO_4$. Intenzívne červený roztok červeného vína už pridaním samotného roztoku síranu kademnatého zmení svoju farbu na jasne jahodovočervenú. Pridaním roztoku hydroxydu strontnatého vzniká páperovitá srazenina, dobre adsorbujúca farbivo a dobre filtrovateľná. S oxalátom sódnym v prostredí, ktorého roztok sa titruje, dáva srazeninu, ktorá sa môže, ale nemusí odstrániť z roztoku (jej prítomnosť neprekáža titracii).

2. Síranom hlinitým $Al_2(SO_4)_3$: Intenzívne červené zafarbenie červeného vína prejde do fialova. Po pridaní hydroxydu strontnatého nastáva však okrem adsorpcie aj neutralizácia, ktorá sa prejaví tým, že okyslením filtrátu zriedenou kyselinou octovou vystúpi pomer-

ne intenzívne ružové zafarbenie, ktoré nezmizne ani pridaním nadbytku oxalátu sódného. Okrem toho veľký nadbytok oxalátu otupí pridanú kyselinu octovú a pri titrácii indofenolom, následkom nedostatku octovej kyseliny, ostáva modrý farebný tón a titrácia nie je presná.

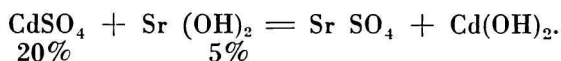
3. Sír an cino čn atý $ZnSO_4$: Vzniknutá srazenina je veľmi voluminózna, zle sa filtruje a slabo adsorbuje.

5%-ný roztok hydroxydu barnatého sa sráža so:

1. Sír an om ka dem natým $CdSO_4$: Vzniknutá srazenina nie je príliš voluminózna, dobre sa filtruje a dobre adsorbuje farbivo. Filtrát po okyslení zriedenou kyselinou octovou má len celkom slabý ružovkastý nádych, ktorý pridaním oxalátu sódného mizne, hoci roztok ostáva dostatočne kyslý, aby bolo možné titrovať do ružového zafarbenia.

2. Sír an om hli nitým $Al_2(SO_4)_3$: Srazenina je príliš voluminózna, zle adsorbuje prirodzené rastlinné farbivo, filtrát ostáva intenzívne zafarbený.

Zo všetkých roztokov solí, použitých na stanovenie vitamínu C vo farebných roztokoch antocyanov a karotinoidov, zdá sa byť najvhodnejší hydroxyd strontnatý a síran kademnatý podľa rovnice:



Zo stechiometrických pomerov vychádza, že na 2 ccm 20% $CdSO_4$ musíme pridať 8 ccm 5% $Sr(OH)_2$. Toto som sa pokúsila overiť na roztoku obsahujúcom len vitamín C bez farbiva. Miesto pridaných 125.2 mg vit. C na 100 cc roztoku našlo sa len 43.60 a 43.95 mg/100 ccm, t. j. 34,6 a 35,2 mg %. Keďže ani zmenenými pomermi obsahu síranu kademnatého a hydroxydu strontnatého nedosiahly sa lepšie výsledky, od ďalšieho stanovenia sa upustilo.

Okrem už uvedených srazenín som skúšala použitie v potravinárskej chémii už dávno osvedčeného čeriaceho roztoku, zásaditého octanu olovnatého.

Askorbová kyselina, rovnako ako Ba^{++} , dáva aj s Pb^{++} soli, ktoré zne-možňujú jej stanovenie. Je to dôvod, pre ktorý olovnaté soli až dosiaľ boli vždy vylúčené pri stanovovaní vitamínu C. Veľmi výhodná je však okolnosť, že octan olovnatý sa sráža s oxalátom sódnym. Práve táto skutočnosť viedla na myšlienku, skúsiť smes oxalátu sódného a octanu olovnatého ako adsorbens prirodzeného rastlinného farbiva. Pravda, k roztoku treba pridať najprv oxalát sódný v nadbytku a potom len pridávať roztok octanu olovnatého.

Nasledujúca tabuľka (3) udáva množstvo octanu olovnatého, potrebné na dokonalú adsorpciu farbiva, bez strát vitamínu C.

Vzniknutá srazenina je veľmi voluminózna, dobre filtrovateľná a veľmi dobre adsorbuje aj sráža prirodzené rastlinné farbivo. Napr. roztok čierneho hrozna, ktorý sa najťažšie odfarbuje, ostane po odfiltrovaní srazeniny úplne bezfarebný a je dobre titrovateľný aj bez ďalšieho zriedenia.

Tabuľka 3.

Roztok vitamínu C, použitý na stanovenie: 100 mg/100 cc; 10 cc—> 100 cc.

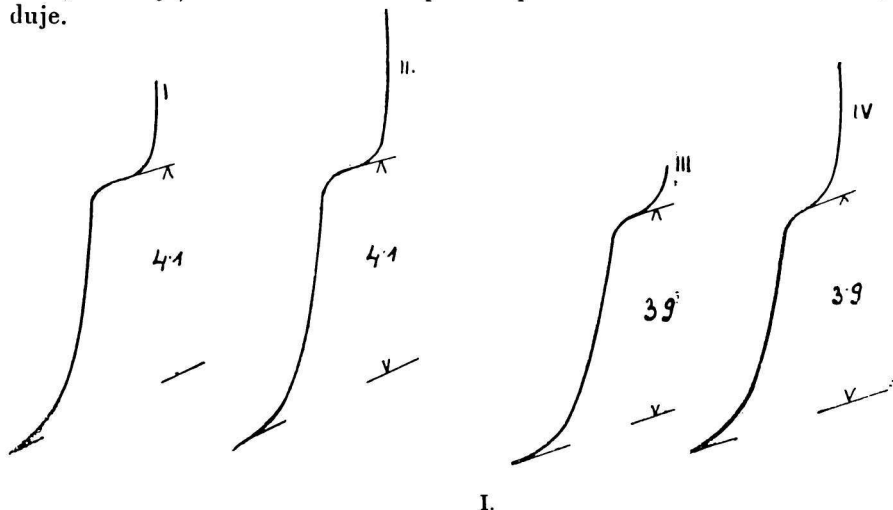
Množstvo (COONa) ₂ v ccm	množstvo (CH ₃ COO) ₂ Pb v ccm	pridaný vit C v mg/100 cc	najdený vit. C v mg/100 cc
10	10	100	36,7
10	4	100	38,8
10	4	100	39,0
20	2	100	99,5
20	2	100	99,2
20	3	100	100,04
20	3	100	99,82

Nami najdený najvhodnejší pracovný postup na stanovenie vitamínu C v roztokoch, sfarbených prirodzenými rastlinnými farbivami, je potom tento:

K rastlinnému farebnému extraktu pridáme najprv 20 ccm nasýteného roztoku oxalátu sódného, potom 3 ccm roztoku zásaditého octanu olovnatého, doplníme po značku destilovanou vodou a sfiltrujeme. Z filtrátu sa odoberie alikvotný diel, okyslí sa 2% kyselinou octovou a titruje sa n/1000 2,6 - dichlórfenólindofenolom do ružového zafarbenia.

Metóda bola overená na niektorých druhoch farebných rastlinných extraktov typu antocyanového a karotinoidného (Tab. 4).

Súčasne sa previedla kontrola polarograficky a ako polarogram (I a II.) ukazuje, obsah vitamínu C pred a po srážaní sa veľmi dobre shoduje.



I.

Srážané zás. octanom olovnatým a oxalátom sódnym. I. a II. pred srážaním, III. a IV. po srážaní.

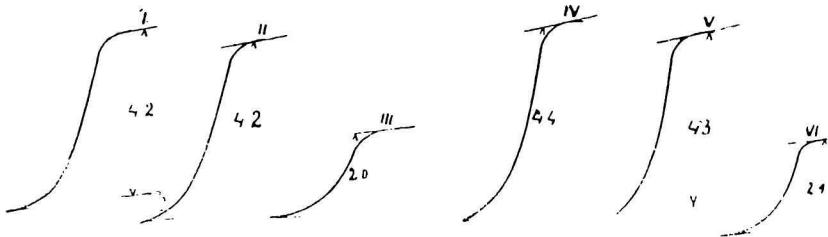
Tabuľka 4.

Farbivo antocyanové	pridaný vit. C	najdený vit. C	mg% ask. kys.
cvikla	100 mg/100 ccm	99,87 mg/100 cc	99,87
		100,2 mg/100 cc	100,2
		99,91 mg/100 cc	99,91
		100,2 mg/100 cc	100,2
modrý kaleráb	100 mg/100 ccm	99,63 mg/100 cc	99,63
		100,2 mg/100 cc	100,2
		99,72 mg/100 cc	99,72
		100,7 mg/100 cc	100,7
maliny	100 mg/100 ccm	99,43 mg/100 cc	99,43
		99,61 mg/100 cc	99,61
		99,68 mg/100 cc	99,68
		100,2 mg/100 cc	100,2
reďkovka	12,0 mg/100 ccm	11,97 mg/100 cc	99,77
		12,02 mg/100 cc	100,06
	100 mg/100 ccm	99,83 mg/100 cc	99,83
		100,6 mg/100 cc	100,6
		99,74 mg/100 cc	99,74
		100,01 mg/100 cc	100,01
drienky	100 mg/100 ccm	99,79 mg/100 cc	99,79
		100,2 mg/100 cc	100,2
		99,81 mg/100 cc	99,81
		100,1 mg/100 cc	100,1
červená kapusta	69 mg/100 ccm	68,71 mg/100 cc	99,59
		69,02 mg/100 cc	100,02
		69,02 mg/100 cc	100,02
		68,55 mg/100 cc	99,43
		68,87 mg/100 cc	99,79
		69,18 mg/100 cc	100,2
čierne čerešne	69 mg/100 ccm	68,71 mg/100 cc	99,59
		68,71 mg/100 cc	99,59
	100 mg/100 ccm	99,73 mg/100 cc	99,73
		100,0 mg/100 cc	100,00
		99,57 mg/100 cc	99,57
		99,81 mg/100 cc	99,81
čučoriedky	100 mg/100 ccm	99,82 mg/100 cc	99,82
		99,63 mg/100 cc	99,63
		99,63 mg/100 cc	99,63
		100,3 mg/100 cc	100,3
čučoriedkový succus	12,0 mg/100 cc	11,96 mg/100 cc	99,67
		12,13 mg/100 cc	101,2
	10,8 mg/100 cc	10,76 mg/100 cc	99,63
		10,81 mg/100 cc	100,1
čierne hrozno	8,75 mg/100 cc	8,81 mg/100 cc	100,7
		8,71 mg/100 cc	99,53
		8,72 mg/100 cc	99,77
		8,77 mg/100 cc	100,2
červené víno *)	10,79 mg/100 cc	12,08 mg/100 cc	111,8
		11,98 mg/100 cc	110,9

Poznámka: Stanovenie nie je ľahké. Kvasené roztoky sa zle odfarbujú. Filtrát je ružovkastý. Toto zafarbenie zmizne dostatočným zriedením kyselinou octovou a puľrovaním Na-oxalátom. Tým, že sa roztok veľmi zriedi, nevidieť dobre dotitrovanie, preto sú najdené hodnoty vyššie.

Tabuľka 5.

Farbivá karotinoidné	pridaný vit. C	najdený vit. C	mg% ask. kys.
karotka	72,5 mg/100 cc	72,3 mg/100 cc	99,73
		72,7 mg/100 cc	100,3
		72,4 mg/100 cc	99,86
		72,5 mg/100 cc	100,0
		72,54 mg/100 cc	100,1
		71,94 mg/100 cc	99,24
paradajky	67,0 mg/100 ccm	66,98 mg/100 ccm	99,97
		67,16 mg/100 ccm	100,24
		66,94 mg/100 ccm	99,91
		67,33 mg/100 ccm	100,5
		67,12 mg/100 ccm	100,01
		66,85 mg/100 ccm	99,78
šípky	67,0 mg/100 ccm	66,91 mg/100 ccm	99,84
		67,28 mg/100 ccm	100,44
		66,97 mg/100 ccm	99,96
		67,13 mg/100 ccm	100,01
		66,68 mg/100 ccm	99,47
marhule	65,00 mg/100 ccm	65,15 mg/100 ccm	100,23
		64,86 mg/100 ccm	99,78
		64,92 mg/100 ccm	99,88
		65,60 mg/100 ccm	100,9
		65,18 mg/100 ccm	100,28
		64,70 mg/100 ccm	99,54



II.

Srážanie prevedené $Zn SO_4 + Ba(OH)_2$ Krivky I, II. a III. pred srážaním, IV V a VI. po srážaní

S ú h r n .

V uvedenej práci sa previedla kontrola kolorimetrickej metódy Besseyho a stanovila nevyhnutná korekcia na správnosť výsledkov. Srážacia adsorpčná metóda Chomútovej sa upravila a našlo sa nové vhodné

adsorbujúce srážadlo antocyanidných a karotinoidných farbív v smesi oxalátu sódného a zásaditého octanu olovnatého, dávajúca veľmi dobré výsledky.

Literatúra:

1. Gigena i Sanit: 12, č. 10, 30-2 (1947)
2. Rosenberg: Chemistry and Physiology of the Vitamins.
3. Dr. Ing. Majer: Polarografie.
4. Dr Lunde: Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln.
5. Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse. Spezielle Analyse II. Teil — Organische Stoffe II.
6. Analytical chemistry (1949)
7. Chem. Abstract: 43, 1822, (1949)

Vitamíny vo výžive a ich analytické stanovenie

DANICA ZUFFOVA

(Pokračovanie)

Metóda jodometrická (titruje sa n/10 jódom) hodí sa len na stanovenie čistých preparátov, nie však pre rastlinný a živočíšny materiál, obsahujúci mnoho iných oxydovateľných látok.

Z chemických metód je najrozšírenejšia metóda Tillmansonova, ktorú pokladáme za konvenčnú. Táto metóda používa na stanovenie vitamínu C 2,6-dichlórfenol-indofenol. Indofenolové farbivo redukuje však okrem askorbovej kyseliny aj sulfhydrylové slúčeniny, tiosulfát, pyridínové slúčeniny, redukovaná forma nikotínovej kyseliny a riboflavínu atď. Aj anorganické ferro- a ferri- slúčeniny interferujú so stanovením. V pive, slade, droždí a inde našli organické redukujúce látky, ktoré reagujú celkom rovnako s indofenolom ako askorbová kyselina. Väčšinou sú to cukorné deriváty, ktoré vznikly účinkom alkálií. Označujeme ich ako reduktóny.

Pri tejto reakcii sa vit. C oxyduje a 2,6-dichlórfenol-indofenol redukuje takto:

