

УДК 543.422.3

ТВЕРДОФАЗНО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИМЕТАКРИЛАТНУЮ МАТРИЦУ

А.В. Суханов, Н.А. Гавриленко*

Томский государственный университет

*Томский политехнический университет

E-mail: gavrilkenko@mail.tsu.ru

Изучено взаимодействие аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом, иммобилизованным в полиметакрилатную матрицу. Разработана простая методика твердофазно-спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты. Методика применена для анализа экстрактов растительного сырья.

Ключевые слова:

Твердофазная спектрофотометрия, иммобилизованный реагент, 2,6-дихлорфенолиндофенол, определение аскорбиновой кислоты.

Key words:

Solid-phase spectrophotometry, immobilized reagent, 2,6-dichloroindophenol, determination ascorbic acid.

Витамин С – L-аскорбиновая кислота является широко распространенным компонентом в пищевой и фармацевтической промышленности. Синтетический витамин С широко используется в качестве пищевых добавок и, следовательно, имеет свой Е номер (Е300). Использование L-аскорбиновой кислоты в качестве пищевых добавок компенсирует потери витамина в процессе приготовления пищи либо просто повышает природное содержание витамина. Также L-аскорбиновую кислоту используют в качестве антиоксиданта, что повышает кислотность продуктов и увеличивает срок их хранения. Общеизвестна значимость витамина С в качестве компонента фармацевтических препаратов. Обычно она используется не в чистом виде, а в смеси с другими веществами, которые часто добавляются для улучшения вкуса. L-аскорбиновая кислота обнаружена у всех представителей растительного мира, во всех частях растений, и часто в достаточно больших количествах.

Большинство методов количественного определения аскорбиновой кислоты основаны на ее восстановительных свойствах. Традиционные титриметрические методы [1, 2] сложно использовать при анализе растворов, имеющих собственную интенсивную окраску. Предложенные современные высокочувствительные физико-химические методы определения аскорбиновой кислоты [3], имеют общий недостаток – использование токсических органических реагентов. Указанный недостаток можно устранить, используя реагенты, иммобилизованные на твердых носителях. Кроме того, иммобилизованные реагенты могут быть использованы для определения элементов в твердой фазе методами спектроскопии, в качестве готовой аналитической формы для визуально-тестовых методов анализа и чувствительного элемента в оптических сенсорах. В данной работе, для разработки твердофазно-спектрофотометрического метода определе-

ния аскорбиновой кислоты в экстрактах растительного сырья, было предложено использовать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХИФ), иммобилизованный в полиметакрилатную матрицу.

Полиметакрилатную матрицу в виде прозрачной пластины толщиной $(0,60 \pm 0,04)$ мм получали радикальной блочной полимеризацией по методике, описанной в работе [4]. Из исходной пластины вырезали пластины размером 6×8 мм массой около 0,05 г. В работе использовали реагенты марки «х.ч.», «ч.д.а.». Исходные растворы натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола и аскорбиновой кислоты готовили растворением их точных навесок в бидистиллированной воде. Рабочие растворы готовили последовательным разбавлением исходных растворов непосредственно перед использованием. Необходимое значение рН создавали универсальным и цитратным буферными растворами [5].

Иммобилизацию ДХИФ в полиметакрилатную матрицу проводили сорбцией из водного раствора в статическом режиме. Для этого полиметакрилатную матрицу помещали в раствор реагента и перемешивали в течение 5 мин, при этом матрица окрашивалась в синий цвет, соответствующий окисленной ионной форме реагента ($\lambda_{\max} = 630$ нм). Спектры поглощения и оптические плотности растворов и полиметакрилатной матрицы измеряли на спектрофотометрах Evolution 600 и Spekol 21. Оптические характеристики полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным реагентом после контакта с исследуемым раствором измеряли относительно немодифицированной полиметакрилатной матрицы. Величину рН растворов контролировали с помощью иономера И-160.

Взаимодействие аскорбиновой кислоты с иммобилизованным реагентом изучали в статическом режиме методом твердофазной спектрофотометрии. Для этого 50 мл раствора аскорбиновой кислоты определенной концентрации и кислотности

перемешивали 5...45 мин с 0,05 г полиметакрилатной матрицы, модифицированной 2,6-дихлориндофенолом. Затем измеряли оптическую плотность в максимуме полосы поглощения ДХИФ в полиметакрилатной матрице.

Влияние рН раствора на восстановление аскорбиновой кислотой иммобилизованного ДХИФ изучали следующим образом: матрицы, с одинаковым содержанием реагента, перемешивали с раствором аскорбиновой кислоты определенной концентрации при заданном значении рН, параллельно получали матрицы после контакта с раствором с заданным значением рН, не содержащим аскорбиновой кислоты. Затем рассчитывали степень восстановления иммобилизованного реагента – α , по зависимости α от рН делали вывод об оптимальном значении рН раствора.

Степень восстановления иммобилизованного ДХИФ – α рассчитывали как

$$\alpha = \frac{A_0 - A_i}{A_0} 100 \%,$$

где A_0 , A_i – значения оптической плотности полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным ДХИФ после контакта с раствором определенной кислотности в отсутствии и присутствии аскорбиновой кислоты, соответственно. Измерение оптической плотности проводили при длине волны, соответствующей максимуму поглощения иммобилизованного реагента при данном значении рН.

Для изучения влияния количества реагента в матрице и времени контакта с анализируемым раствором на аналитический сигнал, готовили несколько серий пластин, модифицированных в растворах различной концентрации 2,6-дихлориндофенола. Содержание реагента в матрице рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{(C_0 - [C]) V}{m},$$

где C_0 и $[C]$ – концентрации определяемого соединения в водном растворе до и после сорбции, соответственно, мг/мл, V – объем раствора, из которого производится иммобилизация, мл, m – масса полиметакрилатной матрицы, г.

Затем каждую из серий пластин приводили в контакт с растворами аскорбиновой кислоты определенной концентрации при рН=3, в течение заданного времени. Экспериментальные данные представляли в виде зависимости степени восстановления от содержания реагента в матрице.

ДХИФ является хорошо изученным окислительно-восстановительным индикатором [6]. Восстановленная форма ДХИФ бесцветна, а окисленная форма действует как кислотно-основной индикатор, окрашенный в красно-розовый цвет в кислом растворе (молекулярная форма, HR, $\lambda_{\max} \approx 510$ нм) и в синий цвет в щелочном растворе (ионная форма, R⁻, $\lambda_{\max} \approx 605$ нм). При этом синяя окраска интенсивнее красной, индикатор в кислом растворе в молекулярной форме неустойчив и выпадает в осадок. 2,6-дихлориндофенол традиционно используется в титриметрических методах определения аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота восстанавливает окрашенный ДХИФ, с образованием бесцветного продукта. Реакция окисления – восстановления ДХИФ представлена на схеме.

В работе [7] показана возможность использования полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным ДХИФ в качестве чувствительного оптического элемента для определения восстановителей, в частности, аскорбиновой кислоты. После контакта с раствором аскорбиновой кислоты интен-

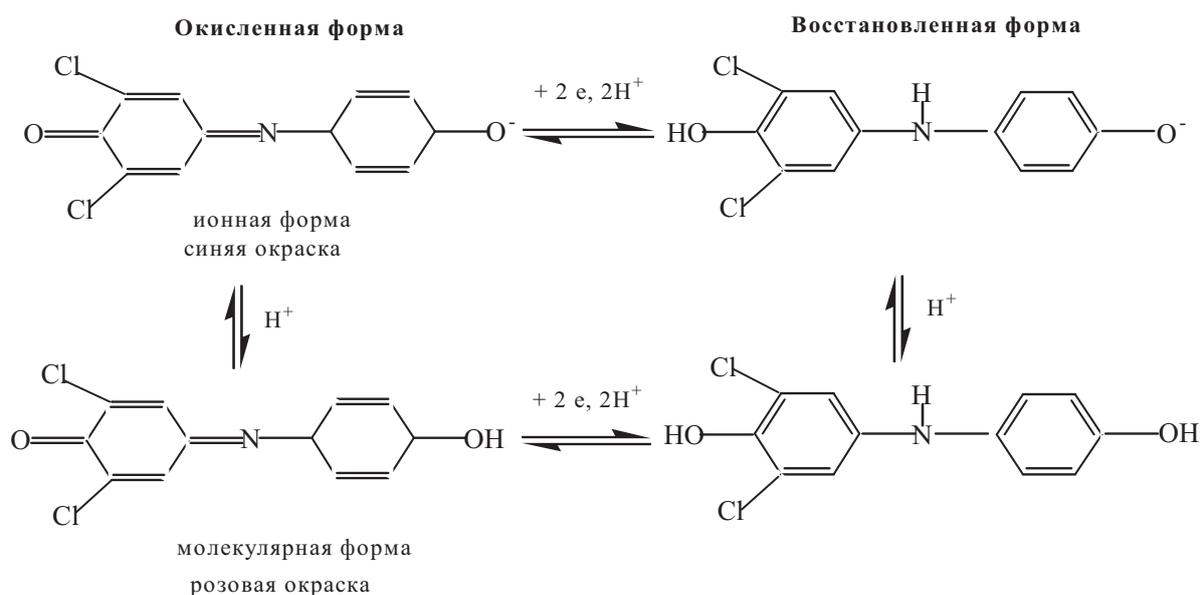


Схема. Реакция окисления – восстановления ДХИФ

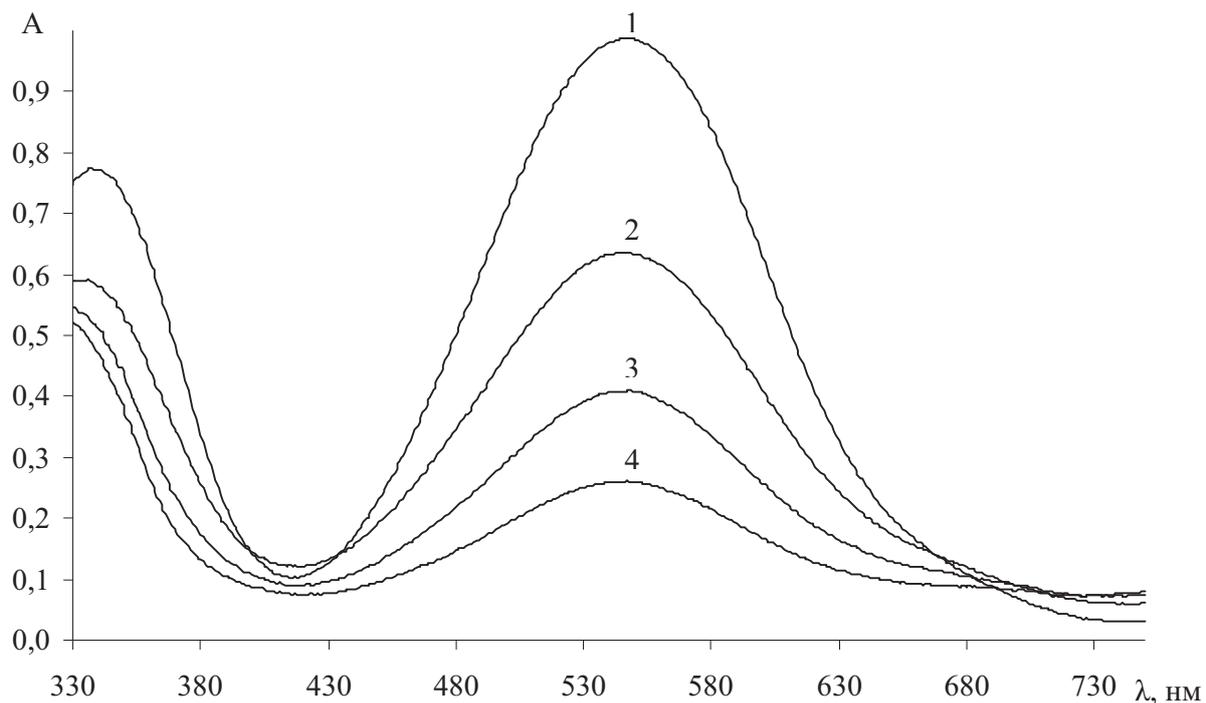


Рис. 1. Спектры поглощения полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным ДХИФ после контакта с раствором аскорбиновой кислоты, при pH 3, $C_{\text{Аск}}$, мг/л: 1) 0; 2) 50; 3) 70; 4) 100

сивность окраски полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным ДХИФ уменьшается. Обесцвечивание сопровождается снижением оптической плотности при 550 нм пропорционально содержанию аскорбиновой кислоты в растворе, рис. 1. Изменение оптической плотности при данной длине волны было выбрано в качестве аналитического сигнала.

Для определения оптимальных условий взаимодействия иммобилизованного ДХФ с аскорбиновой кислотой были исследованы: pH раствора ас-

корбиновой кислоты, содержание реагента в матрице и время контакта с анализируемым раствором.

Для изучения влияния pH на интенсивность взаимодействия иммобилизованного реагента с аскорбиновой кислотой была получена зависимость степени восстановления реагента (α) от pH анализируемого раствора, рис. 2. Наиболее полное восстановление иммобилизованного реагента наблюдается в области pH=2...3; для дальнейшей работы было выбрано значение pH=3.

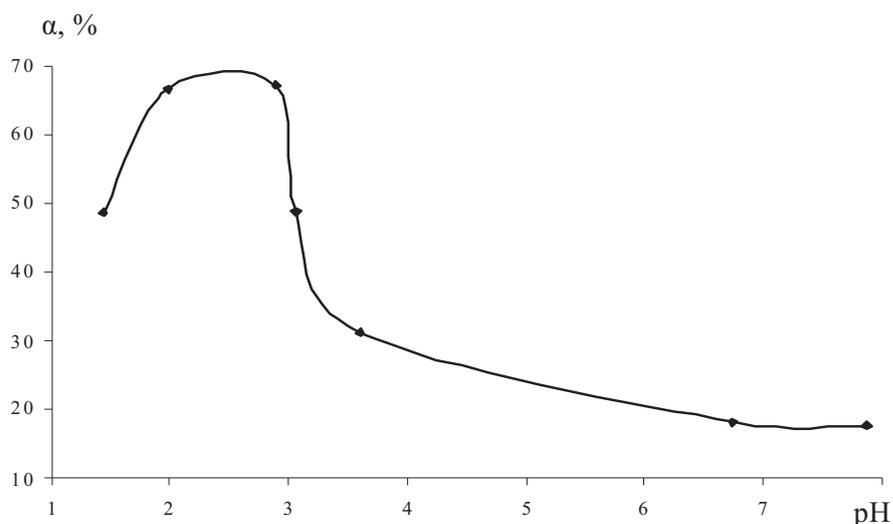


Рис. 2. Зависимость степени восстановления иммобилизованного ДХИФ (α) раствором аскорбиновой кислоты концентрацией 50 мг/л от pH раствора

В ходе исследования влияния содержания реагента в матрице на характер взаимодействия аскорбиновой кислоты с иммобилизованным ДХИФ была получена зависимость степени восстановления иммобилизованного ДХИФ (α) от содержания реагента в матрице (a) при $\text{pH}=3$ (рис. 3). Наибольшая степень восстановления иммобилизованного реагента наблюдается при его содержании в матрице 0,30...0,35 мг/г. На рис. 4 представлены зависимости аналитического сигнала от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе при разном времени контакта полиметакрилатной матрицы с содержанием ДХИФ 0,35 мг/г; в табл. 1 приведены параметры соответствующих градуировочных зависимостей. При увеличении времени контакта увеличивается чувствительность определения, но уменьшается диапазон линейности градуировочной зависимости.

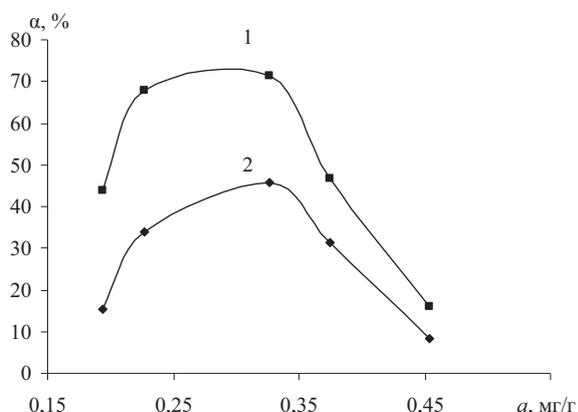


Рис. 3. Зависимость степени восстановления иммобилизованного ДХИФ (α) раствором аскорбиновой кислоты различной концентрации от содержания реагента в матрице (a), мг/г, $c_{\text{аск}}$: 1) 50; 2) 30 мг/л. Время контакта 15 мин, объем 50 мл, $\text{pH}=3$

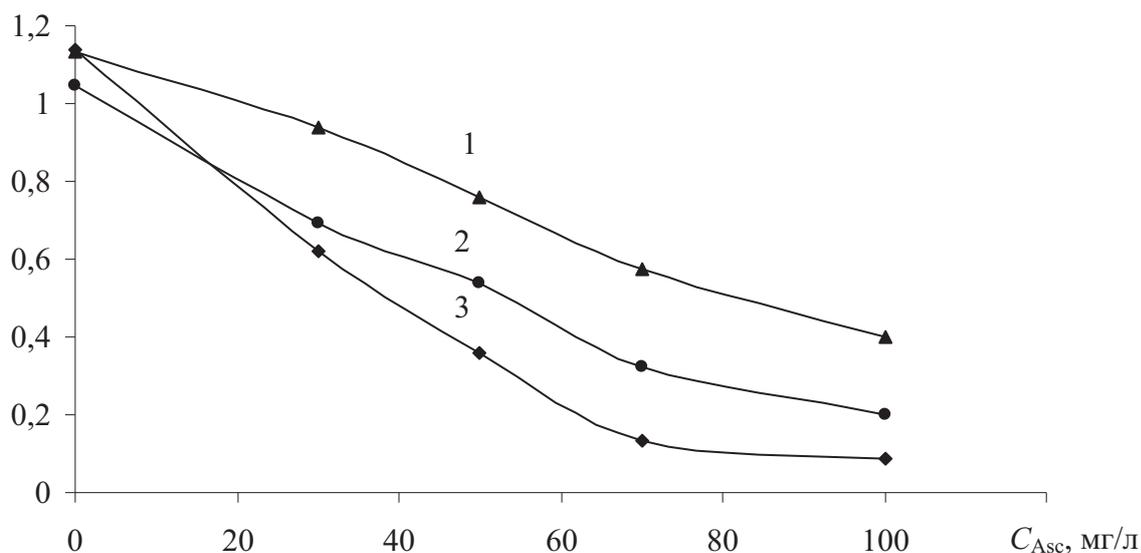


Рис. 4. Зависимость оптической плотности полиметакрилатной матрицы с иммобилизованным ДХИФ при 550 нм от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе при контакте в течение: 1) 15; 2) 30 и 3) 45 мин ($V=50$ мл, $\text{pH}=3$)

Таблица 1. Параметры уравнений для определения концентрации аскорбиновой кислоты. Коэффициент корреляции $-0,997$

Время контакта, мин	Уравнение	ДОС, мг/л
15	$A=1,141-0,008c$	0...100
30	$A=1,031-0,010c$	0...70
45	$A=1,124-0,016c$	0...50

ДОС – диапазон определяемых содержаний; А – значение оптической плотности; с – концентрация аскорбиновой кислоты, мг/л.

На основании проведенных исследований была разработана методика твердофазно-спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты, которая апробирована при анализе экстрактов растительного сырья.

Методика определения. Аликвоту анализируемого раствора с содержанием аскорбиновой кислоты 0,5...5 мг вносили в колбу вместимостью 50 мл, создавали $\text{pH}=3,0$ цитратным буфером и разбавляли дистиллированной водой. В раствор помещали пластинку полиметакрилатной матрицы, модифицированную ДХИФ, и перемешивали в течение 15 мин. Затем пластинку сушили между листами фильтровальной бумаги и измеряли оптическую плотность при 550 нм. Содержание аскорбиновой кислоты находили по градуировочному графику.

Методика была апробирована при анализе аскорбиновой кислоты в соковом напитке «Да» (Изготовитель – ООО «СП Нидан – Экофрукт») и экстракте шиповника. Экстракт шиповника готовили по методике [8. С. 239]. В качестве метода сравнения при определении аскорбиновой кислоты в экстракте использовали титриметрический метод [8]. Использование иодатного метода для окрашенного образца сока представляло трудности, поэтому для оценки правильности результатов определения аскорбиновой кислоты в соке применяли метод «вве-

Таблица 2. Результаты определения аскорбиновой кислоты ($n=3$, $P=0,95$)

Объект	Введено, мг/л	Найдено			
		Предлагаемый	s_r , %	Титриметрический	s_r , %
Экстракт шиповника	–	$(0,29 \pm 0,09)$ мг/100 г	12,3	$0,293 \pm 0,004$	0,6
Соковый напиток «Да» (указано на упаковке 9 мг/100 мл)	–	(10 ± 3) мг/100 мл	11,9	–	–
	10	(22 ± 4) мг/100 мл	7,5	–	–

n – число опытов; P – доверительная вероятность; s_r – стандартное квадратичное отклонение.

дено – найдено». Результаты, полученные при применении обоих методов, согласуются (табл. 2).

Выводы

Исследовано взаимодействие аскорбиновой кислоты с иммобилизованным в полиметакрилатную матрицу 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Разработана методика твердофазно-спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты, позволяющая анализировать интенсивно окрашенные образцы, например, экстракты растительного сырья.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований, грант № 09-03-90758 (моб_ст).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР. Изд. XI. Вып. 2. – М.: Медицина, 1989. – 397 с.
2. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1983. – 272 с.
3. Запорожец О.А., Крушинская Е.А. Определение аскорбиновой кислоты методами молекулярной спектроскопии // Журнал аналитической химии. – 2002. – Т. 57. – № 4. – С. 343–354.
4. Индикаторный чувствительный материал для определения микроколичеств веществ: пат. 2272284 Рос. Федерация, № 2004125304/04; заявл. 18.08.04; опубл. 20.03.06, Бюл. № 8. – 8 с.
5. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1989. – 448 с.
6. Индикаторы. Т. 2 / под ред. Э. Бишопы. – М.: Мир, 1976. – 437 с.
7. Гавриленко Н.А., Суханов А.В., Мохова О.В. Окислительно-восстановительные и кислотно-основные свойства 2,6-дихлорфенолиндофенола иммобилизованного в полиметакрилатную матрицу // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т. 65. – № 1. – С. 20–24.
8. Девятнин В.А. Методы химического анализа в производстве витаминов. – М.: Медицина, 1964. – 370 с.

Поступила 10.02.2010 г.