Archive of SID

اندازه‌گیری غیرمستقیم اسید اسکوربیک (ویتامین C) به روش طیف سنجی نوری

مسعود نجاتی یزدی نژاد*+

زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه شیمی، صندوق پستی ۵۳۸ ـ 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) به‌وسیله تشکیل کمپلکس با لیگاند آلیزارین 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 به‌ترتیب عبارتنداز: ۰/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱/۰۲ درصد. در این روش آهن (III) مزاحمت جدی ایجاد می‌کند.*

واژه‌های کلیدی: *اندازه‌گیری غیرمستقیم، اسید اسکوربیک، طیف سنجی نوری، مس (II).*

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

مقدمه

ویتامین C یا اسیداسکوربیک یکی از ویتامین‌های محلول در آب است که به‌طور وسیعی در گیاهان و جانوران یافت می شود 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 اسکوربیک وایجادیک سیستم اکسایش ـ کاهش می باشد[۳]. بیشتر جانوران قادرند این ویتامین را در بدن خود بسازند ولی انسان به دلیل نداشتن آنزیم تولیدکننده آن، قادر به چنین عملی نمی باشد. به‌دلیل اهمیت و افزایش روز افزون کاربرد این ماده در محصولات غذایی و دارویی، لازم است روش‌هایی بادقت وصحت وگزینش‌پذیری بالاودرعین حال سریع و آسان و با قابلیت اتوماتیک شدن ابداع شوند. بر این اساس روش‌های دستگاهی زیادی از جمله روش‌های کروماتوگرافی [۴ـ۷] الکتروشیمیایی [۸ ـ ۱۳]، فلوریمتری [۱۴ــ۱۶]، نورافشانی شیمیایی [۱۷ــ۲۰]، آنزیمی [۲۱و۲۲] و طیف سنجی نوری [۲۳ـ۲۸] گزارش شده‌اند.

اساس بیشتر روش‌های اندازه‌گیری غیر مستقیم اسید اسکوربیک به روش طیف سنجی نوری، مبتنی بر احیای یک یون فلزی توسط اسید اسکوربیک است که محصول عمل احیاء در مجاورت یک لیگاند مناسب، کمپلکسی رنگی ایجاد می‌کند. به‌طور معمول از آهن (III) به‌عنوان اکسیدان و از α,α' – دی پیریدیل [۲۹–۳۱] ، ۱۰,۱- فنانترولین [۳۲و۳۳] 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

www.SID.ir

Archive of SID

را به‌جای بسته (Batch) به‌صورت جاری (Flow) طراحی می‌کنند. البته این عمل خود مستلزم استفاده از یک‌سری تجهیزاتی است که به‌طور معمول در هر آزمایشگاهی در دسترس نیست و علاوه بر آن بهینه‌سازی شرایط کار برای رسیدن به پاسخ‌هایی تکرارپذیر، وقت‌گیر خواهد بود و فقط در مواردی که تعداد نمونه‌ها بسیار 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.

+E-mail: massoudnejati@yahoo.com

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 میلی لیتر) از حل کردن ۰/۰۲۵۰ گرم اسید اسکوربیک (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد. محلول‌های کاری از رقیق کردن مناسب محلول مادر تهیه شدند. محلول آلیزارین رد اس با غلظت $۴/۰ \times ۱۰^{-۳}$ مولار از حل کردن ۰/۱۴۵۷ گرم آلیزارین رد اس (مرک) در آب مقطر و به حجم رساندن در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری 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 ـ 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 ـا غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حل‌کردن 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 می‌گیرد:

$$۲Cu^{۲+} + H_۲R \Leftrightarrow ۲Cu^{+} + R + ۲H^{+}$$

$$Cu^{۲+}{}_{(\text{اضافی})} + ۲H_۲L \Leftrightarrow [CuL_۲]^{۲-} + ۴H^{+} \qquad ۲۰$$

در این معادله‌ها، $H_۲R$، R و $H_۲L$ به‌ترتیب 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 نگه‌داشتن 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 به‌عنوان طول موج مناسب انتخاب شد (شکل ۱).

تأثیر pH روی تشکیل کمپلکس مس (II) ـ آلیزارین رد اس در گسترهٔ 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).

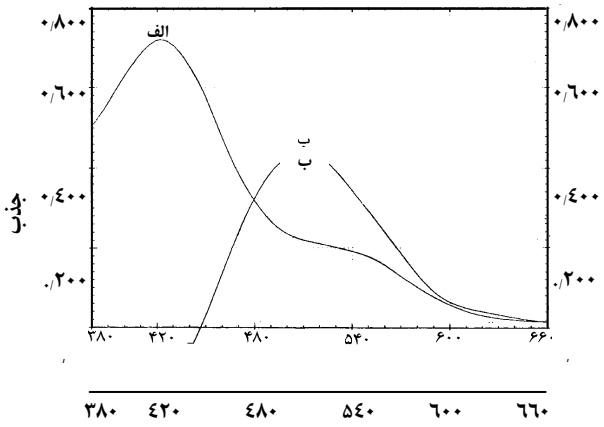
منحنی درجه‌بندی [۳۸]

در رسم منحنی درجه‌بندی، همه عوامل مؤثر در اندازه‌گیری، در مقدارهای بهینه شده ثابت نگه‌داشته شد و با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از محلول‌های استاندارد اسیداسکوربیک، منحنی مربوطه رسم گردید. منحنی درجه‌بندی بر اساس رسم تفاضل میزان جذب محلول‌های حاوی اسید اسکوربیک و محلول‌های شاهد، نسبت

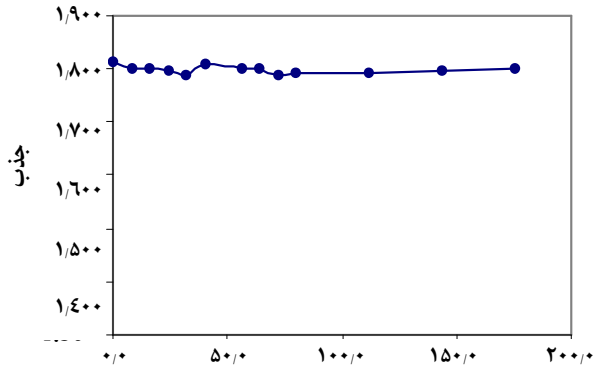


طول موج (نانو متر)

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

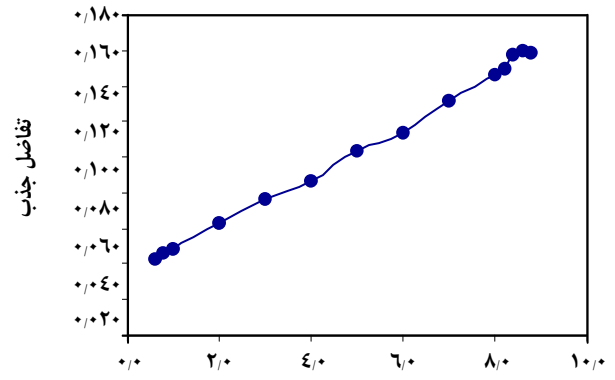
به غلظت محلول‌های استاندارد رسم شد (شکل۵). ضریب همبستگی، عرض از مبدأ و ضریب زاویه این منحنی خطی، به‌ترتیب عبارت بودند از: ۰/۹۹۹۱، ۰/۰۳۴۲۹و ۰/۰۱۳۸۸.

شکل ۳ـ اثر غلظت لیگاند بر سیستم مس(II) ـ آلیزارین رد اس

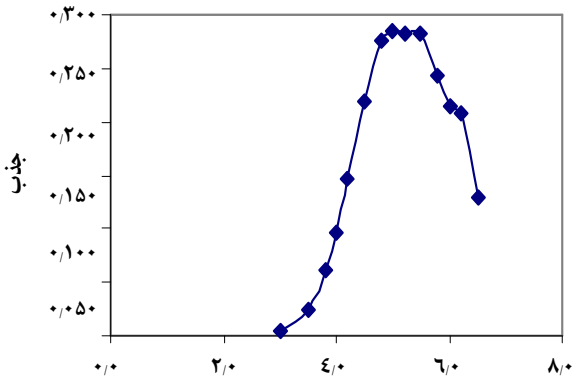


غلظت تیوسیانات (ppm)

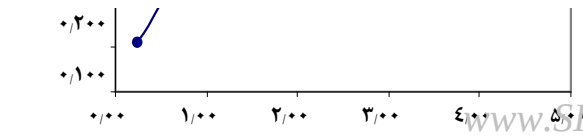
شکل ٤ـ اثر غلظت تیوسیانات بر سیستم مس (II) ـ آلیزارین رد اس شرایط: ۱٦/۰ میکروگرم بر میلی لیتر مس (II)، $۸/۰\times۱۰^{-٤}$ مولار آلیزارین رد اس، حجم بافر ۱/۰ میلی لیتر .



غلظت (ppm)



pH



[L] / [M]

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۵ـ منحنی درجه بندی اسید اسکوربیک شرایط: ۱۶/۰ میکروگرم بر میلی لیتر مس (II) ، ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیوسیانات، $8/0\times10^{-4}$ مولار آلیزارین رد اس، حجم بافر ۱/۰ میلی لیتر.

جدول ۱ـ اثر مزاحمت برخی از یون‌ها.

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

*حداکثر غلظت بررسی شده

حد تشخیص و تکرارپذیری روش [۳۸]

با استفاده از روش رگراسیون خطی، حد تشخیص روش برابر ۰/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. هم‌چنین با انجام آزمایش روی محلول استانداردی 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 استاندارد [۳۹] مقایسه و هم‌خوانی خوبی بین دو روش مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲ـ مقایسه روش ابداعی و روش استاندارد.

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

* غلظت برحسب ppm

نتیجه‌گیری 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

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., Senthi, A., and Dharuman, V., *Electrochem. Commun.,* **2**,782(2000).

www.SID.ir

Archive of SID

[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 Skorobogatyi, 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., "Staticstics and Chemometrics for Analytical Chemistry", Pearson Edu., Ilarlow, (2000).
[39] AOAC Official Methods of Analysis, p. 1058 (1990).

www.SID.ir