

## KOLORYMETRYCZNE OZNACZANIE PALMITYNIANU ASKORBILOWEGO

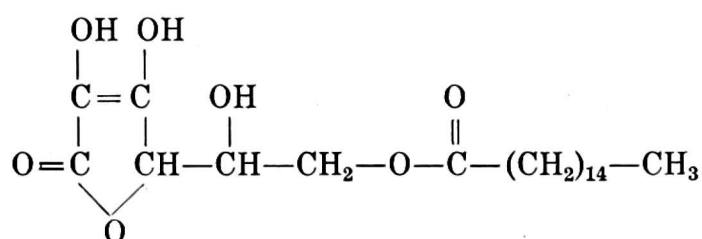
J. BUDSŁAWSKI, K. POGORZELSKI

Katedra Chemii Mleka i Przetworów Mleczarskich Wyższej Szkoły Rolniczej  
w Olsztynie

Kierownik: doc. dr Józef Budślawski

### W s t ę p

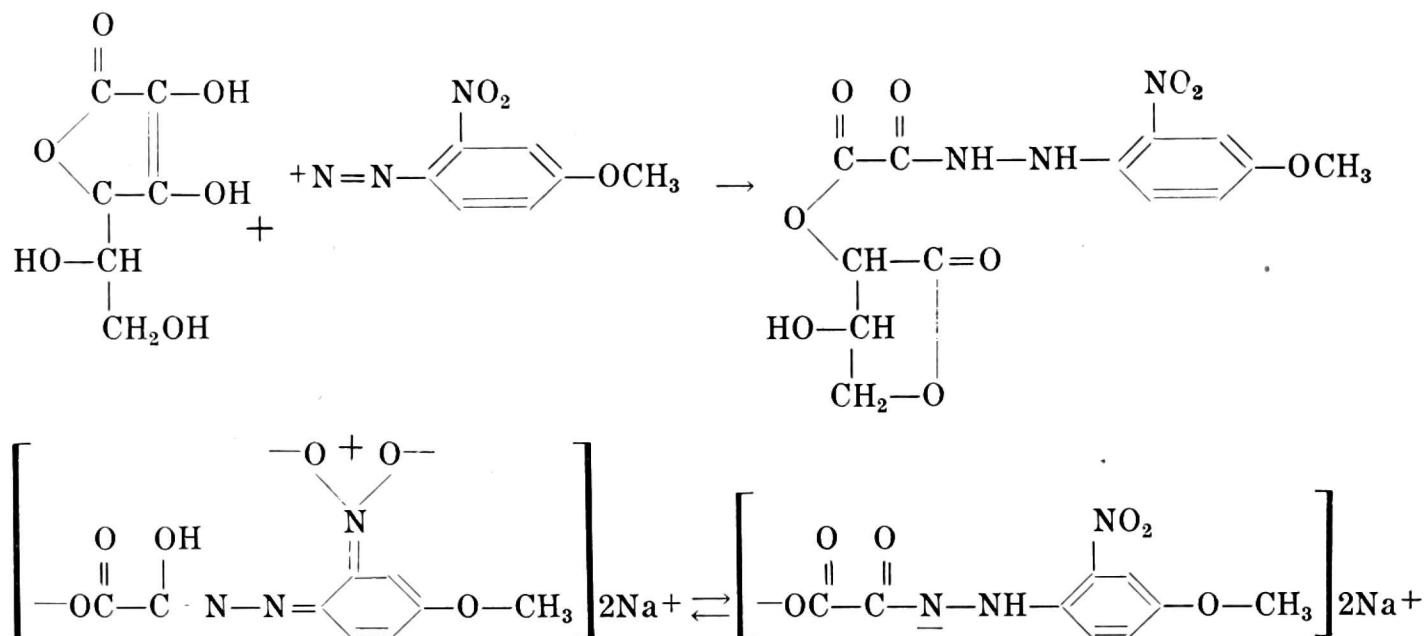
Palmitynian askorbilowy (PA), produkt estryfikacji kwasu l-askorbinowego z kwasem palmitynowym (3), zachowujący własności redukujące kwasu l-askorbinowego, bywa używany w charakterze przeciwutleniacza do utrwalania olejów i produktów tłuszczowych (1, 4). Jego wzór chemiczny jest następujący:



1 mg PA odpowiada 0,425 mg kwasu l-askorbinowego.

Dotychczas, o ile wiadomo, nie było metody ilościowego oznaczania PA, natomiast jest możliwe jego wykrywanie łącznie z innymi przeciwutleniaczami w materiałach tłuszczowych, sposobem chromatografii bibułowej (2). Próby zastosowania metod używanych zwykle do oznaczania kwasu l-askorbinowego (z indofenolem lub jodometrycznie itp.) nie powiodły się z powodu nierozpuszczalności PA w środowisku wodnym. Dopiero metoda kolorymetrycznego oznaczania kwasu l-askorbinowego opracowana przez Schmalla i współpracowników (6) dała podstawy do przystosowania jej również do oznaczania PA. Metoda ta polega na wiązaniu kwasu l-askorbinowego z dwuazowaną 4-metoksy-2-nitroanaliną

w środowisku kwaśnym; produkt tej reakcji w roztworze zasadowym daje silnie niebieskie zabarwienie o maksymalnej absorpcji przy długości fali 570 m $\mu$ . Przebieg reakcji według Schmalla i współpracowników (7) jest następujący:



Opierając się na tych danych podjęto więc próbę adaptacji metody Schmalla do oznaczania PA, który posiada nienaruszone ugrupowanie endiolowe.

## Opis metody

### Odczynniki

1. Odczynnik aminowy: 500 mg przekrystalizowanej w etanolu 4-metoksy-2-nitroaniliny (t. t. 125° C) rozpuszcza się w 125 ml lodowatego kwasu octowego i dopełnia do 250 ml rozcieńczonym (10%) kwasem siarkowym. Odczynnik jest trwały w temperaturze pokojowej do dwóch miesięcy.
2. Wodny 0,2% roztwór NaNO<sub>2</sub>,
3. Etanol (może być również alkohol izopropylowy lub n-butyłowy).
4. Wodny 10% roztwór NaOH,
5. Wodny 0,5% roztwór (COOH)<sub>2</sub>.
6. Eter etylowy wolny od nadtlenczków.
7. Standardowy roztwór PA: 50 mg PA rozpuszcza się w alkoholu w kolbce o pojemności 50 ml; przed każdym oznaczaniem przygotowuje się świeży roztwór.

### Wykonanie oznaczenia

W zlewce o pojemności 100 ml miesza się ruchem obrotowym 1 ml odczynnika aminowego z 1 ml roztworu azotynu sodowego aż do zaniku

zabarwienia, następnie dodaje się 30 ml alkoholu, miesza i znowu dodaje 3 ml roztworu kwasu szczawiowego i około 3 g badanego materiału (ilość PA w próbce nie powinna przekraczać 2,5 mg). Po rozpuszczeniu się próbki i wymieszaniu, zawartość zlewki przenosi się bez strat do rozdzielacza o pojemności 300 ml (zlewkę dwukrotnie popłukuje się małymi porcjami alkoholu) i alkalizuje 10 ml wodorotlenku sodowego. Po wymieszaniu dodaje się 60 ml eteru etylowego i pozostawia do odstania się. Dolną warstwę zlewa się do kolbki miarowej o pojemności 100 ml, warstwę eterową przemywa się trzykrotnie porcjami po 2 ml zasady i po odstaniu się dolną warstwę każdorazowo zlewa do kolbki, dopełnia ją po znak wodą i po wymieszaniu, przed upływem 10 min. mierzy ekstynkcję roztworu spektrofotometrycznie przy długości fali 570 m $\mu$ . Równocześnie przeprowadza się ślepią próbę oraz oznaczanie ekstynkcji w próbkach standardowych (A i B), które sporządza się z tłuszczu wolnego od PA z dodatkiem małych ilości PA z roztworu standardowego (odczynnik 7,  $A < B$ ). Próbki standardowe traktuje się podobnie jak próbę właściwą; winny one zawierać różne ilości PA, lecz mniej niż w próbce właściwej. Zaleca się sporządzanie roztworu standardowego w 0,5% alkoholowym roztworze kwasu szczawiowego, co przedłuża jego trwałość. Ilość dodawanych odczynników aminowego i azotynowego nie powinna przekraczać 2 ml; większe ilości mogą spowodować spadek natężenia barwy (6). Nadmiar kwasu szczawiowego może spowodować zmętnienie roztworu.

### Obliczanie wyników

Do obliczania wyników może być sporządzona krzywa standardowa ekstynkcji jako funkcji stężenia PA w próbce, lub może być zastosowany następujący wzór (6):

$$X = A + \frac{(B - A)(E - C)}{D - C}$$

gdzie:

- $X$  — mg PA w badanej próbce,
- $A$  — mg PA w próbce standardowej A,
- $B$  — mg PA w próbce standardowej B,
- $C$  — ekstynkcja próbki standardowej A,
- $D$  — ekstynkcja próbki standardowej B,
- $E$  — ekstynkcja próbki właściwej.

### Wyniki oznaczeń PA w materiale tłuszczowym

a) Dokładność metody sprawdzono na próbkach masła i oleju lnianego z dodatkiem PA. Wyniki opracowano na zasadzie analizy statystycznej (5). Próbki przygotowywano następująco: Do odważonej porcji tłuszczu do-

dawano określoną ilość PA<sup>1</sup> i całość rozpuszczano w mieszaninie alkoholo-eterowej (1 : 1). Następnie do oznaczenia pobierano próbki roztworu o znanej zawartości PA (w granicach 0,5 do 2,5 mg).

Wyniki zestawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

Oznaczanie PA w maśle (mg)

	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono
	1,06	1,02; 1,04; 1,04; 1,06; 1,05	1,17	1,17; 1,17; 1,18; 1,16; 1,16	1,29	1,30; 1,30; 1,30; 1,29; 1,28	1,84	1,81; 1,83; 1,82; 1,84; 1,81
$\bar{x}$		1,042		1,168		1,294		1,818
$R$		0,04		0,02		0,02		0,02
$\bar{S}$		0,015		0,0084		0,0089		0,0034
$\bar{S}_x(\%)$		1,46		0,72		0,69		0,46
$P(0,95)$		$\pm 0,0204$		$\pm 0,0102$		$\pm 0,0102$		$\pm 0,0102$

Tabela 2

Oznaczanie PA w oleju lnianym (mg)

	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono	Dodano	Oznaczono
	0,73	0,72; 0,74; 0,73; 0,76; 0,77; 0,75	1,24	1,26; 1,27; 1,26; 1,25; 1,27; 1,26	1,36	1,36; 1,36; 1,36; 1,37; 1,38	1,62	1,61; 1,62; 1,61; 1,62; 1,63
$\bar{x}$		0,745		1,261		1,366		1,618
$R$		0,05		0,02		0,02		0,02
$\bar{S}$		0,0187		0,0078		0,0089		0,0084
$\bar{S}_x(\%)$		2,51		0,60		0,65		0,51
$P(0,95)$		$\pm 0,0255$		$\pm 0,0102$		$\pm 0,0102$		$\pm 0,0102$

Wyniki zawarte w tabelach 1 i 2 wskazują na wysoką dokładność i powtarzalność metody. Najmniejsze ilości PA, jakie można było oznaczyć w próbce wynosiły 0,15 do 0,20 mg. Metoda ta umożliwia zatem oznaczanie małych ilości PA w materiale badanym (w odniesieniu do kwasu l-askorbinowego wynosi to około 0,07 do 0,08 mg). Najlepsze wyniki otrzymywano przy zawartości 1,2 do 2,0 mg PA w próbce badanego materiału.

b) Celem zbadania możliwości śledzenia ubytków PA wskutek utleniania, badano postęp jego rozkładu w oleju rzepakowym pod działaniem rozproszonego światła słonecznego w temperaturze pokojowej, aż do całkowitego jego zaniku.

<sup>1</sup> Palmitynian askorbylowy Firmy Hofmann-La Roche w Bazylei.

Próbkę przygotowano następująco: do oleju rzepakowego dodawano 0,1% PA, następnie próbkę ogrzewano do 45°C energicznie mieszając. Po upływie 5 min olej sączono i oznaczano PA w osadzie na sączku (w roztworze alkoholowym) i w oleju. Następnie olej pozostawiano w naczyniu szklanym i PA oznaczano co 24 godz. Wyniki zestawiono w tab. 3.

Tabela 3

Oznaczenia PA w oleju rzepakowym (mg %)

	I	II
Dodano do oleju rzepakowego	100	100
Oznaczono w osadzie na sączku	55	60
Oznaczono w oleju rzepakowym	25	20
Strata PA	20	20
Oznaczono w oleju rzepakowym po 24 godz	16	12
Oznaczono w oleju rzepakowym po 48 godz	9	6
Oznaczono w oleju rzepakowym po 72 godz	ślady	ślady
Oznaczono w oleju rzepakowym po 96 godz	0	0

Z danych tabeli 3 wynika, że ubytki PA w oleju rzepakowym w czasie przechowywania, w warunkach doświadczenia, układają się podobnie jak w przypadku rozkładu kwasu l-askorbinowego (1). Należy też przypuszczać, że obecne w środowisku podczas rozkładu PA formy „dehydro” i „dwuketo” PA, podobnie jak w przypadku kwasu l-askorbinowego (6) nie mają wpływu na wyniki oznaczeń PA opisaną metodą.

## PIŚMIENNICTWO

1. Budzłowski J.: Studia nad użyciem kwasu L-askorbinowego i jego pochodnych w charakterze przeciwutleniaczy do masła. Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie, 8 (60), 243 (1959).
2. Gander K. F.: Papierchromatographischer Nachweis von Antioxydantien. Fette-Seifen-Anstrichmittel, 57, 423 (1955).
3. Hotzel A.: Vitamine und Vitaminpräparate. Verlag W. Saenger, Berlin, 1949, s. 345.
4. Riemenschneider R. W., Turner J., Wells P. A. and Ault W. C.: Fatty acid monoesters of L-ascorbic and D-isoascorbic acids as antioxidants for fats and oils. Oil and Soap, 21, 47 (1944).
5. Rokosz A.: Statystyka matematyczna. Warszawa, 1957.

6. Schmall M., Pifer C. W. and Wollish E. G.: Determination of ascorbic acid by a new colorimetric reaction. *Anal. Chem.* **25**, 1486 (1953).
7. Schmall M., Pifer C. W., Wollish E. G., Duschinsky R. and Gainer K.: Colorimetric determination of ascorbic acid. New development concerning the reaction with diazotized 4-methoxy-2-nitroaniline. *Anal. Chem.*, **26**, 1521 (1954).