

Использование смеси щавелевой и хлороводородной кислот при определении витамина С фотометрическим методом

Т. В. БОБРИК

Аскорбиновая кислота (витамин С) присутствует в тканях всех животных и высших растений. Большинство животных и все растения могут синтезировать этот витамин из глюкозы. У животных, неспособных к эндогенному синтезу, на количество его в органах влияет обеспеченность рациона витамином С.

При оценке С-витаминной обеспеченности организма наибольшее распространение получили прямые методы определения аскорбиновой кислоты в крови, моче и органах. Содержание витамина С в плазме крови отражает процесс его метаболической утилизации в определенное время, а концентрация его в лейкоцитах характеризует стабилизированный уровень обеспеченности тканей организма аскорбиновой кислотой. Концентрация витамина в плазме крови (мг%) и выведение его с мочой (мг/ч) находятся в тесной зависимости и являются хорошим показателем обеспеченности рациона витамином [1,2].

Таким образом, определение содержания аскорбиновой кислоты в растительных объектах, различных органах и биологических жидкостях животных и человека имеет важное диагностическое значение. Существование различных методик, результаты которых непоставимы, говорит о необходимости модификации аналитического определения витамина С в биологических объектах.

Смесь растворов щавелевой и хлороводородной кислот используются, во-первых, для получения экстрактов (т.е. в качестве экстрагентов) из растительного материала при определении аскорбиновой кислоты в плодах и вегетативных частях растений, во-вторых, как консерванты, предотвращающие разрушение витамина С [3]. При количественном определении витамина С в моче с использованием в качестве консерванта смеси 2 % раствора щавелевой и хлороводородной кислот (в соотношении 4:1) скорость разрушения аскорбиновой кислоты в темноте за 60 минут составляет 2,5 %, за 300 минут – 12,9 % [4].

Важным этапом фотометрического определения аскорбиновой кислоты в биологических и растительных вытяжках является построение калибровочных графиков индикатора.

Нами были проведены испытания, целью которых является определение стабильности калибровочного графика 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле с течением времени при использовании в качестве экстрагента витамина С смеси 2 % раствора щавелевой и 1 % раствора хлороводородной кислот в соотношении 4:1.

Методика определения

Необходимые реактивы и оборудование:

- *ацетатный буфер* (50 г ацетата натрия х.ч. растворить в 50 мл дистиллированной воды и добавить равное по объему количество ледяной уксусной кислоты);
- *ксилол х.ч.*;
- *0,001 н раствор краски Тильманса* (60 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола растворить в 200 мл горячей дистиллированной воды, охладить, профильтровать через бумажный фильтр);
- *смесь 2 % раствора щавелевой и 1 % раствора хлороводородной кислот* (в соотношении 4:1);
- *спектрофотометр PV 1251 С фирмы SOLAR.*

Методика исследования сводится к следующему:

В шесть пронумерованных пробирок отмеряем по 2 мл смеси 2 % раствора щавелевой и 1 % раствора хлороводородной кислот (в соотношении 4:1) и по 2 мл ацетатного буфера и добавляем соответственно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 и 0,6 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

В каждую пробирку добавляем по 5 мл ксилола, и путем экстракции переводим 2,6-дихлорфенолиндофенол в ксилол. После разделения водной и органической фаз верхний слой (ксилол с краской Тильманса) осторожно отбираем пипеткой в пробирки, которые закрываем пробкой и помещаем в темноту.

Примечание: нельзя допускать длительного контакта водной и органической фаз после момента их полного разделения. Измерение оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола проводим на спектрофотометре PV 1251 С фирмы SOLAR *сразу* после разделения фаз, *через 1,5 часа* и *через 3,0 часа*. В качестве раствора сравнения используем чистый ксилол.

Результаты и их обсуждение

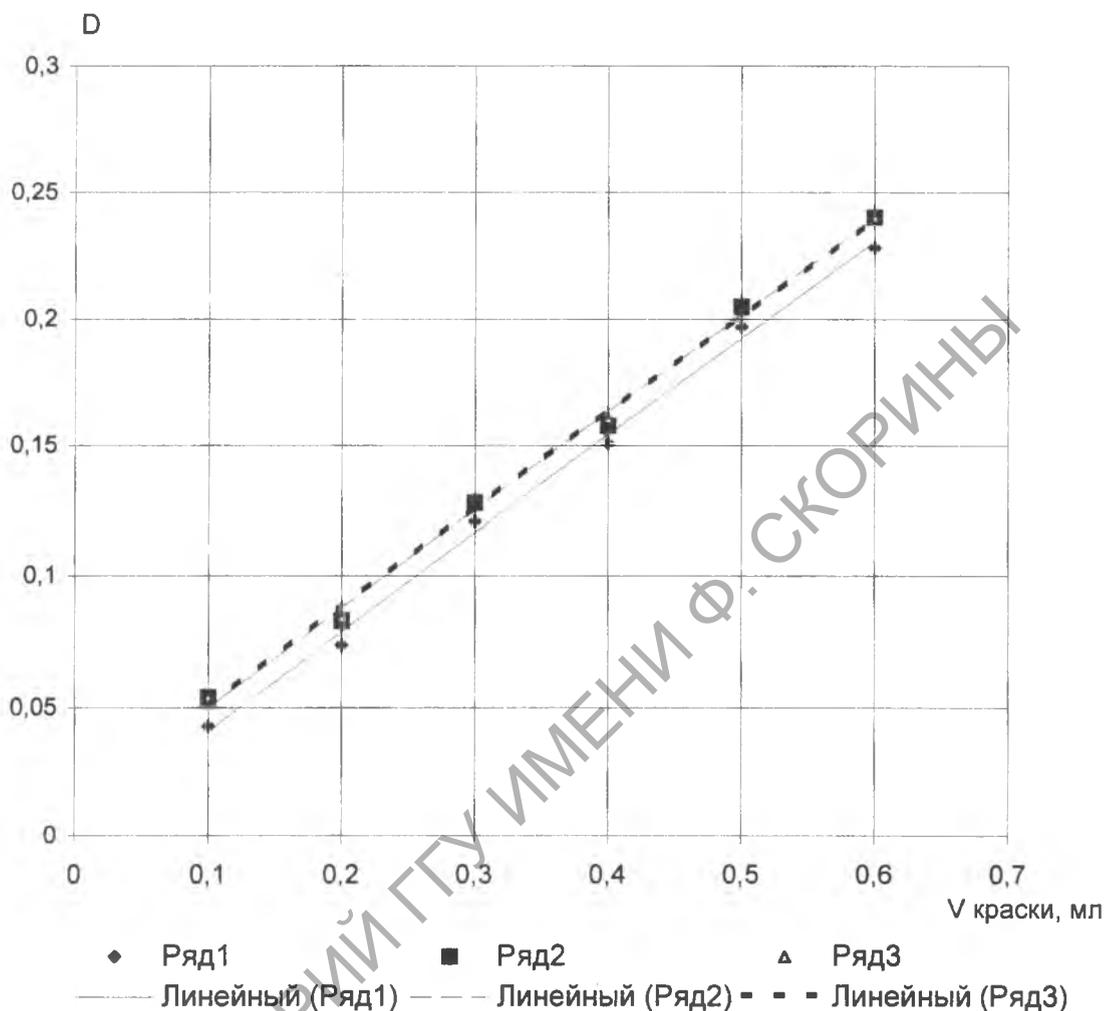
Построение калибровочного графика производят в момент разделения водной и органической фаз, через 90 минут (5400 сек) и через 180 минут (10800 сек). В таблице приведены результаты эксперимента.

Построение калибровочных графиков с использованием смеси 2 % раствора щавелевой и 1 % раствора хлороводородной кислот (в соотношении 4:1)

Время измерения	V краски Тильманса, мл	Длина волны, нм					
		470	480	490	500	510	520
сразу после разделения фаз	0,1	0,026	0,033	0,043	0,043	0,039	0,034
	0,2	0,054	0,063	0,074	0,072	0,067	0,064
	0,3	0,097	0,106	0,121	0,117	0,110	0,101
	0,4	0,139	0,142	0,151	0,151	0,148	0,142
	0,5	0,167	0,184	0,197	0,194	0,182	0,169
	0,6	0,196	0,213	0,228	0,224	0,212	0,195
через 90 минут	0,1	0,047	0,051	0,054	0,054	0,050	0,044
	0,2	0,076	0,080	0,083	0,081	0,078	0,068
	0,3	0,119	0,122	0,128	0,128	0,123	0,110
	0,4	0,150	0,153	0,158	0,156	0,150	0,147
	0,5	0,190	0,201	0,205	0,204	0,194	0,176
	0,6	0,218	0,233	0,240	0,239	0,224	0,202
через 180 минут	0,1	0,048	0,051	0,054	0,052	0,049	0,040
	0,2	0,073	0,079	0,084	0,084	0,080	0,068
	0,3	0,117	0,122	0,128	0,127	0,121	0,108
	0,4	0,150	0,154	0,161	0,158	0,151	0,148
	0,5	0,186	0,202	0,204	0,203	0,194	0,176
	0,6	0,219	0,233	0,240	0,237	0,224	0,203

Независимо от времени измерения (сразу после разделения водной и органической фаз, через 90 минут и через 180 минут) оптическая плотность краски Тильманса (2,6-дихлорфенолиндофенола) при построении калибровочного графика остается максимальной при $\lambda = 490$ нм.

Исследование калибровочных графиков, построенных с учетом временных параметров, показано на рисунке.



ряд 1 – сразу после разделения фаз; ряд 2 – через 90 минут; ряд 3 – через 180 минут.

Изменение калибровочного графика 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле с течением времени

Прямые калибровочных графиков, построенные по данным измерений через 90 и 180 минут, практически сливаются друг с другом, однако они заметно отличаются от прямой калибровочного графика, построенного сразу после разделения водной и органической фаз. Уже в течение первых 90 минут нахождения 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле (в темноте) происходит заметное изменение его оптической плотности. Абсолютная погрешность при определении объемов краски Тильманса по данным калибровочным графикам составляет 0,02342–0,02530 мл.

Несмотря на узкий интервал абсолютных погрешностей, относительная погрешность измерений колеблется достаточно широко и зависит от величины оптической плотности. При $D = 0,050$ (что соответствует примерно 0,10–0,12 мл краски Тильманса) относительная ошибка измерений составляет 19,0–20,5 %. При $D = 0,100$ (соответственно 0,23–0,25 мл индикатора) ошибка измерений снижается до 9,2–9,9 %. Минимальная ошибка наблюдается при $D = 0,250$ (объем краски Тильманса при этом равен 0,63–0,65 мл) и составляет 3,7–3,8 %.

Относительные ошибки слишком велики, поэтому измерение оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле для построения калибровочного графика необходимо проводить сразу же после разделения органической и водной фаз.

В случае, когда при построении калибровочной кривой между моментом разделения фаз и измерением оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле проходит

более получаса, для снижения ошибки можно рекомендовать при проведении количественного анализа витамина С фотометрическим методом добавлять избыток 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола объемом не менее 0,6 мл. В этом случае ошибка определений не будет превышать 4 %.

Заключение

При построении калибровочного графика в ходе фотометрического определения аскорбиновой кислоты в вытяжках растений и биологических жидкостях (с использованием в качестве экстрагента и консерванта витамина С смеси 2 % раствора щавелевой и 1 % раствора хлороводородной кислот) измерение оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле необходимо проводить при $\lambda = 490$ нм.

Относительная погрешность измерений в различные временные интервалы составила 3,7 – 20,5 %. Во избежание ошибки при фотометрическом определении аскорбиновой кислоты измерение оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола в ксилоле для построения калибровочного графика необходимо проводить сразу же после разделения органической и водной фаз.

Abstract

The author studies use of a mixture of oxalic and chlorohydrogen acids for definition of vitamin C with the help of a photometric method.

Литература

1. Петрова Г.А. Определение аскорбиновой кислоты в моче при гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария – 1989 г. – № 1 – С.49-50.
2. Экспериментальная витаминология – Мн.: Наука и техника, 1979. – С.491-495.
3. Франчук Е.П., Манаенкова Н.Л., Куликова Л.Г. Фотоколориметрическое определение аскорбиновой кислоты в окрашенных вытяжках – В кн.: Труды IV Всесоюзного семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод – Мичуринск, 1972 г. – С.527-533.
4. Бобрик Т.В. Особенности кинетики окисления аскорбиновой кислоты в моче при ее количественном определении // Веснік Мазырскага дзяржаўнага педагагічнага ўніверсітэта, 2003 г. № 2 (9) – С. 29-33.