

A ROE-féle aszkorbinsav meghatározási módszer alkalmazása növényi anyagokra

SZŐKE KATALIN

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1960. február 4.

Az aszkorbinsavnak biológiai anyagokban való meghatározására igen elterjedt a Roe és munkatársai által kidolgozott eljárás (1), amely az aszkorbinsav oxidált alakjának, a dehidroaszkorbinsavnak és a 2-4-dinitrofenilhidrazinnak reakcióján alapszik.

Az eredetileg vérre és vizeletre kidolgozott Roe—Kueher-féle aszkorbinsav meghatározási módszernek növényi anyagokra való kiterjesztését maguk a szerzők is csak óvatosan ajánlják, mivel a rövidebb hullámhosszon maximummal jelentkező egyéb, biológiailag nem hatásos vegyületek osazonjai a mérést nagymértékben befolyásolják.

A nem-specifikus reagenssel történő aszkorbinsav-meghatározás pontosságára nézve már több aggály merült fel. Probst és Schultze (2) oszlop-kromatográfiás elválasztás alapján számos osazont különített el a vizeletből. Ulmann (3), Schmidt (4) és mások is tárgyalták a módszer hiányosságait. Növényi anyagoknál Gordon és Noble (5) vizsgálták meg a módszer specifikusságát és elsősorban a dehidroaszkorbinsav meghatározásánál találtak nagy különbséget a valódi és látszólagos aszkorbinsav-tartalom között.

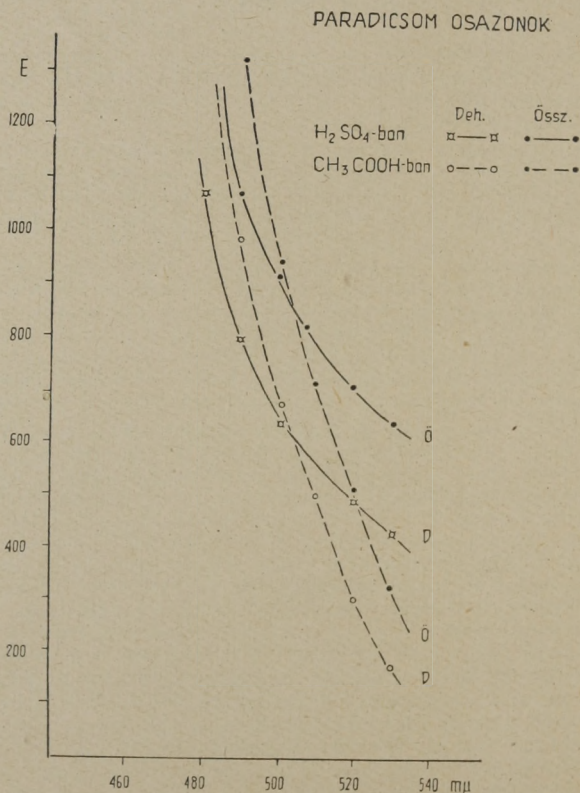
Mindezekon túlmenően a Roe-féle módszernek a kivitelezés szempontjából nagy hátránya, hogy a 2-4-DNFH oldására 85%-os kénsav szükséges, amit jeges hűtés és állandó kevergetés mellett kell adagolni az elszáradás elkerülésére. Szerzők szerint a reakció létrejöttében a kénsavnak fontos szerepe van. Valószínűnek tartják, hogy a kénsav nemcsak mint oldószer, hanem mint dehidratálószer is szerepel (6), ugyanis a kénsavkoncentráció csökkenésével a vörös szín eltűnik. Szerzők feltételezik, hogy a kénsav a zavaró anyagok hatásának kiküszöbölésében is fontos szerepet játszik. A növényi és állati szövetekben jelenlevő egyéb aldóz és ketóz típusú vegyületek sárga vagy barna osazont adnak, ezeknek színintenzitása bizonyos idő múlva csökken (7) a leolvasásra alkalmazott nagy savkoncentráció mellett, minthogy a kénsav felbontja a DNFH-kötést. Ezért az extinkció leolvasását 30 perccel az oldás után végzik el.

Előző közleményünkben megállapítottuk (8), hogy néhány vizsgált növényi anyagnál nincs lényeges különbség a Roe-féle módszerrel előállított osazonok extinkciójában alkoholos és kénsavas oldás esetében. Hasonló jelenségre egyébként a módszer kidolgozói (7) is felhívják a figyelmet, azonban az extinkciós görbe egyezését különféle sav alkalmazásakor véletlenül tulajdonítják.

Az általunk oldószerűl javasolt alkoholos oldás nagy poliszaharid tartalmú növényi kivonatoknál és nagy fehérje tartalmú állati szövetek extraktumainál az említett nagymolekulájú anyagok kicsapódását okozza, s így nem minden esetben alkalmazható. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Roe-féle módszerrel a zavaró anyagok hatása milyen mértékben befolyásolható ecetsavval, illetve az eredeti módszerben szereplő kénsavval. A kérdés más úton való vizsgálatára különféle anyagokból papírkromatográfiás módszerrel izoláltuk az osazonokat, és állapítottuk meg a nem-aszkorbinsav osazonok zavaró hatását.

Vizsgálati módszerek

Különbéféle friss és tárolt növényi élelmiszerek ecetsavas kivonataiból *Roe és Kuether* (6) módszerével osazonok képeztünk. Az aszkorbinsav kioldására 1%-os ecetsavat használtunk, az oxidációt brómos vízzel végeztük, a fölös brómot tiokarbamid-oldattal távolítottuk el. Az inkubálás 2-4-di-



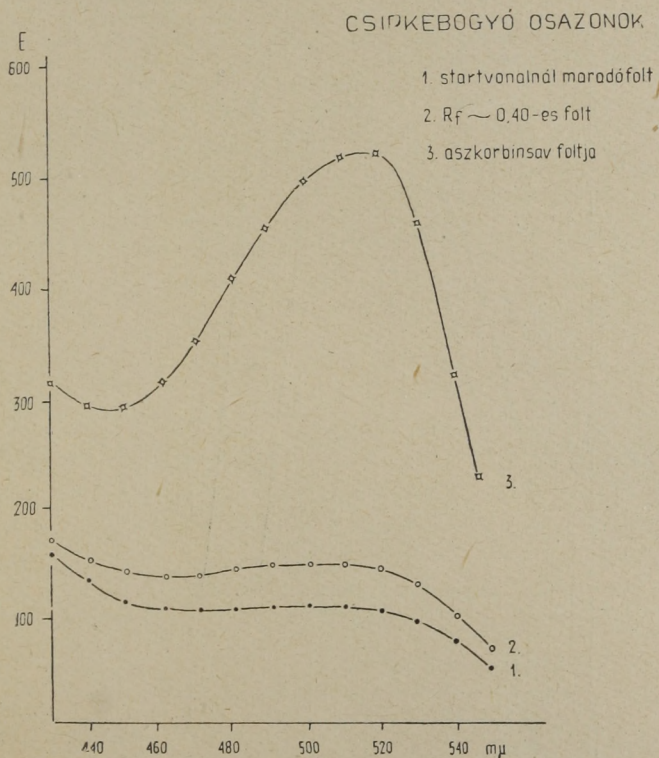
1. ábra

nitrofenilhidrazinnal (2-4-DNFH) 37 C°-on 3 óráig történt. A keletkezett osazonokat leszűrtük, és a csapadékot etilacetátban feloldottuk. Az oldatot Na₂SO₄-tal víztelenítettük.

Az osazonok elválasztására *Patschky* (9) által javasolt klórbenzol-kloroform-elegy nem felelt meg céljainknak, mivel a 0,18—0,20 R_f-értékű aszkorbinsav osazon ebben az oldószerkeverékben nem válik el megfelelően. Az általunk kidolgozott klórbenzol:etilacetát:kloroform = 2:1:1 arányú elegyével kielégítő mértékű elválást sikerült elérni.

Vizsgálati eredmények

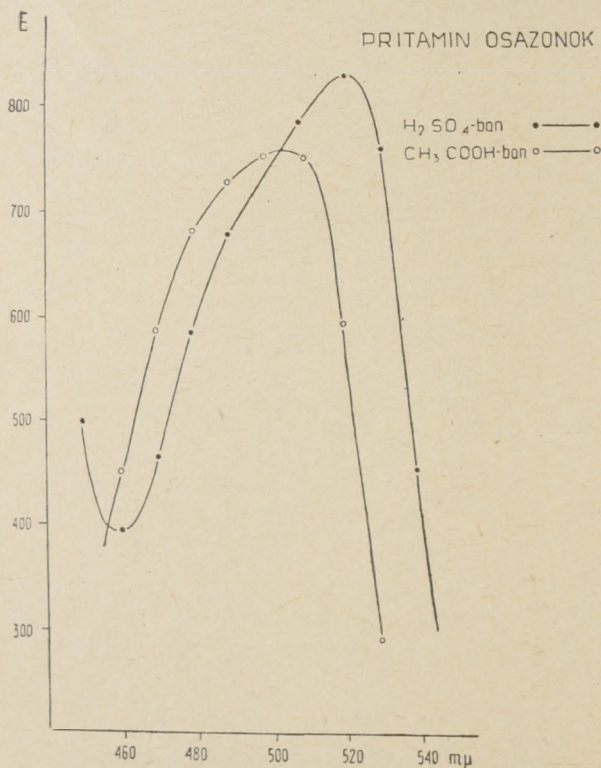
Az 1., 2. és 3. ábra néhány növényi anyag extraktumából keletkezett osazonok extinkciós görbéjét mutatja. Amint látható, nincs lényeges eltérés a mérésre használt hullámhosszknál a görbék lefutásában a jég-ecetes és kénsavas oldatok extinkciója között. A paradicsomnál a jellegzetes aszkorbinsav-osazon görbétől való eltérés zavaró anyagoknak nagyobb mennyiségben való jelenlétére utal.



2. ábra

A 4., 5. és 6. kromatogram a paradicsomsűrítményből, zöldpaprikából és pritamintól képződött osazonokat mutatja. Dehidro-jelöléssel a dehidroaszkorbinsavból, összes-jellel az összes-aszkorbinsavból brómos oxidálás után képződött osazonok foltja látható. *Spanyár* és munkatársai (10) által kidolgozott eljárás szerint a dehidroaszkorbinsavnak lúgos közegben való elroncsolása után a zavaró anyagokat reagáltattuk 2-4-DNFH-nal. Zavaró-val jelölve az ilyen módon keletkezett oldhatatlan vegyületek elválását láthatjuk.

A vizsgált növényi anyagoknál általában a következő foltok jelentek meg: a startvonalnál egy narancssárga folt, az R_f 0,35—0,40-nél és R_f 0,56—0,58-nál egy-egy sárga osazon, R_f 0,71—0,73-nál az aszkorbinsav-vörös osazonja, végül az R_f 0,81—0,83-nál egy sárga színű osazon. Az oldószer-frontnál a reagens-felesleg jelenik meg. A sárga foltok valószínűleg cukor-bomlástermékek osazonjai. Vizsgálataink szerint ugyanis a glukóz, a fruktóz, xylóz és arabinóz osazonjai *Roe*-módszer szerint előállítva és



3. ábra

papírkromatográfiásan elválasztva 0,40—0,80 R_f területén hasonló sárga foltokban jelennek meg.

A 4. ábrán az R_f 0,56—0,58-as sárga osazon nem jelenik meg, azonban az R_f 0,90—0,93-nál az aszkorbinsavéval azonos színű osazon látható. Ez utóbbi valószínűleg valamely aszkorbinsavizomer osazonja. Vizsgálataink szerint a 2-3-diketogulonsavból Penney (11) eljárása szerint előállított osazon az elméleti megfontolásnak megfelelően teljesen azonos R_f -ű az aszkorbinsavéval a használt oldószerkeverékben, így egyéb izomer jelenlétét kell feltételeznünk. A lúgos aszkorbinsav-oxidálás után kelet-

kezett osazonok képe a zavaró anyagok mennyiségének megnövekedése mellett arra is mutat, hogy egyes esetben az aszkorbinsav elbomlása sem megy végbe teljes mértékben.

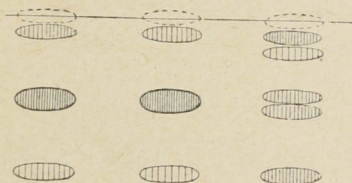
Az 5. ábrán zöldpaprika osazonjainak képe látható. Itt az aszkorbinsavnál nagyobb R_f -ű vörös osazon jobb elválasztása érdekében az etilacetát mennyiségét az eredeti elegyre számítva 25%-ról 15%-ra csökkentettük.

A kromatográfiás kép alapján jól látható, hogy míg a startvonalnál levő zavaró anyag mennyisége csökkent, lúgos kezelés hatására a nagyobb R_f értékű osazonok mennyiségek ismértékben megnövekszik. Emellett a lúgos röncsolás hatására itt sem bomlott el az aszkorbinsav teljes mértékben.

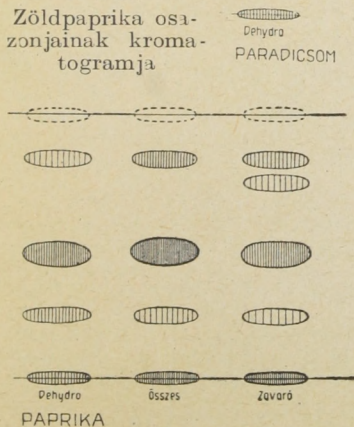
A 6. ábrán látható, hogy pritaminban a brómos oxidáció következtében megnő a startvonalnál, valamint a cukorbomlástermékek helyén megjelenő sárga osazonok mennyisége. Hasonló típusú vegyületek keletkezését kell feltételeznünk, ha az aszkorbinsavnak lúggal történő elroncsolása után csak a zavaró anyagokat reagáltatjuk 2-4-DNFH-nal. A sárga foltok csak a 2-4-DNFH-nal való reakciótermékek lehetnek, mivel a reagens nélkül kezelt lúgos extraktumban színes anyag nem keletkezik.

A zavaró anyagoknak az extinkcióra gyakorolt hatás mértékét úgy állapítottuk meg, hogy a szétvált foltokat etilacetátban oldottuk, az oldószert szobahőmérsékleten elpárologtattuk, s a maradékot a Roe-féle módszerben leírt módon 4%-os triklórecetsav és 85%-os 1:1 arányú

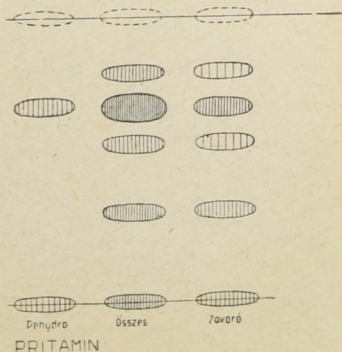
4. ábra. Paradicsom osazonjainak kromatogramja

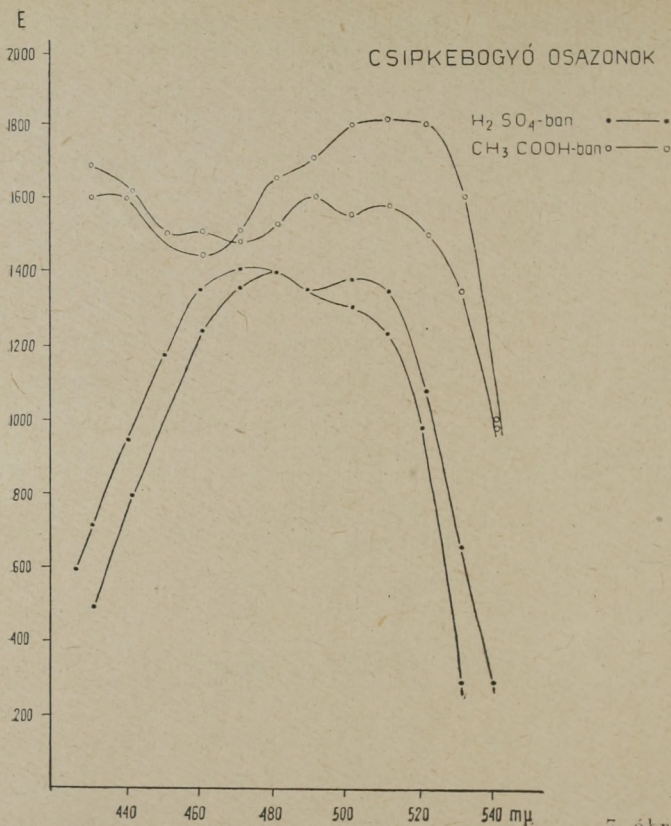


5. ábra. Zöldpaprika osazonjainak kromatogramja



6. ábra. Pritamin osazonjainak kromatogramja





7. ábra.

elegyében oldottuk. Az így elkészített oldatoknak extinkcióját D. U. Beckman spektrofotométerrel mértük 530 μ -nál.

A 7. ábrán jellegzetes extinkciógörbékét látunk a zavaró anyagokról. A teljes görbék alapján látható, hogy bár a zavaró anyagok osazonjainak nincs extinkciós maximuma, a mérésre javasolt 530—540 μ -nál mégis befolyásolják az extinkciót.

Az 1. táblázatban a zavaró anyagok extinkcióját és az aszkorbinsav folt extinkcióját adjuk meg néhány élelmiszernél. Az értékek alapján megállapítható, hogy a zavaró anyagok milyen mértékben befolyásolják az extinkció mérését. Mint látható, az össz-aszkorbinsav meghatározásánál általában csökken a zavaró anyagok százalékos befolyása a megnövekedett aszkorbinsav-extinkció következtében. A zavaró anyagoknál nem végeztük el a számítást, mert egyrészt nem minden esetben következett be az aszkorbinsav elroncsolása, másrészt az aszkorbinsav helyén is megnövekedett a zavaró anyagok mennyisége. Így ezek nem értékelhetők azonos módon.

Vizsgált anyagok	Nem aszkorbinsav osazonok	Aszkorbinsav osazonok	A zavaró anyagok extinkciójának befolyása az aszkorbinsav extinkciójára %-ban
	Extinkciója		
<i>Paprika</i>			
Dehidroaszorbinsav	0,050	0,245	20,4
Összes aszkorbinsav	0,048	0,700	7,2
Zavaró anyagok	0,070	0,127	—
<i>Csipkebogyó</i>			
Dehidroaszorbinsav	0,117	0,300	39,0
Összes aszkorbinsav	0,130	0,556	23,4
Zavaró anyagok	0,101	0,075	—
<i>Paradicsom (sűrítmény)</i>			
Dehidroaszorbinsav	0,050	0,265	19,4
Összes aszkorbinsav	0,070	0,505	13,7
Zavaró anyagok	0,115	0,090	—
<i>Zöldbab</i>			
Dehidroaszorbinsav	0,111	0,355	30,8
Összes aszkorbinsav	0,115	0,539	21,3
Zavaró anyagok	0,056	0,359	—

Méréseinkkel sikerült egyszerűbb, a későbbiekben esetleg kvantitatív meghatározásra alkalmas papírkromatográfiás módszerrel megerősíteni azt a feltevést, hogy a növényi anyagokban a növényfajtától függően különböző mennyiségű, biológiailag hatástalan, de 2-4-DNFH-nal reagáló anyag van jelen. Ezeknek az anyagoknak minősége és mennyisége számos tényező függvénye, és így el kell vetnünk azt a feltevést, hogy a Roe-féle módszer minden növényi és állati szövet C-vitamin-tartalmának mérésére egyetemesen alkalmazható eljárás. A kémiai viselkedés szempontjából közel azonos vegyületsoportok, mint pl. cukrok, aminosavak elemzéséhez hasonlóan, csak a teljes elválasztás vezethet a C-vitamin mennyiségének pontos meghatározásához. A könnyen bomló aszkorbinsav helyett osazonjának kvantitatív mérésre való felhasználása irányában a kísérletek folyamatban vannak.

Megállapításaink mellett előrebocsájtjuk, hogy hasonló típusú vizsgálatunk, amelyeket vérrel és állati szervekkel végeztünk, kedvezőbb képet mutatnak, mivel a triklórecetsavval derített kivonatokban jóval kevesebb zavaró osazon jelenik meg.

IRODALOM:

- (1) Roe, J. H. és Kuether, C. A.: Science 95, 77. (1942).
- (2) Probst, G. W. és Schultze, M. O.: J. Biol. Chem. 187, 453. (1950).
- (3) Ulmann, M.: Die Pharmazie 9, 532. (1954).
- (4) Schmidt, H., Staudinger, H. J.: Biochem. Zeit. 326, 343 (1955).
- (5) Gordon, J., Noble, J.: Food Research 24, 1. (1959), u. ott 24, 6. (1949).
- (6) Roe, J. H. és Kuether, C. A.: J. Biol. Chem. 147, 399. (1943).
- (7) Mill, M. B. és Roe, J. H.: Biol. Chem. 170, 159. (1947).
- (8) Szőke, K.: Die Nahrung 3, 293. (1959).
- (9) Patschky, R.: Angew. Chemie 62, 50. (1950).
- (10) Spanyol P., Kiszely J.-né és Demel F.-né: Magyar Kém. Folyóirat 56, 234. (1950).
- (11) Penney, J. R. és Zilva, S. S.: B. J. 37, 39. (1943).

ANWENDUNG DER ROE'SCHEN ASCORBINSÄUREBESTIMMUNGSMETHODE AUF PFLANZLICHE STOFFE

K. Szöke

Verfasserin prüfte den Einfluss der die Ascorbinsäurebestimmung störenden Stoffe in pflanzlichem Material mit der Methode von Roe und Kuether. Sie stellte fest, dass die Extinktionskurve des Osazons in pflanzlichen Stoffen oft in hohem Masse von der charakteristischen Kurve des Osazons der Ascorbinsäure abweicht, welche Erscheinung auf den Einfluss störender Substanten deutet.

Zur Trennung der störenden Stoffe arbeitete sie eine papierchromatographische Methode aus. Sie prüfte den Einfluss der Extinktion der gesondert erhaltenen Osazone auf die Ascorbinsäurebestimmung. Sie stellte fest, dass die Extinktion des unabgetrennten Osazons in erheblichem Masse von der Extinktion des echten Ascorbinsäure-Osazons abweicht. Bei den geprüften Substanzen kann die Extinktion der fremden Stoffe die Extinktion des Ascorbinsäure-Osazons um 20—40% erhöhen.

USE OF THE ROE METHOD OF DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN THE CASE OF VEGETABLE SUBSTANCES

K. Szöke

On applying the method suggested by *Roe* and *Kuether*, the effect of interfering substances on the determination of ascorbic acid in plant material was subjected to an investigation by the author.

In plant material, the extinction curve of osazone proved to deviate often to an appreciable extent from the curve characteristic of the osazone of ascorbic acid. This definitely points to the presence of interfering substances.

A paper chromatographic method was evolved for the separation of interfering substances. The effect of the extinction values of separated osazones on the determination of ascorbic acid was examined. It was found that the extinction of the unseparated osazone deviates from the extinction of the true osazone of ascorbic acid to a great extent. In the case of the substances investigated, the extinction of the osazone of ascorbic acid proper was increased by 20—40%, due to the presence of alien substances which also show extinction.

EMPLOI DE LA MÉTHODE DE ROE POUR LE DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE DANS LES SUBSTANCES VÉGÉTALES

K. Szöke (Mlle)

L'auteur a étudié à l'aide de la méthode Roe et Kuether l'influence des substances perturbatrices sur le dosage de l'acide ascorbique dans des substances végétales.

Elle a établi que dans les substances végétales la courbe d'extinction de l'osazone diffère souvent considérablement de la courbe caractéristique de l'osazone de l'acide ascorbique, ce qui indique la présence de substances perturbatrices.

Pour la séparation des substances perturbatrices elle a élaboré une méthode de chromatographie sur papier. Elle a étudié l'influence des osazones séparées sur le dosage de l'acide ascorbique. Elle a établi que l'extinction de l'osazone non séparé diffère grandement de l'extinction de l'osazone de l'acide ascorbique vraie. Pour les matières étudiées l'extinction des substances étrangères peut augmenter de 20 à 40% l'extinction de l'osazone de l'acide ascorbique.