

ROCZNIKI PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU HIGIENY

POŚWIĘCONE WSZYSTKIM DZIAŁOM HIGIENY, ZAGADNIENIOM BADANIA ARTYKUŁÓW ŻYWNOSCI
I PRZEDMIOTÓW UŻYTKU, INŻYNIERII SANITARNEJ I INNYM DZIEDZINOM POKREWNYM

ZBIGNIEW BOZYK

BADANIA NAD METODĄ PIJANOWSKIEGO IV. PRZEBIEG REDUKCJI KWASU DEHYDROASKORBINOWEGO *

Z Zakładu Badania Środków Spożywczych Akademii Medycznej w Warszawie

Autor udowodnił, że metoda Pijanowskiego oznaczania sumy kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego ze względu na swe zalety powinna być uznana za metodę standardową.

I. UWAGI WSTĘPNE

Krauze i wsp. (1) udowodnili, że metoda Pijanowskiego oznaczania sumy kwasów askorbinowego ** i dehydroaskorbinowego *** w warzywach i owocach jest metodą najlepszą wśród najbardziej popularnych metod miareczkowych. W jednej z ostatnich prac stwierdzono (2, 3), że szybkość redukcji KD siarkowodorem gazowym zależy od pH, przy czym w roztworach o pH około 2, KD redukuje się bardzo powoli. Przy pH 4,7 lub 6,2 KD, praktycznie biorąc, jest zredukowany ilościowo w ciągu 15 min. W pracy uzupełniającej wykazano (4), że redukcję należy prowadzić przy pH 6, ponieważ te warunki zabezpieczają największy odzysk KA. Jednocześnie w wyniku badań polarograficznych ustalono, że w procesie redukcji KD siarkowodorem gazowym powstają wielosiarczki (2, 3). Wykrycie powyższych faktów rzuciło nowe światło na zagadnienie redukcji KD za pomocą siarkowodoru gazowego.

Wyniki przytoczonych prac zdawały się podważać założenie przyjęte przez Pijanowskiego prowadzenia redukcji w roztworach o dużych stężeniach jonów wodorowych. W wyniku przeprowadzonych przez nas badań sprecyzowaliśmy wniosek (4), że warunki redukcji KD w metodzie Pijanowskiego powinny być dodatkowo sprawdzone. Należało wyjaśnić, jaki jest przebieg redukcji KD w metodzie Pijanowskiego w zależności od wielkości pH i czasu. Konieczność zbadania wpływu poszczególnych warunków oznaczenia w metodzie Pijanowskiego na otrzymywane wyniki powstała stąd, że zaproponowaliśmy uznać ją za metodę standardową (1).

II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki, aparatura pomiarowa i ogólne warunki analizy. Sumę KA i KD oznaczano według oryginalnej metody Pijanowskiego (5, 6, 7). Badania wykonano

* mgr W. Ociepcę składam podziękowanie za pomoc w wykonaniu oznaczeń.

** KA — kwas askorbinowy.

*** KD — kwas dehydroaskorbinowy.

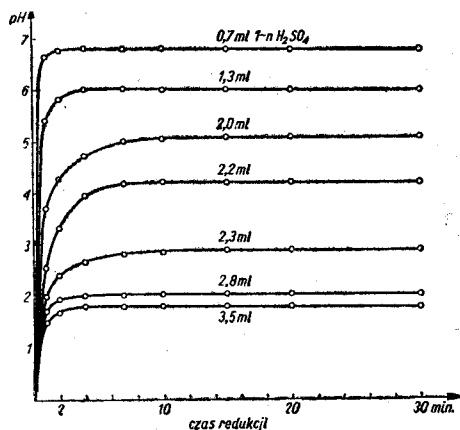


Fic-2148

na krystalicznym KD otrzymanym według *Kenyona* i *Munro* (8). KD przeprowadzano do roztworu wodnego w temperaturze 60° w ciągu 15 min., zgodnie z zaleceniem *Kenyona* i *Munro* (l.c.). Po tym czasie roztwór szybko oziębano i stabilizowano za pomocą roztworu HPO_3 . Końcowe stężenie HPO_3 w stabilizowanym roztworze KD wynosiło 2,5%. Roztwór wzorcowy KA przygotowano w 2,5%-owym HPO_3 . Stosowany preparat KA zawierał 96% KA, którego czystość oznaczono metodą jednometryczną. Miareczkowania potencjometryczne i pomiary pH wykonano na pH-metrze RFT-158.

2. Warunki uzyskania żądanych wielkości pH roztworów redukowanych. Analizując przebieg reakcji wywiązywania siarkowodoru w roztworze redukowanym można było przypuszczać, że w czasie redukcji ulega zmianie jego pH, które jest określone produktami reakcji: $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Na}_2\text{S} \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{S}$. A zatem można było oczekiwać zwiększenia pH w procesie redukcji. Na wstępie należało więc ustalić, jak zmienia się wielkość pH w roztworze w czasie redukcji, prowadzonej za pomocą metody Pijanowskiego.

Orientacyjny dobór warunków podany na ryc. 1, a zapewniający odpowiednie, żądane pH, ustalono miareczkowaniem potencjometrycznym.



Ryc. 1. Przebieg zmian wielkości pH roztworów redukowanych metodą Pijanowskiego w zależności od czasu i ilości ml 1-n roztworu H_2SO_4 , zawartych w mieszaninie reagującej

Następnie do oddzielnych próbek 10 ml 2%-owego HPO_3 , odmierzonych pipetą, dodawano kolejno ustalone miareczkowaniem potencjometrycznym różne ilości ml 1-n H_2SO_4 , natomiast zawsze te same ilości (1,75 ml) 1 M Na_2SO_4 . W każdej uzyskanej w ten sposób mieszaninie redukcyjnej wykonywano w czasie wywiązywania się siarkowodoru pomiary pH, kolejno po 1, 2, 4, 7, 10 i 30 min., mierząc czas stoperem od momentu dodania roztworu siarczku sodu. Przebieg zmian pH roztworów redukowanych w zależności od czasu i ilości ml 1-n H_2SO_4 , dodanych do mieszanin redukujących, przedstawia ryc. 1.

3. Przebieg redukcji KD w roztworach wodnych HPO_3 w zależności od czasu trwania

redukcji i pH roztworu redukowanego. Oznaczenia ilustrujące przebieg redukcji KD wykonano z roztworami KD w 2,5%-owym HPO_3 o stężeniu około 0,08 mg w 1 ml. pH tych roztworów doprowadzono w czasie redukcji wykonywanej metodą Pijanowskiego do 1,8; 2,0; 2,9; 4,2; 5,1; 6,05; 6,8, a następnie przerywano redukcję w drodze dodawania roztworu HgCl_2 po 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20 i 30 min. dla każdej badanej wielkości pH. Należało przypuszczać, że po dodaniu roztworu chlorku rtęciowego pH redukowanych roztworów ulegnie obniżeniu, zgodnie z reakcją: $\text{H}_2\text{S} + \text{HgCl}_2 \rightarrow \text{HgS} + 2 \text{HCl}$. Aby się przekonać, jaki jest rząd zmian pH, wykonano pomiary, których wyniki podano w poniższym zestawieniu:

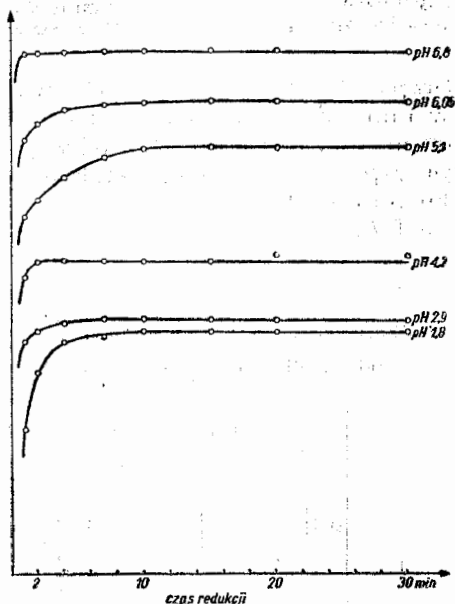
pH roztworu	
po zakończeniu redukcji	po dodaniu HgCl ₂
6,8	1,7
6,05	1,65
5,1	1,55
4,2	1,5
2,9	1,48
1,8	1,45

W celu doprowadzenia roztworów miareczkowanych do jednakowego pH dodawano do nich (po usunięciu H₂S w postaci HgS) buforu chlorkowego Clarca i Lubsza (9) o pH 2, dopełniając nim kolbkę mierniczą do 25 ml. Bufor ten miał doprowadzać pH badanych roztworów do wielkości porównywalnych (10). Uzyskane w drodze redukcji ilości KA podano w procentach w stosunku do odważki preparatu KD.

Ryc. 2 przedstawia wyniki badań opisanych wyżej. Krzywe obrazują przebieg redukcji KD w zależności od czasu jej trwania i wielkości pH roztworów redukowanych. Dla większej przejrzystości krzywych podanych na ryc. 2 za stężenie 0 mg KA, oznaczonego po redukcji KD, przyjęto umownie dowolne punkty na osi rzędnych.

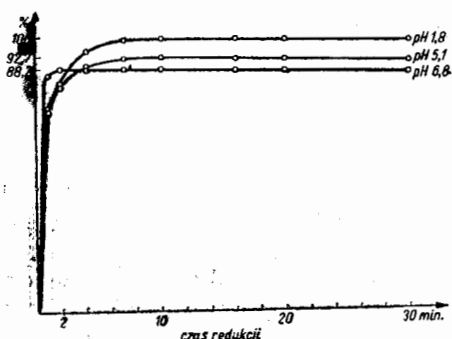
4. Przebieg redukcji KD w wyciągach ziemniaka w zależności od czasu trwania redukcji i pH roztworu redukowanego. W związku z tym, że częstokroć wyniki badań, wykonane na tak zwanych „roztworach czystych”, nie są zgodne z wynikami otrzymanymi z wyciągów, stanowiących bardziej skomplikowane układy chemiczne, postanowiono porównać wyniki oznaczeń wykonane na roztworach czystych, a opisane wyżej, z wynikami uzyskanymi z wyciągów naturalnych. W tym sksperymentcie ograniczono się do zbadania wpływu czasu na przebieg redukcji KD jedynie w trzech wyciągach ziemniaka o różnych pH (granicznych i pośrednim).

Wyciąg przygotowano rozcierając w moździerzu porcelanowym 20 g ziemniaka z 10 ml 10%-owego HPO₃ i z 5 ml piasku do konsystencji jednolitej papki, którą przeniesiono ilościowo do cylindra mierniczego o poj. 100 ml, dodano następnie 15 ml 10%-owego HPO₃ i uzupełniono wodą



Ryc. 2. Przebieg redukcji kwasu dehydroaskorbinowego metodą Pijanowskiego w roztworach wodnych w zależności od wielkości pH i czasu

destylowaną do kreski. Do tak przygotowanego i zdekantowanego po odwirowaniu wyciągu (3 500 ob./min.) dodawano określoną ilość ml wzorcowego roztworu krystalicznego KD. KD redukowano metodą Pijanowskiego w roztworach o pH 1,8; 5,1 i 6,8, prowadząc redukcję kolejno dla



Ryc. 3. Przebieg redukcji i odzysk kwasu dehydroaskorbinowego metodą Pijanowskiego w wyciągu ziemniaka w zależności od wielkości pH i czasu

preparatu w roztworze 2,5%-owego kwasu metafosforowego. Oznaczono w nim KA po redukcji metodą Pijanowskiego, wykonując po trzy oznaczenia dla każdego pH. Redukcję prowadzono w ciągu 10 min., kolejno przy pH 1,8; 5,1 i 6,8. Uzyskane wyniki podano w procentach w stosunku do odważki preparatu KD. Podobne badania wykonano z roztworami KA.

T a b e l a I

Wielkości odzysków kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego w zależności od wielkości *) pH roztworów redukowanych metodą Pijanowskiego

	Kwas askorbinowy			Kwas dehydroaskorbinowy		
	w % w odniesieniu do odważki preparatu					
	pH	1,8	5,1	6,8	1,8	5,1
1	2	3	4	5	6	7
1	109,91	109,91	110,81	84,93	82,35	79,41
2	109,01	108,10	109,91	83,46	82,72	78,67
3	109,91	109,01	109,01	84,19	81,25	79,78
4	109,05	108,10	108,10			
5	108,57	108,57	108,57			
	$\bar{x}=109,29$	$\bar{y}=108,74$	$\bar{z}=109,28$	$\bar{x}_1=84,19$	$\bar{y}_1=82,11$	$\bar{z}_1=79,29$
	100%	99,49%	99,99%	100%	97,53%	92,99%

* — wielkości pH zmierzono po zakończeniu redukcji

III. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak podano w I części pracy, wyniki przeprowadzonych przez nas badań (2, 3, 4) zdawały się podważać założenie Pijanowskiego prowadzenia redukcji przy niskich pH roztworu. W badaniach wstępnych, opisanych w niniejszej pracy, uzyskano jednak wyniki wskazujące na to, że w warunkach oznaczenia opisanych przez Pijanowskiego KD redukuje się ilościowo. Wniosek ten wydawał się początkowo sprzeczny z wynikami uzyskanymi poprzednio (1. c.). Przeprowadzone jednak systematyczne badania potwierdziły słuszność założeń Pijanowskiego.

1. Warunki uzyskaniażądanego pH roztworów zredukowanych. Z ryc. 1 wynika, że pH roztworu zredukowanego ustala się w ciągu kilku minut w zależności od dodanej ilości ml 0,1-n roztworu H_2SO_4 . Stężenie jonów wodorowych stabilizuje się najszybciej przy mniejszych ilościach dodanego kwasu siarkowego, np. przy 0,7 ml, już po około 4 min. W celu ustalenia żądanych wielkości pH roztworów zredukowanych nie można było zastosować odpowiednich buforów o dostatecznej pojemności buforowania, tak jak wykonaliśmy to w poprzedniej pracy (1,2), ponieważ do wywiązywania siarkowodoru z siarczku sodowego jest niezbędne użycie silnego kwasu mineralnego. Z badań przedstawionych na ryc. 1 wynika, że żądane pH zredukowanych roztworów można uzyskać zmieniając jedynie stężenie kwasu siarkowego w mieszaniu redukującej.

2. Wpływ pH roztworów zredukowanych na szybkość redukcji KD. Po ustaleniu ilości ml 0,1-n roztworu kwasu siarkowego niezbędnych do uzyskania żądanego pH roztworów zredukowanych należało wyznaczyć szybkości redukcji KD w zależności od wielkości pH i czasu. Badania wykonano z roztworem wodnym oraz z wyciągami z ziemniaków. Przy porównywaniu ryc. 1 i ryc. 2 uderza podobieństwo pomiędzy przebiegiem krzywych zmian pH w zależności od czasu redukcji oraz krzywych przedstawiających szybkość redukcji KD przy tym samym pH, również w zależności od czasu. Wydaje się, iż na podstawie podobieństwa przebiegu krzywych ryc. 1 i ryc. 2 można wyciągnąć wniosek, że szybkość redukcji KD zależy w metodzie Pijanowskiego od szybkości przyrostu zmian pH roztworu zredukowanego w zakresie pH od 0 do 5. Zależność tę można sprecyzować w następujących definicjach:

1) Szybkość redukcji KD w metodzie Pijanowskiego jest równa szybkości przyrostu wielkości pH roztworów zredukowanych.

2) Proces redukcji KD jest zakończony po ustabilizowaniu się stężenia jonów wodorowych roztworów zredukowanych.

3. Warunki optymalnego przebiegu redukcji KD. Pod pojęciem optymalne warunki redukcji przyjęto w niniejszej pracy nie tylko najkrótszy czas redukcji, ale również otrzymywanie pełnego odzysku KA po zakończeniu procesu redukcji.

Na podstawie przedstawionych wyników (ryc. 1 i ryc. 3) można byłoby wyciągnąć wniosek, biorąc za podstawę przy ocenie optymalnych warunków redukcji jedynie kryterium szybkości, że optimum pH dla redukcji KD w metodzie Pijanowskiego wynosi 7. W tych warunkach KD jest zredukowany ilościowo po 2 min., co w znacznym stopniu skracałoby czas trwania analizy. Natomiast Pijanowski podaje (6), że KD jest zredukowany ilościowo po 10—15 min., przy czym optymalne pH redukcji wynosi od 2 do 4. Większość badaczy pracujących metodą Pija-

nowskiego redukowała roztwory w ciągu 15 min., zgodnie z zasadą „dla pewności”. Stąd też ustalony w niniejszej pracy wskaźnik czasu można by uważać za dalsze skrócenie metody.

Porównując wyniki badań *Bożyka* i *Krauzego* (4) z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy można dojść do wniosku, że redukcja KD prowadzona metodą Pijanowskiego przebiega szybciej (około pięciokrotnie) w porównaniu z szybkością redukcji uzyskaną za pomocą siarkowodoru gazowego dla tych samych pH roztworów zredukowanych. I tak np. przy pH około 7 KD w metodzie siarkowodoru gazowego zredukowany został po 10 min., natomiast metodą Pijanowskiego po 2 min.

Z zestawienia wyników podanych w tab. I wynika, że odzysk KA z roztworów o pH 1,8; 5,6 i 6,8 jest jednakowy, co potwierdzono badając wyniki kolumny 2 z wynikami kolumny 3 w tab. I za pomocą hipotezy zerowej Fishera, wyznaczając liczbę Studenta. Okazuje się, że porównywane szeregi wyników nie różnią się istotnie. Za przyjęciem przypadkowości stwierdzonych różnic średnich arytmetycznych porównywanych szeregów świadczy fakt, że w roztworze o pH 6,8 uzyskano, praktycznie biorąc, średnią identyczną, jak z roztworów o pH 1,8. Natomiast uzyskane szeregi odzysku KD w różnych pH są niepowtarzalne. Średnia szeregu wyników kolumny 6 tab. I ($y_1 = 82,11$) nie różni się istotnie od średniej wyników kolumny 3 ($x_1 = 84,19$). Wykazano to, wyznaczając liczbę Studenta (11), która wynosi $t = 3,41$. Liczba Studenta wyznaczona z tablicy Fishera dla poziomu ufności 0,95 i dwóch stopni swobody wynosi $t_{0,05} = 4,3$. A zatem $t < t_{0,05}$. Z tej nierówności można wyciągnąć uzasadniony statystycznie wniosek, że średnia uzyskanych wyników odzysku KD z roztworu o pH 5,1 nie różni się istotnie od średniej wyników odzysku KD z roztworu o pH 1,8. Z porównania następnego szeregu wyników uzyskanego z roztworu o pH 6,8 ($z_1 = 79,29$) z szeregiem wyników uzyskanych z roztworu o pH 5,1 ($y_1 = 82,11$) wynika, że obliczona liczba Studenta dla tych średnich wynosi 5,1, natomiast wyznaczona z tablicy Fishera dla poziomu ufności 0,95 i 2 stopni swobody wynosi $t_{0,05} = 4,3$. Stąd $t > t_{0,05}$, czyli wyniki porównywanych szeregów różnią się istotnie. Jest oczywiste, że różnica ta byłaby jeszcze większa, gdyby porównać średnią uzyskanych kol. 7. ze średnią kol. 5. tab. I.

A zatem, mimo że statystycznie szeregi wyników kol. 5. i kol. 6. nie różnią się istotnie, to jednak zaznaczony kierunek zmian zawartości KA w tych porównywanych szeregach i analiza wyników kol. 7. tab. I świadczą niezbicie o tym, że nie mamy do czynienia z przypadkowymi zmianami stężenia KA w badanych po redukcji roztworach o pH $> 5,1$ lecz im wyższe pH redukcji, tym KD jest mniej stabilny. Na tej podstawie można sformułować twierdzenie, że przy ustalaniu warunków oznaczania sumy KA i KD w jakiegokolwiek metodzie należy ustalić warunki oznaczania KD, bowiem one określają warunki całkowitego oznaczenia.

Interpretacja uzyskanych wyników jest następująca: środowisko siarkowodoru nie stabilizuje KD, jak to przyjmowano dotychczas. Zgodnie z dotychczasowymi poglądami KD jest mniej stabilny od KA, co potwierdziliśmy w jednej z poprzednich prac (4). Natomiast twierdzono, że w środowisku reduktora KD nie ulega zniszczeniu. Z wykonanych badań wynika, że środowisko reduktora, jakim jest siarkowodor, nie stabilizuje KD w zakresie pH od 1,8 do 6,8. Dlatego istnieją podstawy do

twierdzenia, że stanowisko *Bogdańskiego* wysunięte przy studiowaniu metody enzymatyczno-mikrobiologicznego oznaczania sumy KA i KD (12), zgodnie z którym środowisko zawiesiny bakteryjnej nie dopuszcza do utleniania KD, nie odnosi się do układów chemicznych. Z przedstawionych badań wynika bowiem, że tak specyficzny dla KD środek redukujący, jakim jest siarkowodor, nie chroni go przed utlenieniem w podwyższonym pH. W podobny sposób, jak to wykazał *Bożyk* (3), zachowywał się KD w roztworach, w których czynnikiem redukującym był borowodorek sodu, znany z silnych właściwości redukujących.

Dowodem tego, że KD ulega zniszczeniu w procesie redukcji, natomiast KA jest stabilny w tych samych warunkach redukcji metodą Pijanowskiego, świadczy najlepiej równoległy do osi odciętych przebieg krzywych na ryc. 1, 2 i 3, uzyskany po zakończeniu redukcji. Na podstawie porównania wyników badań *Krauzego* i *Bożyka* (4) z wynikami opisanymi w niniejszej pracy można zaobserwować sprzeczność. Szybkość redukcji KD przy zastosowaniu siarkowodoru gazowego wzrasta wraz z przyrostem pH roztworu redukowanego. Jednocześnie odzysk KA jest największy przy pH 6,7, w porównaniu z mniejszymi wielkościami pH. Natomiast stosując metodę Pijanowskiego uzyskaliśmy wyniki odwrotne w zakresie wielkości odzysku KA. Największy odzysk uzyskano przy pH 1,8. Przy pH 6,8 odzysk KA jest mniejszy o 11,8%. Jedyne przebieg redukcji jest jednakowy. Znaczy to, że zarówno w jednej jak i w drugiej metodzie, szybkość redukcji KD jest największa przy pH 6,8. Zmniejszenie pH roztworu powoduje obniżanie szybkości redukcji KD.

Opisaną sprzeczność można by wyjaśnić w sposób następujący. W metodzie redukcji siarkowodorem gazowym szybkość jej w roztworach o dużym stężeniu jonów wodorowych jest bardzo mała, stąd też mimo, że w tych warunkach nie ulega zniszczeniu KD, jego odzysk jest bardzo mały. Wielkość odzysku w tej metodzie jako wypadkowa dwóch wielkości, a mianowicie szybkości redukcji i szybkości rozkładu KD, jest największa przy pH 6,8, odwrotnie jak to ustaliliśmy w metodzie Pijanowskiego.

Z otrzymanych wyników można wyciągnąć wniosek, że metoda redukcji KD za pomocą siarkowodoru gazowego jest obciążona błędem systematycznym. Na podstawie dotychczas znanego materiału doświadczalnego trudno jest ten błąd wyznaczyć, a to z tego względu, że jak wykazały wyniki badań, opisanych w niniejszej pracy, nie można porównywać wpływu wielkości pH środowiska na szybkość redukcji KD w metodzie Pijanowskiego z analogicznym wpływem w metodzie redukcji siarkowodorem gazowym. Tym bardziej nie można przenosić błędu systematycznego wynikłego z faktu niszczenia KD w podwyższonym pH, wyznaczonego metodą Pijanowskiego, do metody redukcji KD siarkowodorem gazowym.

Gdyby udało się udowodnić dodatkowo na innej drodze przedstawioną w niniejszej pracy interpretację wyników, należałoby wyciągnąć wniosek, że jest w ogóle niemożliwe stworzenie takich warunków redukcji siarkowodorem gazowym, aby można było otrzymać wyniki prawdziwe. Wniosek ten wynika stąd, że przy wyższym pH niezbędnym do uzyskania odpowiedniej szybkości redukcji KD, ulega on częściowemu utlenieniu, co przekonywująco ilustruje ryc. 3, natomiast w niskim pH, rzędu 2, redukcja siarkowodorem gazowym przebiega bardzo powoli, co dys-

kwalifikuje ją z analitycznego punktu widzenia. A zatem redukcja siarkowodorem gazowym nie nadaje się do dokładnych badań zawartości KD.

Stąd wynika bezspornie, że jedyną wśród metod, stosujących do redukcji siarkowodoru i zapewniającą otrzymywanie prawdziwych wyników, jest metoda Pijanowskiego.

Jakkolwiek przyjęliśmy hipotezę (2, 3), że KD nie występuje w warzywach i owocach, to jednak należy wziąć pod uwagę wyniki ostatnich badań, zgodnie z którymi powstaje on w procesie rozdrabniania tkanki roślinnej. Udowodnili to *Barker* i *Mapson* (13). Dlatego też, stosując rozdrabnianie w środowisku kwasów metafosforowego lub szczawiowego, należy liczyć się z utlenianiem części KA. Konieczność stosowania metody Pijanowskiego można uzasadnić tym, że umożliwia ona redukcję KD, powstającego w procesie przygotowywania próbki analitycznej. Zapewnia ona uzyskiwanie bardzo dokładnych wyników bez konieczności stosowania skomplikowanego i trudnego do przeprowadzenia w każdym laboratorium sposobu ekstrahowania materiału biologicznego w temperaturze -70° w środowisku beztlenowym, jak to proponują *Barker* i *Mapson*.

Z powyższego wynikałoby również, niezbiecie, że metoda polarograficzna, w której przy oznaczaniu KD stosuje się siarkowodór gazowy, obciążona jest błędem systematycznym.

Analizując szczegółowo metodę Pijanowskiego można dojść do wniosku, że usuwa ona trudności, dla których *Lugg* i *Mapson* (14) opracowali metodę kondensacji formaldehydowej przy oznaczaniu witaminy C w świeżych warzywach i owocach, eliminującej w tych surowcach wpływ -SH-związków (cysteinę, glutation itp.).

Powyższe fakty podkreślają dotychczas nieznanie i zupełnie nie opisane w piśmiennictwie zalety metody Pijanowskiego oznaczania sumy KA i KD nie tylko w warzywach i owocach, ale jak można przypuszczać, prawdopodobnie również we wszystkich materiałach biologicznych. Zarówno Pijanowski (5, 6, 7) jak i inni autorzy (12), podkreślając zalety metody siarczkowej, wskazywali jedynie na przyspieszenie procesu analitycznego w stosunku do procedury opartej na redukcji KD za pomocą siarkowodoru, wymagającej długotrwałego odpędzania nadmiaru gazu. *Krauze* i in. (1) wykazali, że oprócz wyżej podanej zalety bardziej istotne jest wytrącanie wielosiarczków z roztworu, które nie przeszkadzają w miareczkowaniu za pomocą 2,6-dwuchlorofenolindofenolu. Ta zaleta metody Pijanowskiego pokrywa się z wynikami badań *Ovena* i *Iggo* (15), którzy usuwają ujemny wpływ -SH-związków za pomocą kwasu p-chlorortęciowo-benzoesowego, który nie ma wpływu na reakcję między indofenolem i KA, natomiast usuwa z roztworu substancje przeszkadzające w miareczkowaniu.

Charakter krzywych ilustrujących na ryc. 2 przebieg redukcji KD w zależności od czasu i pH jest zbliżony, a widoczne różnice mogą być przyjęte, na pierwszy rzut oka, jako wynik błędów przypadkowych. Dopiero porównanie poszczególnych krzywych ryc. 2 z analogicznymi krzywymi ryc. 1 wskazuje na istniejące między nimi podobieństwo. Przebieg krzywych ryc. 3 jest również analogiczny, co już niezbiecie świadczy o istniejącej tu zależności. Okazuje się, że najniekorzystniejszą wielkością pH roztworów redukowanych jest pH 3—4.

Można przypuszczać, że wyżej opisana nieprostoliniowa zależność wpływu pH na szybkość redukcji KD jest związana z maksymalną pojemnością buforowania fosforanów (metafosforanów) w zakresie pH ok. 2. Przy redukcji natomiast za pomocą siarkowodoru stwierdziliśmy zależność szybkości redukcji od pH (4). Jak wiadomo pK_1 fosforanów wynosi 2,12 (16), czyli że w zakresie pH ok. 2 przyrost pH roztworów w czasie redukcji jest mniejszy, a zatem szybkość redukcji jest mniejsza, jeżeli przyjąć za podstawę podaną przez nas wyżej definicję. To właśnie wyjaśnia fakt szybszej redukcji KD przy pH ok. 4. Przy wyższych wartościach pH nie można przyjąć prawdopodobnie kryteriów buforowania, komplikuje z pewnością to zagadnienie wpływ stężenia jonów wodorowych. Stąd też brak prawidłowości, którą można było wyprowadzić przy pH rzędu 2.

Z przebiegu krzywych ryc. 2 i 3 wynika jeszcze jeden bardzo ważny wniosek, a mianowicie, że przedłużanie czasu trwania redukcji nie powoduje przyrostu zawartości KA. Świadczy to o tym, że w metodzie Pijanowskiego nie powstają pod wpływem redukcji siarkowodoremi substancje redukujące 2,6-dwuchlorofenolindofenol, tak jak ma to miejsce w metodzie redukcji wyciągów siarkowodoremi gazowym, opartej na metodzie Emmerie i van Eekelena. Można stąd wyciągnąć wniosek, że metoda Pijanowskiego jest bardziej specyficzna od metod stosujących do redukcji siarkowodor gazowy.

Z opisanych badań wynika, że w metodzie Pijanowskiego oznaczania sumy KA i KD czynnikiem określającym warunki analityczne metody jest właśnie KD. Jak widać z tab. I, największy odzysk KD jest możliwy wtedy, gdy pH roztworu redukowanego powoduje zmniejszenie % odzysku KA. Znaczy to, że podstawowym kryterium określającym optimum warunków redukcji jest nie czas jej trwania, lecz procent odzysku KD. Przyjmując to kryterium należy stwierdzić, że redukcja w metodzie Pijanowskiego powinna być prowadzona w warunkach metodyki oryginalnej, tzn. poniżej pH 2. W wielu przeprowadzonych przez nas próbach okazało, że do zupełnego zredukowania KD wystarczy 10 min. Przedłużanie czasu redukcji nie ma wpływu na wielkości otrzymywanych wyników. Ustalenie wielkości odzysków KD z roztworów badanych, tzn. odniesienie ich do wielkości rzeczywiście znajdujących się przed oznaczeniem w roztworach badanych jest niemożliwe, ponieważ KD oznacza się w wielkościach odniesienia dopiero po redukcji, a nie w wielkościach bezwzględnych i bezpośrednio, tak jak to ma miejsce przy oznaczaniu KA. Wynika to stąd, że nie opracowano dotychczas metody bezpośredniego oznaczania czystości preparatu KD, tak jak postępuje się np. przy ustalaniu czystości preparatu KA.

Resumując należy stwierdzić, że bardzo trudno jest wyznaczyć błąd systematyczny daną metodą przy oznaczaniu KD. Wielu autorów przy ocenie wartości porównywanych metod przyjmuje zasadę, że metoda za pomocą której otrzymuje się wyniki najwyższe, jest metodą najlepszą. Na tej zasadzie oparli swoje prace np. *Fellenberg* (17), *Gubarewski* (18) i *Rozental* (19). W niniejszej pracy skłaniam się również przy interpretacji uzyskanych wyników do przyjęcia tej zasady. Należy jednak podkreślić, że postępowanie takie nie zawsze jest słuszne. Wykazali to *Krauze* i in. (1) porównując trzy metody oznaczania sumy KA i KD w niektórych wyciągach warzyw i owoców. Mimo, że metoda Pijanowskiego

nie dawała najwyższych wyników, wymienieni autorzy przyjęli, że jest ona najdokładniejsza.

Należy podkreślić jeszcze jedną cechę metody Pijanowskiego, a mianowicie jej uniwersalność. Otóż znalazła ona zastosowanie do oznaczania sumy KA i KD w mleku (6), w warzywach i owocach (1, 6, 20), a ostatnio w posiłkach gotowanych (21). Można przypuszczać, że eksperymetatorzy zajmujący się oznaczaniem witaminy C we krwi i moczu zainteresują się tą metodą, przystosowując ją do badania i tych materiałów biologicznych.

WNIOSKI

1. Kwas dehydroaskorbinowy redukuje się ilościowo w warunkach opisanych przez Pijanowskiego.

2. Stwierdzono podobieństwo przebiegu krzywych ilustrujących zmiany wielkości pH w zależności od czasu oraz krzywych przedstawiających szybkość redukcji kwasu dehydroaskorbinowego przy tym samym pH, również w zależności od czasu.

3. Po wyjaśnieniu zależności podanej w II części pracy sprecyzowano następujące definicje:

a) szybkość redukcji kwasu dehydroaskorbinowego w metodzie Pijanowskiego jest równa szybkości przyrostu pH roztworów redukowanych,

b) proces redukcji kwasu dehydroaskorbinowego jest zakończony po ustabilizowaniu się pH roztworów redukowanych.

4. Udowodniono, że kwas askorbinowy jest stabilny w warunkach redukcji prowadzonej metodą Pijanowskiego w szerokim zakresie pH od 1,8 do 6,8. Różnice średnich uzyskanych szeregów wyników były nieistotne, co udowodniono za pomocą hipotezy zerowej Fishera.

5. Udowodniono, że stabilność kwasu dehydroaskorbinowego w zakresie pH do 6,8 w roztworach redukowanych metodą Pijanowskiego jest zależna od pH. Stwierdzono, że średnia odzysku kwasu dehydroaskorbinowego otrzymana przy redukcji prowadzonej w roztworze o pH 5,1 nie różni się istotnie od średniej wyników uzyskanej z roztworu pH 1,8. Dopiero średnia otrzymana z roztworu o wielkości pH 6,8 różni się istotnie zarówno od \bar{x}_1 jak i \bar{x}_2 .

6. Stwierdzono na podstawie interpretacji wykonanych badań, że środowisko siarkowodoru nie stabilizuje kwasu dehydroaskorbinowego w całym zakresie pH od 1,8 do 6,8, jak to mylnie dotychczas twierdziło wielu autorów.

7. Wysunięto pogląd, że ponieważ metoda redukcji kwasu dehydroaskorbinowego za pomocą siarkowodoru gazowego jest obciążona trudnym do ustalenia błędem systematycznym, jest obecnie niemożliwe podanie warunków redukcji siarkowodorem gazowym, które zapewniłyby otrzymanie prawdziwych wyników.

8. Najniekorzystniejszą wielkością pH roztworu redukowanego jest pH 3—4.

9. Na podstawie wykonanych badań sformułowano pewnik, że przy ustalaniu warunków oznaczania sumy kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego w jakiegokolwiek metodzie należy ustalić optymalne warunki oznaczania kwasu dehydroaskorbinowego, bowiem one określają warunki oznaczenia całkowitego.

10. Wyprowadzono wniosek, że metoda Pijanowskiego jest najbardziej specyficzna.

11. Redukcję metodą Pijanowskiego należy prowadzić przy pH 1,8. W tych warunkach KD nie ulega utlenieniu — otrzymuje się maksymalny odzysk kwasu askorbinowego.

12. Ustalono, że po 10 min. kwas dehydroaskorbinowy jest zredukowany ilościowo. Przedłużanie czasu trwania redukcji jest zbędne, ponieważ nie ma wpływu na wielkość otrzymywanych wyników.

13. W podsumowaniu wyprowadzono wniosek, że metoda Pijanowskiego jest najlepszą wśród znanych metod oznaczania sumy kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego, dlatego powinno się ją uznać za obowiązującą.

3. Божик

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДА ПИЯНОВСКОГО

IV. ПРОЦЕСС РЕДУКЦИИ ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Содержание

Представлен метод получения растворов с требуемым pH редицированных методом Пияновского. Установлено быстроту редукции дегидроаскорбиновой кислоты в зависимости от pH (в границах 1,8 — 6,8), в „чистых” растворах дегидроаскорбиновой кислоты и в экстрактах картофеля. На основании полученных результатов сделан обзор условий редукции, представляя ряд предложений. Между многими установлено что самым большим достоинством метода Пияновского является редукция сероводородом в растворах при большой концентрации водородных ионов, которые гарантируют полное получение дегидроаскорбиновой кислоты, а также редукцию, которая протекает уже в продолжении 10 минут.

Констатировано что в растворах с pH > 5 дегидроаскорбиновая кислота подвергается в среде сероводорода распаду.

Констатировано также, что не возможно вести редукции дегидроаскорбиновой кислоты при помощи газового сероводорода без потерь общепринятым методом по Emmerie и Van Eckelen'y.

Z. B o z y k

STUDIES OF PIJANOWSKI'S METHOD

IV. THE REACTION OF DEHYDROASCORBIC ACID REDUCTION

Summary

In the paper a method is given for pH fixing in the reductive solutions in Pijanowski's method. The time of reduction of dehydroascorbic acid was established for different pH values in pure solutions and in potato extracts. The quick and complete reduction in Pijanowski's method is due to high concentration of H ions, when the reduction with H₂S takes place. The reduction is completed after 10 mlutes. If pH value is greater than 5.0, dehydroascorbic acid is destroyed in the presence of H₂S. There are always some losses, if dehydroascorbic acid reduction is done with H₂S following the classical method of Emerie and van Eekelen.

PIŚMIENNICTWO

1. Krauze S., Bożyk Z., Ociepka W.: Badania nad metodą Pijanowskiego. I. Porównanie niektórych metod miareczkowych oznaczania sumy kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego w wyciągach warzyw i owoców — praca przyjęta do druku w Rocznikach Technologii i Chemii Żywności. — 2. Krauze S., Bożyk Z.: Mitt., 50, 228, 1959, Roczniki PZH, 10, 501, 1959. — 3. Bożyk Z.: Studia nad polarograficznym oznaczaniem witaminy C w świeżych warzywach i owocach — praca kandydacka, Akademia Medyczna w Warszawie, 1958. — 4. Bożyk Z., Krauze S.: Roczniki PZH, 11, 143, 1960. — 5. Pijanowski E.: Bull. Akad. Pol. Sc. Cl. II 1, 79, 1953. — 6. Pijanowski E.: Przemysł Rolny i Spożywczy, 8, 410, 1954. — 7. Pijanowski E.: Przemysł Spożywczy, 11, 411, 1957. — 8. Kenyon J., Munro N.: J. Chem. Soc., s. 158, 1948. — 9. Baman E., Myrbäck K.: Die Methoden der Fermentforschung, t. I, s. 782, Georg Thieme, Leipzig 1941. — 10. Gstirner F.: Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden, Stuttgart 1951.
11. Rydygier J.: W sprawie zastosowania niektórych metod statystycznych „małej próby” do badań w medycynie, Lek. Inst. Nauk.-Wyd., Warszawa 1947. — 12. Bogdański K. A.: Roczniki PZH, 8, 1, 1957. — 13. Barker J., Mapson L. W.: New Phytology, 58, 58, 1959. — 14. Mapson L. W.: J. Soc. Chem. Ind., 62, 223, 1943. — 15. Owen J. A., Iggo B.: Biochem. J., 52, 675, 1956. — 16. Kalendarz Chemiczny — praca zbiorowa, t. I, s. 477, PWT, Warszawa 1954. — 17. Fellenberg Th.: Mitt., 32, 135, 1941. — 18. Gubarewski L.: Roczniki PZH, 10, 143, 1959. — 19. Rozenthal L.: Roczniki PZH, 9, 183, 1958. — 20. Mrożewski S.: Zeszyty Naukowe SGGW-Rolnictwo, 2, s. 1, 1957.
21. Bożyk Z., Goch H.: Oznaczanie witaminy C metodą Pijanowskiego w gotowanych posiłkach — praca przyjęta do druku w Rocznikach Technologii i Chemii Żywności.

Mc Cann D. S., Burcar P., Boyle A. J., FOTOMETRYCZNE OZNACZANIE MIEDZI W SUROWICY KRWI, Analyt. Chem., 4, 547, 1960.

Autorzy w pracy podają poniższą metodę fotometrycznego oznaczania miedzi w surowicy krwi za pomocą kwasu rubeanowodorowego.

Do 2 ml surowicy krwi (o zawartości 0—8 gamma Cu) wlewa się 4 ml mieszaniny (1 obj. 72% HClO₂ i 90 obj. stęż. HNO₃), ogrzewa się w temperaturze do 120° a następnie odparowuje do sucha w temperaturze 260 — 290°. Otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w celu związania zawartego (we krwi) żelaza na gorąco w 1 ml roztworu kwasu malonowego (100 ml 10% wodnego roztworu tego kwasu zobojętnia się stęż. NH₄OH i rozcieńcza do 50 ml). Do tak otrzymanego roztworu dodaje się następnie 3 ml roztworu odczynnika tj. mieszaniny składającej się z:

- 1) przesączonego roztworu 300 g octanu sodu w 500 ml wody do którego dodano 280 ml lod. CH₃COOH
- 2) roztworu 200 mg gumy arabskiej w 20 ml wody
- 3) roztworu 100 mg kwasu rubeanowodorowego w 20 ml alkoholu etylowego — rozcieńczonej wodą do 1 litra.

P_H otrzymanego barwnego roztworu, powstałego wskutek reakcji jonów Cu⁺⁺ z kwasem rubeanowodorowym, winno wynosić 4,2 — 4,3. Po upływie 30 minut dokonuje się pomiaru fotometrycznego przy 385 m μ . Czulość metody wynosi 0,75 gamma Cu.

H. Romanowski