

اندازه‌گیری غیر مستقیم اسید اسکوریک (ویتامین C) به روش طیف سنجی نوری

مسعود نجاتی یزدی نژاد*⁺

زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه شیمی، صندوق پستی ۵۳۸ - ۹۸۶۱۵

چکیده: یک روش نوین طیف سنجی نوری تشریح شده که در آن از مس (II) به عنوان عامل اکسید کننده ویتامین C استفاده شده است. بعد از کامل شدن واکنش اکسایش، مقدار اضافی مس (II) به وسیله تشکیل کمپلکس با لیگاند آلزارین رد س (ARS) اندازه‌گیری می‌شود. از یون تیوسیانات به عنوان عامل پایدارکننده مس (I) که محصول واکنش اکسایش است، استفاده شده است. از این روش برای اندازه‌گیری ویتامین C موجود در میوه‌ها و محصولات دارویی استفاده شده است. حد تشخیص و درصد انحراف معیار نسبی روش به ترتیب عبارتند از: ۰/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱/۰۲ درصد. در این روش آهن (III) مزاحمت جدی ایجاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اندازه‌گیری غیر مستقیم، اسید اسکوریک، طیف سنجی نوری، مس (II).

KEY WORDS: Indirect determination, Ascorbic acid, Spectrophotometric, Copper (II).

مقدمه

ویتامین C یا اسیداسکوریک یکی از ویتامین‌های محلول در آب است که به‌طور وسیعی در گیاهان و جانوران یافت می‌شود و در تغذیه، حفظ سلامتی و صنایع غذایی (به‌عنوان نگه‌دارنده مواد) اهمیت به‌سزایی دارد [۱ و ۲]. مهم‌ترین ویژگی شیمیایی ویتامین C قابلیت اکسید شدن آن به اسید دهیدرو اسکوریک و ایجاد یک سیستم اکسایش - کاهش می‌باشد [۳]. بیشتر جانوران قادرند این ویتامین را در بدن خود بسازند ولی انسان به دلیل نداشتن آنزیم تولیدکننده آن، قادر به چنین عملی نمی‌باشد. به دلیل اهمیت و افزایش روز افزون کاربرد این ماده در محصولات غذایی و دارویی، لازم است روش‌هایی با دقت و صحت و گزینش‌پذیری بالا در تعیین حال سریع و آسان و با قابلیت اتوماتیک شدن ابداع شوند. بر این اساس روش‌های دستگاهی زیادی از جمله روش‌های کروماتوگرافی [۴-۷] الکتروشیمیایی [۸-۱۳]، فلوریمتری [۱۴-۱۶]، نورافشانی شیمیایی [۱۷-۲۰]، آنزیمی [۲۱ و ۲۲] و طیف سنجی نوری

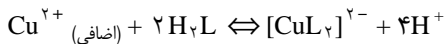
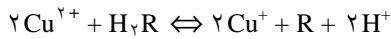
*عهده‌دار مکاتبات

[۲۳-۲۸] گزارش شده‌اند.

اساس بیشتر روش‌های اندازه‌گیری غیر مستقیم اسید اسکوریک به روش طیف سنجی نوری، مبتنی بر احیای یک یون فلزی توسط اسید اسکوریک است که محصول عمل احیاء در مجاورت یک لیگاند مناسب، کمپلکسی رنگی ایجاد می‌کند. به‌طور معمول از آهن (III) به‌عنوان اکسیدان و از $\alpha, \alpha' - \text{DIPICOL}$ [۳۱-۲۹]، $\alpha, \alpha' - \text{DIPICOL}$ [۳۲ و ۳۳] و فروزین [۳۴] به‌عنوان لیگاند استفاده می‌شود. تشکیل کمپلکس آهن (II) با معرف‌های ذکر شده نیازمند حداقل ۳۰ تا ۶۰ دقیقه زمان است که برای بهبود این امر، سیستم را به‌جای بسته (Batch) به‌صورت جاری (Flow) طراحی می‌کنند. البته این عمل خود مستلزم استفاده از یک سری تجهیزات است که به‌طور معمول در هر آزمایشگاهی در دسترس نیست و علاوه بر آن پهنه‌سازی شرایط کار برای رسیدن به پاسخ‌هایی تکرارپذیر، وقت‌گیر خواهد بود و فقط در مواردی که تعداد نمونه‌ها بسیار

+E-mail: massoudnejati@yahoo.com

می‌گیرد:



در این معادله‌ها، H_2R ، R و H_2L به ترتیب عبارتند از: اسید اسکوربیک، اسید دهیدرو اسکوربیک و آلیزارین رد اس (ARS). برای جلوگیری از انجام واکنش تسهیم نامتناسب مس (I)، از یون تیوسیانات استفاده شد [۳۷].

بهینه کردن شرایط آزمایش

عوامل مؤثر در اندازه‌گیری اسید اسکوربیک، با ثابت نگه داشتن تمامی شرایط و تغییر دادن تنها عاملی که مورد نظر بود، انجام شد. طیف جذبی محلول آبی آلیزارین رد اس در غیاب و در حضور مس (II) بررسی و طول موج ۵۱۰ نانومتر به عنوان طول موج مناسب انتخاب شد (شکل ۱).

تأثیر pH روی تشکیل کمپلکس مس (II) - آلیزارین رد اس در گستره ۳/۰ تا ۶/۵ مورد مطالعه قرار گرفت. مناسب‌ترین گستره pH عبارتست از ۴/۸ تا ۵/۲ که مقدار ۵/۰ در عمل انتخاب شد (شکل ۲).

اثر غلظت لیگاند در گستره ۰/۲۵ تا ۴/۰ برای نسبت مولی لیگاند به یون فلزی بررسی و برای داشتن بیشترین حساسیت، نسبت ۳ در عمل استفاده شد (شکل ۳).

برای اطمینان از عدم رقابت یون تیوسیانات با آلیزارین رد اس در مورد واکنش با یون مس (II) اثر این یون در گستره غلظتی صفر تا ۱۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت و مزاحمتی ملاحظه نشد. در عمل غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۴).

منحنی درجه‌بندی [۳۸]

در رسم منحنی درجه‌بندی، همه عوامل مؤثر در اندازه‌گیری، در مقدارهای بهینه شده ثابت نگه‌داشته شد و با استفاده از محلول‌های استاندارد اسیداسکوربیک، منحنی مربوطه رسم گردید. منحنی درجه‌بندی بر اساس رسم تفاضل میزان جذب محلول‌های حاوی اسید اسکوربیک و محلول‌های شاهد، نسبت به غلظت محلول‌های استاندارد رسم شد (شکل ۵). ضریب همبستگی، عرض از مبدأ و ضریب زاویه این منحنی خطی، به ترتیب عبارت بودند از: ۰/۹۹۹۱، ۰/۰۳۴۲۹ و ۰/۰۱۳۸۸.

زیاد است، مقرون به صرفه است [۳۵]. البته با این وجود هنوز هم مزاحمت‌های جدی از طرف برخی کاتیون‌ها مانند مس (II)، نیکل (II) و کبالت (II) وجود دارد [۳۶]. این در حالی است که روش پیشنهادی موجود با چنین محدودیت‌هایی مواجه نمی‌باشد و به‌علاوه از نظر مواد شیمیایی مورد استفاده، دارای هزینه پایین و مصونیت بالا می‌باشد.

بخش تجربی

مواد شیمیایی

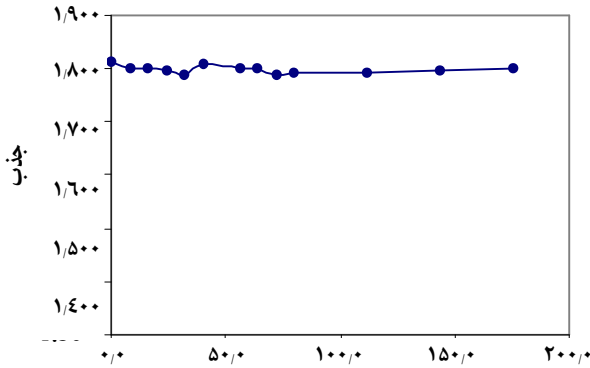
تمام مواد شیمیایی استفاده شده، از بالاترین خلوص برخوردار بودند و از آب مقطر دوبار تقطیر در تمام مراحل آزمایش استفاده شد. محلول مادر اسید اسکوربیک (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از حل کردن ۰/۰۲۵۰ گرم اسید اسکوربیک (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. محلول‌های کاری از رقیق کردن مناسب محلول مادر تهیه شدند. محلول آلیزارین رد اس با غلظت $4/0 \times 10^{-3}$ مولار از حل کردن ۰/۱۴۵۷ گرم آلیزارین رد اس (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. محلول مس (II) با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از حل کردن ۰/۰۷۰ گرم سولفات مس (II) پنج آبه (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد. محلول بافر اسید استیک - استات سدیم با غلظت ۰/۵۰ مولار، از رقیق کردن ۷/۵ میلی‌لیتر اسید استیک غلیظ (فلوکا) در یک بالن حجمی ۲۵۰ میلی‌لیتری و تنظیم pH آن در ۵/۰ به کمک محلول غلیظ هیدروکسید سدیم تهیه شد. محلول تیوسیانات ۱-ا غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حل کردن ۰/۰۳۳۵ گرم تیوسیانات پتاسیم (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد.

دستگاه‌ها

از دستگاه طیف سنج نوری شیمادزو مدل ۲۱۰۰ مجهز به سیستم پردازش‌گر و چاپ‌گر مربوطه برای اندازه‌گیری میزان جذب محلول‌ها استفاده شد. سلول مورد استفاده در دستگاه دارای طول مسیر یک سانتی‌متر و از جنس کوارتز بود. برای کنترل pH محلول‌ها، از دستگاه pH متر متروم مدل ۶۹۱ استفاده شد.

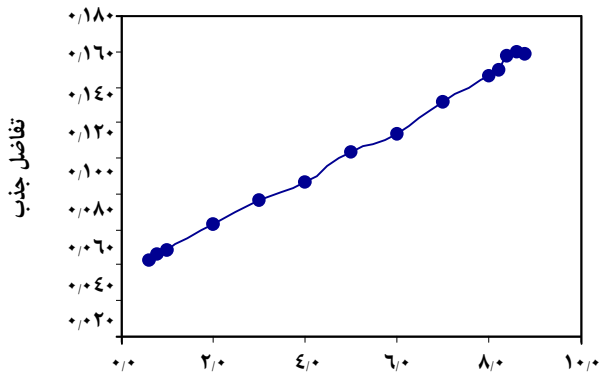
روش پیشنهادی

اندازه‌گیری اسید اسکوربیک بر اساس واکنش‌های زیر صورت



شکل ۴- اثر غلظت تیوسیانات بر سیستم مس (II) - آلیزارین رد اس

شرایط: ۱۶/۰ میکروگرم بر میلی لیتر مس (II)، 8×10^{-4} مولار آلیزارین رد اس، حجم بافر ۱/۰ میلی لیتر.

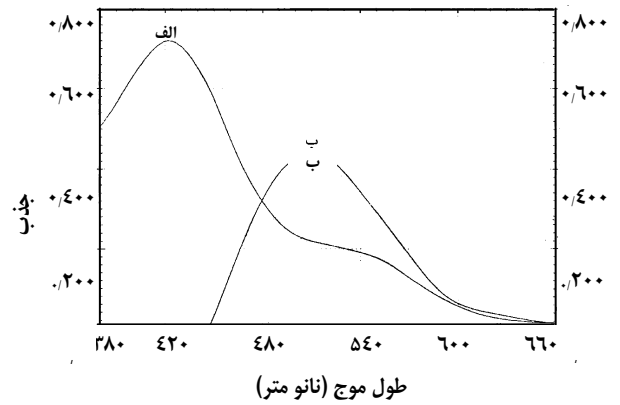


شکل ۵- منحنی درجه بندی اسید اسکوربیک شرایط: ۱۶/۰ میکروگرم بر میلی لیتر مس (II)، ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیوسیانات، 8×10^{-4} مولار آلیزارین رد اس، حجم بافر ۱/۰ میلی لیتر.

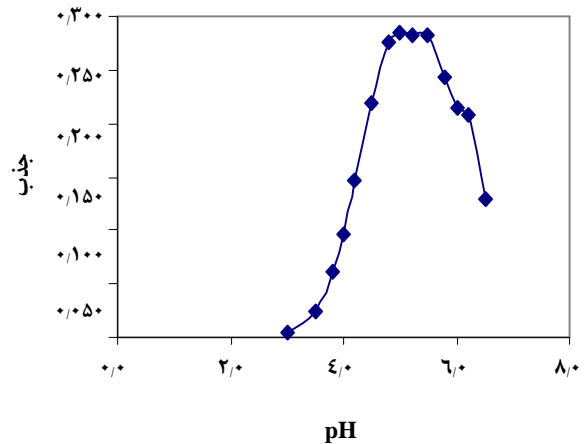
جدول ۱- اثر مزاحمت برخی از یون‌ها.

کاتیون	غلظت (ppm)*	آنیون	غلظت (ppm)*
Mn(II)	۱۰۰۰	F ⁻	۱۰۰۰
Co(II)	۵۰۰	Br ⁻	۱۰۰۰
Ni(II)	۵۵۰	Cl ⁻	۱۰۰۰
Zn(II)	۱۰۰۰	نیترات	۷۰۰
Mg(II)	۱۰۰۰	استات	۲۰۰۰
Ba(II)	۱۰۰۰	سیترات	۲۰۰۰
Ca(II)	۱۰۰۰	اگزالات	۱۰۰۰
Na(I)	۱۰۰۰		
K(I)	۱۰۰۰		
Fe(III)	مزاحم		

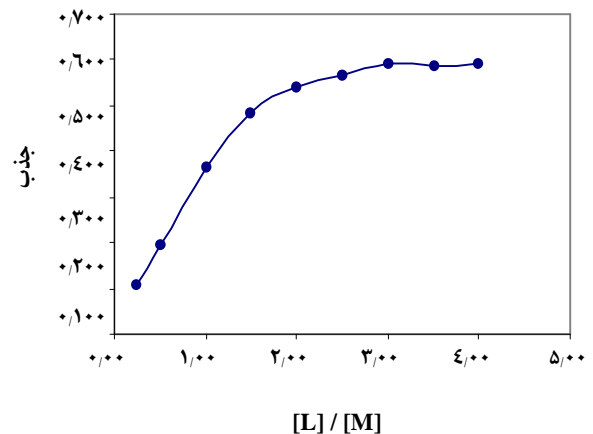
*حداکثر غلظت بررسی شده



شکل ۱- طیف جذبی لیگاند آلیزارین رد اس نسبت به شاهد آب مقطر (الف) و کمپلکس آن با مس (II) نسبت به شاهد لیگاند (ب).



شکل ۲- اثر pH بر سیستم مس (II) - آلیزارین رد اس.



شکل ۳- اثر غلظت لیگاند بر سیستم مس (II) - آلیزارین رد اس شرایط: 8×10^{-5} مولار مس (II)، حجم بافر ۱/۰ میلی لیتر.

جدول ۲- مقایسه روش ابداعی و روش استاندارد.

درصد خطا	روش ابداعی	روش استاندارد *	
۳/۶۳	۴۵۹/۱۶	۴۴۳/۰۶	آب میوه
۱/۹۱	۲۴۵۶/۱۹	۲۴۱۰/۲۶	قرص ویتامین

* غلظت برحسب ppm

استاندارد [۳۹] مقایسه و همخوانی خوبی بین دو روش مشاهده شد (جدول ۲).

نتیجه گیری نهایی

این روش قادر است، با دقت و صحت قابل قبول، مقدارهای کم اسید اسکوربیک را در نمونه‌های دارویی و غذایی، اندازه‌گیری کند و تنها مزاحمت موجود از طرف یون آهن (III) است که بایستی آن را قبل از اندازه‌گیری برطرف کرد.

تاریخ دریافت: ۸۲/۲/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۲/۱۴

حد تشخیص و تکرارپذیری روش [۳۸]

با استفاده از روش رگرسیون خطی، حد تشخیص روش برابر ۰/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. هم‌چنین با انجام آزمایش روی محلول استاندارد با غلظت ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید اسکوربیک (n = ۵) در شرایط بهینه ذکر شده، مقدار درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD) برابر ۱/۰۲ درصد محاسبه شد.

مزاحمت‌ها

برای مطالعه مزاحمت احتمالی یون‌هایی که ممکن است همراه اسید اسکوربیک در نمونه مورد آزمایش وجود داشته باشند، یک‌سری آنیون و کاتیون مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج در جدول ۱ آمده است.

کاربرد روش

از روش ابداعی ذکر شده، برای اندازه‌گیری اسید اسکوربیک موجود در نمونه‌های دارویی و آب میوه استفاده شد. نتایج با روش

مراجع

- [1] Tolonen, M., "Vitamins and Minerals in Health and Nutrition", Ellis Horwood, New York, pp.119-123(1990).
- [2] Machlin, L.J., "Handbook of Vitamins", Marcell Dekker, New York, pp.195-245 (1984).
- [3] Seib, P.A., and Tolbert, B.M., "Ascorbic Acid" Am. Chem. Soc., New York, pp.153-178 (1982).
- [4] Leubolt, R., and Klein, H., *J. Chromatogr.*, **640**, 271(1993).
- [5] Iwase, H., and Ono, I., *J. Chromatogr.: Biomed. Appli.*, **655**, 195(1994).
- [6] Daood, H.G., Biacs, P.A., Dakar, M.A., and Hajdu, F.J., *J. Chromatogr. Sci.*, **32**,481(1994).
- [7] Kishida, E., Nishimoto, Y., and Kojo, S., *Anal. Chem.*, **64**, 1505 (1992).
- [8] Zen, J.M., Tsai, D.M., Senthil, A., and Dharuman, V., *Electrochem. Commun.*, **2**,782(2000).
- [9] Zen, J., Tsai, D., and Yang, H., *Electroanalysis*, **14**, 1597(2002).
- [10] Matos, R., Augelli, M., and Pedrott, J., *Electroanalysis*, **10**, 887 (1998).
- [11] Sahbaz, J., and Somer, G., *Food Chem.*, **44**, 141 (1992).
- [12] Kulys, J., and Costa, E., *Anal. Chim. Acta*, **243**, 173(1991).
- [13] Korell, U., and Lennox, R.B., *Anal. Chem.*, **64**, 147 (1992).
- [14] Chung, H.K., and Ingle, J.D., *Talanta*, **38**, 355(1991).
- [15] Huang, H.P., Cai, R.X., and Du, Y.M., *Clin. Chem. Lett.*, **6**, 235(1995).
- [16] Wang, R., Liu, Z., Cai, R., and Li, X., *Anal. Sci.*, **18**, 977 (2002).
- [17] Perez, T., Matinez, C., and Sanz, A., *Anal. Chim. Acta*, **308**,299(1995).
- [18] Arya, S.P., Mahajan, M., and Jain P., *Anal. Chim. Acta*, **417**,1(2000).

- [19] Zaverukha, O., and Skorobogaty, Y.P. *Zh. Anal. Khim.*, **49**,1344(1991).
- [20] Kim, T.M., Huang, Y., and schmid, R.D., *Anal. Lett.*, **23**,2273(1990).
- [21] Daily, S. Armfied, S.J., Haggett, B.G.D., and Downs, M.E.A., *Analyst*, **116**, 569(1991).
- [22] Huang, H., Cai, R., Du, Y., and Zeng, Y., *Anal. Chim. Acta*, **309**,271(1995).
- [23] Sultan, S.M., and Desai, N.I., *Talanta*, **45**,1061(1998).
- [24] Sultan, S.M., Abdenabi, A.M. and Suliman, F. E.O., *Talanta*, **41**,125(1994).
- [25] Safavi, A., and Fotouhi, L., *Talanta*, **41**,1225(1994).
- [26] Leon, L.E., and Catapano, J., *Anal. Lett.*, **26**, 1741(1993).
- [27] Paula, A., Paim, S., and Reis, B., *Anal. Sci.*, **16**,487(2000).
- [28] Fujita, Y., Mori, I., and Yamaguchi, T., *Anal. Sci.*, **17**,853(2001).
- [29] Arya , S. P. and Mahajan , M. , *Proc. Natl. Acad. Sci. India* , **67**, 39(1997).
- [30] Okamura , M. , *Clin. Chim. Acta* , **115** , 393 (1981).
- [31] Kleszczewska , E. , *J. Trace and Microprobe Tech.* , **21** , 85(2003) .
- [32] Besada , A. , *Talanta* , **34** , 731(1987) .
- [33] Issopoubs , P. B. and Salta , S.E. , *Fresenius J. Anal. Chem.* , **357** , 317(1997) .
- [34] Molina , A. , Ortega , I. and Pascual M. I. , *Talanta* , **47** , 531(1998) .
- [35] Arya , S.P. , Mahajan , M. and Jain , P. , *Anal. Sci.* , **14** , 889(1998) .
- [36] Jaselskis , B. and Nelapaty , J. , *Anal. Chem.* , **44** , 379(1972) .
- [37] Kolthhoff, I. M., and Elving, P.J., "Treaties on Analytical Chemistry". Wiley, New York, Part 1, Vol. 2, p.628(1984).
- [38] Miller, J. N. and Miller, T. C., "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry", Pearson Edu., Harlow, (2000).
- [39] AOAC Official Methods of Analysis, p. 1058 (1990).