

## TRWAŁOŚĆ KWASU L-ASKORBINOWEGO W ROZTWORACH WODNYCH

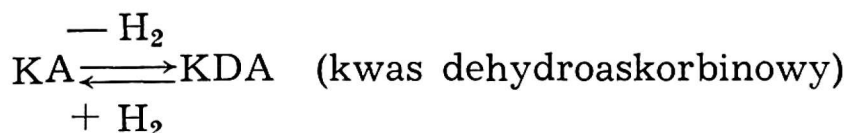
J. GROCHMALICKA

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego  
Akademii Medycznej w Poznaniu

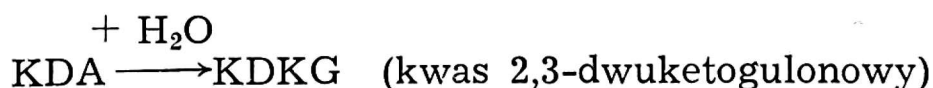
Kwas l-askorbinowy chemicznie czysty, krystaliczny jest dość odporny na działanie czynników utleniających i temperatury. W roztworach wodnych natomiast ulega samorzutnym przemianom, nasilającym się pod wpływem czynników fizycznych w rodzaju temperatury i światła jak i pod wpływem tlenu czy substancji utleniających (1, 2, 5).

Reakcja utleniania kwasu l-askorbinowego (KA) nie jest jednak stechiometrycznie łatwo uchwytana ze względu na powolne ustalanie się równowag:

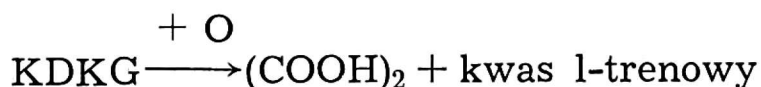
I. między kwasem l-askorbinowym a produktem jego utlenienia



II. między kwasem dehydroaskorbinowym a produktem jego hydrolizy



Kwas 2,3-dwuketogulonowy utlenia się dalej do kwasu szczawiowego i kwasu l-trenowego



Wszystkie te reakcje zależą od pH środowiska.

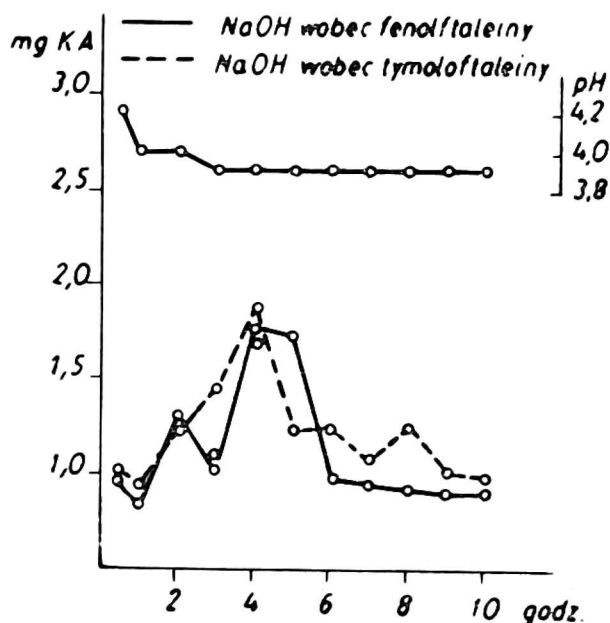
Przedmiotem niniejszego doniesienia są wyniki badań nad składem chemicznym mieszaniny kwasu askorbinowego i produktów jego przemian w wodzie w kolejnych okresach czasu po sporządzeniu roztworów.

W tym celu wykonano oznaczenia, badając w określonych odstępach czasu pH roztworów, stopień zobojętnienia roztworów za pomocą NaOH, właściwości redukujące (wobec  $\text{KMnO}_4$  i 2,6-dwuchlorofenolindofenolu) oraz zawartość ketozwiązków i kwasu szczawowego w roztworach. Badaniami objęto 0,01% roztwory kwasu l-askorbinowego, pochodzenia „Cefarm”, przygotowane w 250 ml wody destylowanej i przechowywane w temperaturze około 20 stopni przy dostępie światła i promieni słonecznych.

### 1. Oznaczenie kwasowości roztworów kwasu l-askorbinowego

Pomiary wartości pH roztworów kwasu l-askorbinowego w poszczególnych stadiach jego przemian przeprowadzono pH-metrem 3 produkcji Piezoelektronika.

Równolegle oznaczano zawartość kwasów w badanych roztworach przez miareczkowanie ich mianowanymi roztworami (0,001n) NaOH wobec fenoloftaleiny (zakres wskaźnika pH 8,1—10,0) oraz tymoloftaleiny (zakres wskaźnika pH 9,3—10,3). Wyniki oznaczeń przedstawiono na wykresie 1.



Rys. 1. Oznaczenie kwasowości 0,01% roztworu kwasu l-askorbinowego

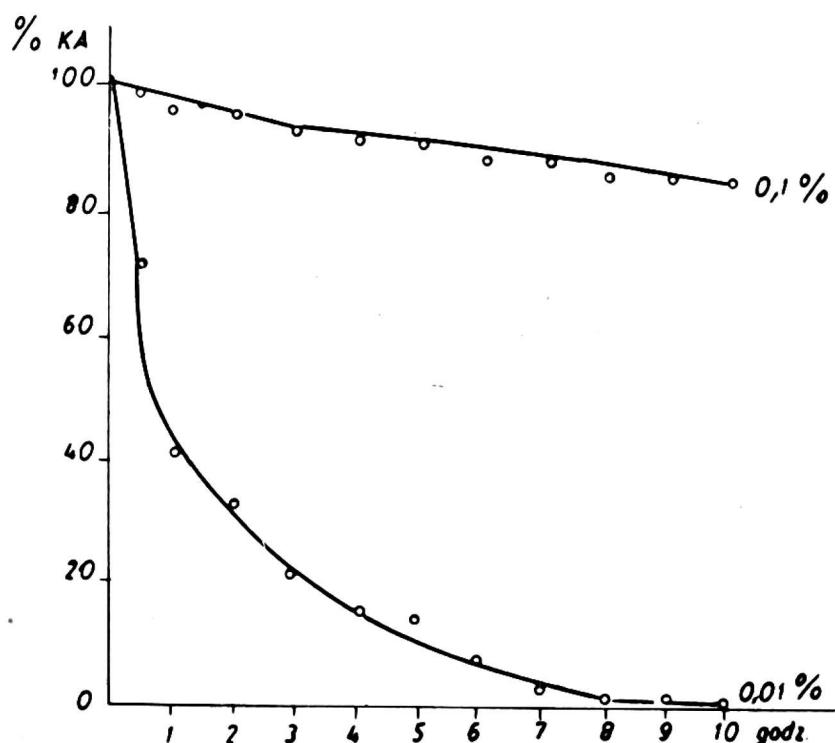
Jak widać z wykresu wartość pH roztworu 0,01% kwasu l-askorbinowego ulega tylko nieznacznym wahaniom, utrzymując się w granicach 4,1—3,9. Roztwór wykazuje wzrost zużycia ml NaOH największy po 4 godzinie, po 6 godzinach ilość ługu potrzebna do zobojętnienia kwasów osiąga początkową wartość.

## 2. Oznaczenie związków redukujących w roztworach kwasu l-askorbinowego

Zawartość związków redukujących w 0,01% roztworach kwasu l-askorbinowego oznaczono:

- przez utlenienie za pomocą 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu,
- przez utlenienie za pomocą nadmanganianu potasu,
- przez oznaczenie zawartości kwasu szczawiowego.

Wyniki miareczkowań za pomocą 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu 0,01% roztworu kwasu l-askorbinowego w porównaniu z 0,1% roztworem przedstawiono na wykresie 2.



Rys. 2. Miareczkowanie 0,01% i 0,1% roztworu kwasu l-askorbinowego za pomocą 2,6 dwuchlorofenoloindofenolu

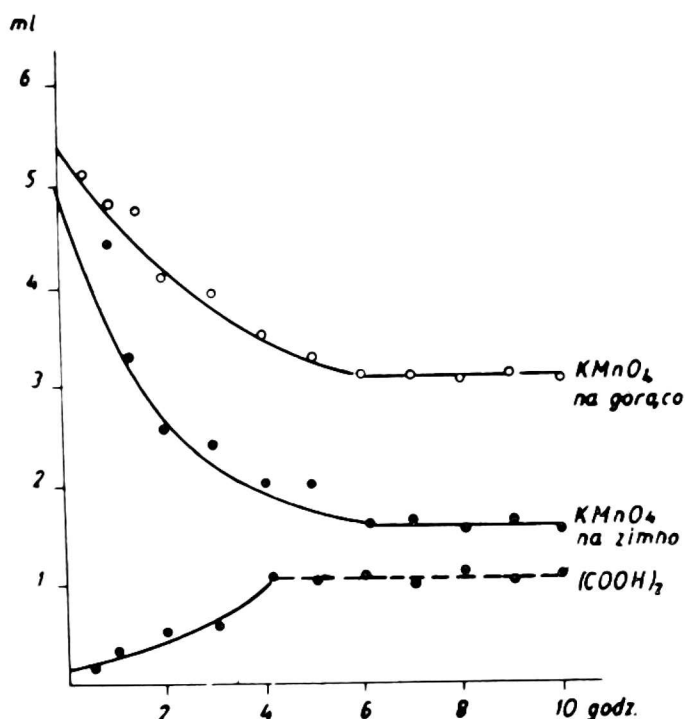
Z wykresu widać, że następuje szybki spadek zawartości kwasu l-askorbinowego w 0,01% roztworze, podczas gdy w roztworze 0,1% kwas l-askorbinowy utrzymuje się znacznie dłużej.

Podobne wyniki otrzymano miareczkując roztwory kwasu l-askorbinowego za pomocą mianowanego roztworu  $\text{KMnO}_4$  zarówno na zimno jak i na gorąco. Z różnicy zużycia ml  $\text{KMnO}_4$  w miareczkowaniu na zimno i na gorąco nie wynika jeszcze, że ilość ta odnosi się jedynie do kwasu szczawiowego.

Przeprowadzono więc oddzielnie oznaczenie tego kwasu jako jednego z produktów utlenienia kwasu l-askorbinowego, wytrącając go za pomocą  $\text{KMnO}_4$  w postaci  $(\text{COO})_2\text{Ca}$ .

Krzywe miareczkowania dla roztworów 0,01% kwasu l-askorbinowego przedstawiono na wykresie 3.

Jak wynika z wykresu można stwierdzić pewien spadek w zużyciu odczynnika  $\text{KMnO}_4$  między 3 a 6 godziną przechowywania a stosunek zużycia tegoż roztworu na gorąco i na zimno (tj. produkty redukujące łącznie z całkowitą ilością powstałego kwasu szczawowego) wynosi 2:1.



Rys. 3. Miareczkowanie 0,01% roztworu kwasu l-askorbinowego za pomocą  $\text{KMnO}_4$  oraz zawartość kwasu szczawowego

Mikrooznaczenie  $(\text{COOH})_2$  wytrącanego w postaci  $\text{Ca}(\text{COO})_2$  i po oddzieleniu oznaczonego nadmanganianometrycznie wykazało, że ilości ml  $\text{KMnO}_4$ , odpowiadające wyłącznie kwasowi szczawowemu są niższe od ilości przypadających na produkty utlenienia kwasu askorbinowego, redukujące  $\text{KMnO}_4$  tylko na gorąco. Zawartość kwasu szczawowego w 0,01% roztworach kwasu askorbinowego wzrasta znacznie w ciągu pierwszych godzin przechowywania, po czym ustala się.

### 3. Oznaczenie ketozwiązków w roztworach kwasu l-askorbinowego

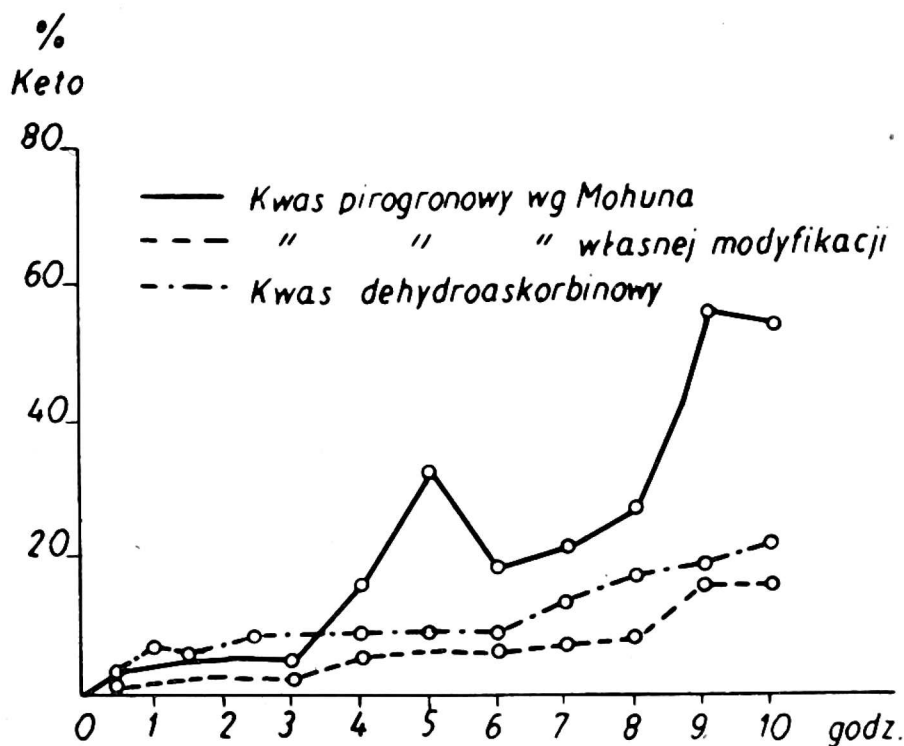
Zakładając, że produktami rozpadu kwasu l-askorbinowego w roztworze są kwas dehydroaskorbinowy i kwas 2,3-dwuketogulonowy, a więc związki o charakterze ketonowym, przystąpiono do ich oznaczeń na podstawie kondensacji z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną (3).

Pomiarów ekstynkcji dokonywano na fotometrze Havemanna przy długości fali światła 434 m $\mu$ . Obliczenia zawartości ketozwiązków w 0,01% roztworach kwasu askorbinowego dokonano w oparciu o roztwór wzorcowy kwasu pirogronowego (ketokwas) oraz o roztwór wzorcowy kwasu

dehydroaskorbinowego otrzymany przez utlenienie kwasu askorbinowego za pomocą 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu.

Krzywe zawartości ketozwiązków przedstawiono na wykresie 4.

Jak widać z wykresu procentowa zawartość ketozwiązków w roztworach 0,01% kwasu askorbinowego wzrasta w trakcie przechowywania roztworów, przy czym między 4 a 6 godziną wzrost ten nie jest równomierny.

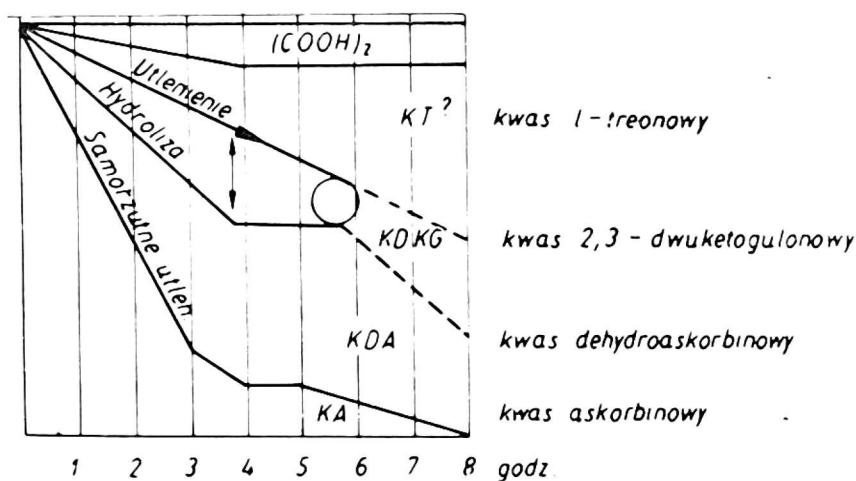


Rys. 4. Zawartość ketozwiązków w 0,01% roztworze kwasu l-askorbinowego

Opierając się na tych wynikach przedstawiono zawartość kwasu askorbinowego i produktów jego utlenienia w 0,01% roztworze w formie diagramu na rysunku 5.

Powierzchnia kwadratu przedstawia sumę kwasu askorbinowego łącznie z produktami jego przemiany. Krzywe natomiast odpowiadają poszczególnym procesom przebiegającym w roztworze 0,01% kwasu askorbinowego, ograniczając powierzchnie odpowiadające substancjom występującym w roztworze. Krzywa z napisem „samorzutne utlenienie” odpowiada w zużyciu ml 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu i ml nadmanganianu potasu i ogranicza pole kwasu askorbinowego od ewtl. kwasu dehydroaskorbinowego. Krzywa z napisem „hydroliza” dzieli pole kwasu dehydroaskorbinowego i pole kwasu 2,3-dwuketogulonowego. Hydroliza w myśl poprzednich uwag zostaje zahamowana, gdy kwasu 2,3-dwuketogulonowego i kwasu l-treonowego oraz kwasu szczawiowego jest tyle, że pH roztworu obniża się a zużycie ml NaOH wzrasta, ponieważ kwasy te są mocniej-

sze i od kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego. Natomiast dalsze utlenienie, przebiegające równoległe z hydrolizą jest prawdopodobnie niezależne od zakwaszenia roztworu. Krzywa po 3 godzinach nie ulega ugięciu. Dowodem na to może być uprzednio stwierdzony doświadczalnie wzrost ketozwiązków po 3 godzinach, oraz jego zmniejszenie między 5 a 6 godziną.



Rys. 5. Zawartość kwasu askorbinowego i produktów jego utlenienia w 0,01% roztworze kwasu l-askorbinowego

Dalej postępujący proces utlenienia w 5 godzinie a powodujący zmniejszenie ilości kwasu 2,3-dwuketogulonowego w roztworze (kwas prawdopodobnie o największej mocy) i tym samym zmniejszający zakwaszenie roztworu może powodować ponowne rozpoczęcie rozpadu pozostałej ilości kwasu askorbinowego.

Hipotetyczny przebieg procesu „hydrolizy” i „utlenienia” zachodzący między 5 a 8 godziną wyrysowano liniami kreskowanymi.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bendelin F. J., Tuschof J. W.: J. Amer. Pharm. Assoc. **44**, 241 (1955).
2. Fischer-Jensen E.: Dansk. Fidskr. Farm. **29**, 125 (1955).
3. Mohun A. F., Cook I. J. J.: J. of Clinical Pathology. **10**, 394 (1957).
4. Stanimirović S., Izbrajter D.: Glasnik Hem. Drust **23/24**, 409 (1958—1959).
5. Titockaja K. M.: Gigiena i Sanitaria. **10**, 30 (1950).

## DYSKUSJA

*Prof. dr J. Janicki, WSR, Poznań*

W jakich warunkach przechowywano kwas askorbinowy: w świetle czy bez dostępu światła, z dostępem tlenu czy nie, jaką użyto wodę, czy bezwzględnie wolną od miedzi, czy była redestylowana?

*Prof. dr J. Budstowski, WSR, Olsztyn*

Przemiany zachodzące w kwasie askorbinowym, o którym mowa w referacie są na ogół znane. Mnie interesują zjawiska mniej znane, lub jeszcze niezbadane, mianowicie, czy w swych doświadczeniach zaobserwowała Pani brązowienie roztworów kwasu l-askorbinowego po pewnym czasie przechowywania. Stwierdziłem bowiem niejednokrotnie, że kwas l-askorbinowy w obecności białek, np. kazeiny, a nawet w obecności aminokwasów, daje związki zabarwione brązowo. W tym przypadku należy przypuszczać, że chodzi o reakcje typu Maillarda, ale czyste roztwory brązowieją również, co także zaobserwowałem w moich badaniach. Sprawa ta nie jest jeszcze wyjaśniona i ciekawi mnie czy Pani posiada na ten temat jakieś informacje.

*Mgr Janecki, Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa*

Porównanie strat kwasu askorbinowego w czystych roztworach wodnych do strat kwasu askorbinowego w ekstraktach z tkanek biologicznych nie wydaje się uzasadniona. W ekstraktach biologicznych występują różne substancje stabilizujące. Na przykład w ekstraktach z rokitnika w normalnej wodzie, jeżeli nie zawiera ona zbyt dużo miedzi, nie występują żadne straty kwasu askorbinowego nawet w przeciągu 8 godzin.

W związku ze stosowaną metodyką badawczą chciałbym zauważyć, że w tego rodzaju pracy zasadnicze znaczenie ma znalezienie skorelowanego układu pomiędzy krzywą ekstrakcji a krzywą strat. Aspekt ten został przebadany w pracy K. Bogdańskiego i J. Janeckiego. (Roczn. Nauk Roln. 88, A1, 159 (1963).

*Dr J. Grochmalicka, AM, Poznań*

Przedstawione dane są wycinkiem badań wykonanych w rozmaitych warunkach w pokoju laboratoryjnym, w ciemni, na świetle, pod lampą kwarcową, w naczyniach otwartych, zamkniętych, jasnych, ciemnych, dużych i małych, z wodą destylowaną i niedestylowaną. Przedstawione tu wyniki dotyczą ściśle różnej objętości wody destylowanej oraz temperatury około 20°.

Moje badania dotyczą tylko kilku godzin przechowywania i były podstawą do poszukiwania odpowiednich stabilizatorów. W tych godzinach żółknięcia roztworów nie zauważyłam, a w literaturze wytłumaczenia tego zjawiska nie znalazłam.

Uwaga mgr Janeckiego na temat skorelowanych układów pomiędzy krzywą ekstrakcji i strat jest oczywiście słuszna, jednakże w tej pracy nie ma zastosowania, ponieważ pracowano tylko na czystych roztworach kwasu askorbinowego i ekstrakcji z materiałów biologicznych nie przeprowadzano.