



Государственный комитет  
СССР  
по делам изобретений  
и открытий

# О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(11) 971120

(61) Дополнительный к патенту -

(22) Заявлено 25.08.78 (21) 2652749/23-04

(23) Приоритет - (32) 09.12.77

(31) P2754944.6 (33) ФРГ

(51) М. Кл.<sup>3</sup>

G 01 N 21/78

Опубликовано 30.10.82 Бюллетень № 40

(53) УДК 543.42.062  
(088.8)

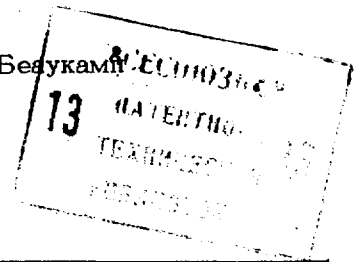
Дата опубликования описания 30.10.82

(72) Авторы  
изобретения

Иностранцы  
Ульферт Денеке, Герхард Михаль и Клаус Бесукам  
(ФРГ)

(71) Заявитель

Иностранная фирма  
"Берингер Маннхайм ГмбХ"  
(ФРГ)



## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ ИЛИ ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

1

Изобретение относится к способам определения аскорбиновой или дегидроаскорбиновой кислоты.

Определение аскорбиновой кислоты имеет большое значение, прежде всего в химии пищевых продуктов, для оценки качества различных пищевых продуктов, таких, например, как фруктовые соки, свежие овощи, свежемороженые овощи и другие. Часто для прохладительных напитков требуется определенное содержание витамина С, следовательно, оно должно контролироваться. Аскорбиновую кислоту добавляют в качестве антиокислителя и осветлителя, и поэтому содержание ее также должно определяться. При клинико-диагностических исследованиях обнаружение аскорбиновой кислоты в моче обеспечивает быструю диагностику различных заболеваний. Представляет интерес определение аскорбиновой кислоты в сыворотке для тропических стран, так как в условиях этих стран симптомы авитаминозов (цинги) настолько прикрываются симптомами других болезней, что их невозмож-

2

но выделить. Учитывая важность определения аскорбиновой кислоты, разработаны различные способы ее определения.

Все сказанное выше справедливо и для дегидроаскорбиновой кислоты, так как аскорбиновая кислота под действием кислорода воздуха легко переходит в дегидроаскорбиновую кислоту. Поэтому в испытуемых продуктах часто присутствует смесь аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. Поскольку дегидроаскорбиновая кислота оказывает такое же действие, как витамин С, то в большинстве случаев целесообразно определять содержание в испытуемом образце дегидроаскорбата.

Известны различные способы определения аскорбиновой или дегидроаскорбиновой кислоты, например хроматографический способ [1].

Время, необходимое для определения по данному способу, очень велико (не менее 2 ч), причем при подготовке пробы к хроматографии теряется значительное количество аскорбата и поэтому количест-

25

венное определение с помощью указанного способа практически невозможно.

Известен также способ, основанный на окислении аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и осаждении последней в виде производного гидразина [2].

Данный способ трудоемок и мало специфичен, так как все соединения с кетонными функциональными группами дают такую же реакцию.

Наиболее близок к предлагаемому способ определения аскорбиновой или дегидроаскорбиновой кислоты путем обработки исследуемой пробы реагентом, содержащим четвертичную соль тетразола и щелочной буферный раствор, с последующим измерением интенсивности окраски образующегося окрашенного соединения [3].

Недостатком известного способа является то, что его проводят в щелочной среде и многочисленные вещества оказывают мешающее действие.

Кроме того, указанный способ длителен.

Цель изобретения - сокращение длительности определения и повышение специфичности.

Поставленная цель достигается тем, что берут две пробы, к первой пробе добавляют реагент, содержащий фосфатно-цитратный буфер, полиэтиленгликолевый эфир октилфенола, этилендиаминтетрауксусную кислоту, 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолбромид, феназинметосульфат и воду при следующем соотношении компонентов, вес. %:

Фосфатно-цитратный буфер	0,5-20
Полиэтиленгликолевый эфир октилфенола	0,1-1,5
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЕДТА)	0,0045-0,045
3-(4,5-Диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолбромид (МТТ)	0,0003-0,03
Феназинметосульфат	0,00025-0,0025
Вода	До 100

а к другой параллельной пробе добавляют указанный реагент, содержащий дополнительно аскорбатоксидазу в количестве 0,0001-0,005 вес. %, вычитают экстинкцию параллельной пробы из экстинкции первой пробы и рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты, причем в случае определения дегидроаскорбиновой кислоты первую исследуемую пробу предварительно

обрабатывают избытком гомоцистеина при pH 7-8 и содержание дегидроаскорбиновой кислоты определяют по разности между общим содержанием аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот и содержанием аскорбиновой кислоты.

Предлагаемый способ осуществляют в слабокислой среде. При таких значениях pH большинство мешающих веществ не вступает в реакцию или скорость ее настолько замедляется, что практически ею можно пренебречь. В такой кислой среде скорость взаимодействия реактива с аскорбиновой кислотой мала, поэтому определение аскорбиновой кислоты с ее помощью практически невозможно. Однако добавление феназинметосульфата в комбинации с детергентом ускоряет эту реакцию. Неожиданно то, что указанные добавки не ускоряют реакцию реактива с мешающими веществами.

Для установления pH, соответствующего слабокислой среде, предпочтительно в интервале между 4,0 и 6,0 (особенно между 4,8 и 5,3) могут использоваться различные буферные системы, в частности фосфатно-цитратный буфер, так как в этом случае при всех количествах аскорбата выполняется пропорциональность между экстинкцией образующегося окрашенного вещества и концентрацией аскорбата.

Предпочтительным детергентом, используемым в предлагаемом способе, является полиэтиленгликолевый эфир октилфенола (тритон x 100).

Скорость реакции увеличивает также феназинметосульфат (ФМС), обеспечивая количественное протекание реакции. При использовании других известных переносчиков электронов такого ускоряющего действия не наблюдается. Концентрация ФМС 0,01 - 1 ммоль/л (предпочтительнее 0,05-0,15 ммоль/л), так как в этом случае не происходит взаимодействия реактива с соединениями, содержащими SH-группы, такими как гомоцистеин. Такие соединения с SH-группами можно добавлять, когда имеющийся в пробе дегидроаскорбат необходимо одновременно восстанавливать до аскорбата.

Если в исследуемой пробе находятся ионы двухвалентных металлов, склонных к образованию хелатов, то могут образовываться хелаты в результате взаимодействия с получающимся окрашенным соединением формазина, что может влиять на результаты измерений. Хотя образование хелатов в значительной степени подавляется вследствие применения цитрат-

но-фосфатного буфера, однако целесообразно добавлять дополнительно к пробе небольшие количества комплексообразователей, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота с концентрацией 0,0045-0,045 вес.%. В особых случаях, в частности при анализе проб с очень высоким содержанием ионов двухвалентных металлов, целесообразны и добавки в больших количествах.

При осуществлении предлагаемого способа используют параллельную пробу, дополнительно содержащую аскорбатоксидазу, которая избирательно окисляет содержащийся в параллельной пробе аскорбат. По окончании реакции окисления параллельную пробу используют как холостую пробу для определения количества аскорбиновой кислоты, т.е. экстинкцию холостой пробы вычитают из экстинкции исследуемого раствора и разность используют для расчета количества аскорбиновой кислоты.

Данный вариант осуществления способа повышает его специфичность, в особенности в тех случаях, когда в исследуемом растворе присутствуют вещества, которые могут взаимодействовать с солью тетразола.

При определении дегидроаскорбиновой кислоты ее переводят в аскорбиновую кислоту и определяют описанным способом, восстанавливая при помощи органического сульфгидрильного соединения, предпочтительно гомоцистеина, который берется в избытке, в нейтральной или слабощелочной среде, при pH 7-8 (при использовании гомоцистеина - при pH 7,5. Если затем для определения образующейся аскорбиновой кислоты устанавливают значение pH, соответствующее слабокислой среде, то взаимодействие реактива с аскорбиновой кислотой протекает без всяких осложнений, т.е. избыток сульфгидрильного соединения не восстанавливает вновь образующуюся в ходе реакции дегидроаскорбиновую кислоту, и, таким образом, не происходит искажения результатов анализа.

Способ позволяет определять дегидроаскорбиновую кислоту в присутствии аскорбиновой кислоты. Для этого вначале определяют в пробе содержание аскорбиновой кислоты, а затем во второй пробе восстанавливают дегидроаскорбиновую кислоту и определяют ее. По разности полученных результатов можно определить количество в пробе дегидроаскорбиновой кислоты.

Реакция согласно предлагаемому способу протекает примерно 30 мин.

Измеряют интенсивность окраски образующегося окрашенного соединения, например, обычным фотоколориметром при подходящей длине волны, например при 578 нм. Однако для определения интенсивности окраски можно использовать и другие известные методы. Удовлетворительные результаты дает и оценка по сравнению полученной окраски с эталонной, в особенности, когда предлагаемый способ проводится с использованием индикаторных полос.

А. Определение аскорбиновой кислоты.

Готовят раствор следующего состава, г/л (%):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36 (3,6)
Лимонная кислота	20 (2)
Тритон X-11	15 (1,5)
EDTA	0,45(0,045)
МТТ	0,041(0,0041)

В две кюветы (одна из них содержит пробу, вторая - холостую пробу), заливают по 3,00 мл раствора и 0,1 мл исследуемой пробы. Пробу и холостую пробу нагревают до 37°С. К холостой пробе добавляют 0,00033% аскорбатоксидазы (0,01 мг/3мл) и инкубируют 2 мин. При этом аскорбиновая кислота разлагается. Затем к обеим пробам добавляют по 0,075 мг ФМС так, чтобы содержание раствора в них составляло 0,0025%. Снова инкубируют 5 мин. После этого определяют экстинкцию холостой пробы (E<sub>L</sub>) и пробы (E<sub>p</sub>). Рассчитывают ΔE по формуле

$$\Delta E = E_p - E_L$$

Содержание аскорбиновой кислоты в пробе рассчитывают исходя из общей расчетной формулы для определения концентраций

$$C = \frac{V \cdot MG}{\epsilon d v \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ (г/л)},$$

где V - испытуемый объем, мл;

v - объем пробы, мл;

MG - молекулярный вес определяемого вещества;

d - толщина слоя, см;

ε - коэффициент экстинкции МТТ-формазона (при 578 нм ε = 16,9), л · ммоль<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>.

Отсюда для L - аскорбиновой кислоты

$$C = \frac{2,70 \cdot 176,13}{16,9 \cdot 1 \cdot 0,10 \cdot 100} \cdot \Delta E$$

(г L - аскорбиновой кислоты на л раствора пробы).

Если предварительно пробу разбавляют, то результат умножают на фактор разбавления  $F$ .

Б. Определение дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА).

Восстанавливают ДГА до аскорбиновой кислоты в присутствии гомоцистеина (при pH 7,5). Определяют сумму аскорбиновой кислоты и ДГА и рассчитывают в виде общего содержания аскорбиновой кислоты. После вычета определенной в отдельном тесте аскорбиновой кислоты из разницы можно рассчитать количество ДГА.

Приготовление растворов:

а) буферный раствор (фосфатный буфер, 0,1 ммоль/л, pH 7,5) 163 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 2,00 г  $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  растворяют примерно в 70 мл воды и доливают до 100 мл;

б) раствор гомоцистеина. 60 мг гомоцистеина растворяют в буферном растворе (а) и доливают до 50 мл.

в) раствор пробы с аскорбиновой кислотой + ДГА (не больше 0,6 г/л).

Значение pH пробы доводят до 7,5 раствором едкого калия (2 моль/л) и разбавляют водой до пригодной концентрации.

В пробирку вносят пипеткой по 50 мл растворов (а), (б) и (в), смешивают их и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. 0,1 мл инкубированного раствора исследуют на содержание аскорбиновой кислоты согласно А.

Расчет.

1. Общее количество аскорбиновой кислоты (ДГА + аскорбиновая кислота)

$$C_{\text{пробы}} = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot MG \cdot F}{\epsilon \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot d \cdot 1000} \cdot \Delta E,$$

где  $F$  – фактор разбавления пробы;  
 $V_1$  – инкубационный объем, мл;  
 $V_2$  – испытуемый объем, мл;  
 $V_1$  – объем раствора пробы (в) при инкубировании, мл;  
 $V_2$  – объем инкубированного раствора в тесте, мл;  
 $MG$  – молекулярный вес аскорбиновой кислоты,  
 $d$  – толщина слоя, см,  
 $\epsilon$  – коэффициент экстинкции МТТ-формазона (при 578 нм = 16,9), л·ммоль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>,

т.е.

$$C = \frac{1,5 \cdot 2,7 \cdot 176,13}{16,9 \cdot 0,5 \cdot 0,1 \cdot 1 \cdot 1000} \cdot \Delta E = 0,8442 \cdot F \cdot \Delta E$$

2. Аскорбиновая кислота из расчета пробы (г/л пробы).

3. Дегидроаскорбиновая кислота.  
 $C_{\text{ДГА}} = (\text{результат из (1)} - \text{результат из (2)}) \cdot 0,9886$  (г ДГА/л пробы)

$$0,9886 = \frac{MG_{\text{ДГА}}}{-MG_{\text{аскорб}}} = \frac{174,13}{176,13}$$

Исследуют сок черной смородины на содержание в нем аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислоты.

0,1 мл сока исследуют согласно А на содержание аскорбиновой кислоты, при этом  $\Delta E$  равно 0,43, что соответствует содержанию 0,121 г/л или 0,0121%.

Для определения содержания в нем дегидроаскорбиновой кислоты 0,5 мл сока обрабатывают согласно Б гомоцистеином. 0,1 мл полученного при этом инкубированного раствора исследуют согласно А на сумму аскорбата и дегидроаскорбата.  $E$  при этом равно 0,38. Отсюда по указанной в Б формуле рассчитывают сумму аскорбата и дегидроаскорбата, равную 0,329 г/л или 0,0329%. Содержание дегидроаскорбата составляет  $0,329 - 0,121 = 0,208$  г/л или 0,0208%.

Проведена серия опытов определения аскорбиновой или дегидроаскорбиновой кислоты.

Пример 1. Фосфатно-цитратный буфер, поверхностно-активное вещество, комплексообразователь, соль тетразола, ФМС, а также воду и исследуемую пробу вводят в кювету обычного фотокалориметра. После осуществления реакции измеряют разность экстинкции по сравнению с воздухом или водой. В параллельную холостую пробу вводят, кроме того, аскорбатоксидазу (ААО). Такое же количество ААО вводят в исследуемую пробу после окончания реакции, чтобы скомпенсировать разницу в экстинкции, обусловленную самой ААО.

Подробности проведения способа, применяемые реактивы и их количества приведены в табл. 1.

Реактивом приведенного выше состава можно определять от 5 до 250 мг аскорбата в исследуемой жидкости. При более высоких концентрациях пробу необходимо соответствующим образом разбавить, при меньших концентрациях брать большее количество пробы. Количество воды при этом соответствующим образом должно быть уменьшено.

При проведении всех последующих определений используют составы реагентов аналогично примеру 1 (табл. 2).

**П р и м е р 2.** Определение аскорбата в апельсиновом соке.

0,1 мл апельсинового сока вводят в кювету в качестве пробы аналогично примеру 1. В результате обнаруживают концентрацию витамина С 305 мг/л, что соответствует декларации (300 мг/л). После анализа количество аскорбиновой кислоты, введенной в пробу, полностью определяется (100%). Окраска с течением времени не изменяется. Небольшое помутнение апельсинового сока не оказывает влияния на результаты анализа.

**П р и м е р 3.** 2,0 лимонного напитка растворяют в 20 мл воды и 0,1 мл полученного раствора вводят в кювету по примеру 1. Находят 96 мг витамина С на 100 г сухого вещества. Изменения окраски с течением времени не наблюдаются. Определяют 99,2% аскорбиновой кислоты, добавленной в пробу перед разбавлением. Небольшое помутнение раствора не оказывает влияния на результаты анализа.

**П р и м е р 4.** Определение аскорбата в плодах шиповника.

5 мл концентрата шиповника растворяют в 100 мл воды. 0,1 мл полученного раствора после центрифугирования вводят в кювету по примеру 1. Находят 1770 мг витамина С в расчете на 1 л концентрата. Небольшое изменение окраски во времени, наблюдавшееся в пробе и в холостой пробе, учитывают с помощью экстраполяции. Аскорбиновой кислоты, добавленной к пробе перед разбавлением, обнаруживают 100%. Легкое окрашивание разбавленного экстракта не оказывает влияния на результаты анализа.

**П р и м е р 5.** Определение аскорбата в соке черной смородины.

1 мл сока черной смородины разбавляют водой до 10 мл и 0,1 мл полученного раствора вводят в кювету по примеру 1. Находят 305 мг/л витамина С. Обнаруживают 100% аскорбиновой кислоты, добавленной перед разбавлением. Изменения окраски с течением времени не наблюдаются. Чтобы проверить, не оказывает ли мешающего влияния неразбавленный сильно окрашенный сок, для снижения в нем содержания аскорбата его выдерживают в открытой посуде в течение 4 недель в холодильнике. Затем 0,1 мл неразбавленного сока вводят в кювету. Находят еще 93 мг/л витамина С. Интенсив-

ная окраска исходной пробы не оказывает мешающего влияния. Изменения окраски с течением времени не наблюдаются.

Добавленная в пробу аскорбиновая кислота полностью определяется.

**П р и м е р 6.** Определение аскорбата в пиве.

Чтобы обеспечить прозрачность и возможность консервирования в пиво можно добавить аскорбиновую кислоту, хотя для баварского пивоварения эта операция не приемлема. Ни в светлом или темном бочковом пиве, ни в пиве в банках при проведении анализа по способу, описанному в примере 1, аскорбиновой кислоты нет. Мешающего влияния не обнаруживают. Добавленное в пробу количество аскорбиновой кислоты полностью обнаруживают.

**П р и м е р 7.** Определение аскорбата в шпинате.

Бланшированный свежемороженый шпинат после оттаивания тщательно перемешивают, 50 г его обрабатывают известным способом, но вместо НРО<sub>3</sub> используют метафосфорную кислоту. Вводят 0,2 мл экстракта, рН которого равен 5. При проведении способа аналогично примеру 1 находят 22 мг аскорбата в расчете на 100 г свежемороженого шпината при содержании в нем 8% сухой массы. Это соответствует 275 мг аскорбата в расчете на 100 г сухой массы. Из добавленного к шпинату перед экстрагированием количества аскорбиновой кислоты обнаруживают 99,8%. Изменения окраски с течением времени не наблюдают.

**П р и м е р 8.** Определение аскорбата в картофеле.

50 г картофеля моют, измельчают и обрабатывают таким же образом, как и шпинат в примере 7. рН экстракта устанавливают равным 5 и объем его доводят до 100 мл. После центрифугирования 500 мл вводят в кювету. Обнаруживают 18,9 мг аскорбата в расчете на 1 кг картофеля. Обычно эта величина составляет примерно 150 мг/кг. В данном случае используют старый картофель, сильно высушенный и частично проросший. В этих условиях содержание витамина С в нем сильно снижается или даже полностью исчезает. Для проверки к картофелю перед экстрагированием добавляют 75 мг аскорбиновой кислоты, после чего определяют ее в количестве 97%.

Изменения окраски с течением времени не наблюдают.

**П р и м е р 9.** Определение аскорбата в сыворотке.

Содержание аскорбиновой кислоты в сыворотке должно находиться в пределах между 2 и 15 мг/л на 1 мл сыворотки, из которой с помощью трихлоруксусной кислоты удаляют белок и используют в качестве пробы. В шести различных сыворотках обнаруживают от 1,5 до 2,64 мг/л аскорбата. Изменения окраски с течением времени не наблюдают. При добавке в пробу 17,2 мг аскорбата на 1 л сыворотки вновь обнаруживают практически 100%.

**Пример 10.** Определение аскорбата в моче.

Содержание аскорбата в моче может достигать значительных количеств. При нормальном питании в мочу попадает от 10 до 100 мг/л. При приеме доз, больше 100 мг 60–80% принятого количества обнаруживают в моче. Поэтому при потреблении аскорбиновой кислоты в количествах, во много раз превышающих нормальное, следует ожидать и большее, чем 100 мг/л, содержание ее в моче. В свежей моче при объеме пробы 0,1 мл обнаруживают 257 мг/л аскорбата. При этом вновь обнаруживают 98,3% добавленной перед анализом аскорбиновой кислоты. Изменения окраски с течением времени и других мешающих влияний не наблюдают.

**Пример 11.** Большие количества витамина С в моче, найденные в примере 10, могут частично или полностью подавлять образование окрашенных соединений на обычных индикаторных полосках на глюкозу, кровь или билирубин и т.д., основанное на окислении различных лейкоокрашенных соединений, и, таким образом, приводить к искажению результатов, что может быть установлено с помощью индикаторной бумаги. Круглый фильтр из испытуемой бумаги тщательно промывают раствором 0,2 моль  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / 0,1$  моль/л лимоннокислого буфера с pH 5, отсасывают на вакуумном фильтре и сушат в вакууме при комнатной температуре. Затем на фильтр, лежащий в чашке Петри, наливают смесь, соответствующую по составу холостой пробе примера 1, но не содержащую пробы и аскорбатоксидазы, после чего его снова сушат в вакууме при комнатной температуре в темноте. На подготовленный таким образом фильтр наносят по капле растворы, содержащие 2; 5; 10; 25 и 50 мг аскорбата/100 мл. В течение 1 мин на бумаге образуются сине-фиолетовые пятна, интенсивность окраски которых возрастает с увеличением концентрации аскорбата. При накапывании воды наблюдают только легкое желтое окрашивание.

**Пример 12.** Определение дегидроаскорбиновой кислоты.

Исследуемый материал экстрагируют и в случае необходимости разбавляют так, чтобы содержание дегидроаскорбата составляло 75–1500 мг/л (0,005–0,10%). Для раствора устанавливают показатель pH, равный 7,5. К двум частям этого раствора добавляют две части К-фосфатного буфера (pH 7,5, 0,1 ммоль/л, 1%, диапазон 0,1–2%). 0,1 мл приготовленного таким образом раствора исследуют через 15 мин аналогично примеру 1 на аскорбат и определяют сумму аскорбата и дегидроаскорбата. Принимая коэффициент разбавления F равным 2,5, можно определить после вычитания полученного ранее содержания аскорбата содержание в пробе дегидроаскорбата.

Спустя 2 ч после введения 0,5 г аскорбиновой кислоты у человека берут на анализ мочу, которую делят на 3 порции: первую (1) используют неизменной, вторую (2) дополняют 0,005% гомоцистеина и третью (3) — 0,01% дегидроаскорбиновой кислоты.

Исследуют их по описанному в А способу на содержание аскорбиновой кислоты (способ I). Для сравнения используют известные способы: окисление аскорбиновой кислоты и осаждение в виде производного гидразина (способ II) и восстановление дихлорфенолиндофенолом (реактив Тиллманна) в качестве титриметрического метода (способ III).

Результаты представлены в табл. 3.

В каждой порции должно быть одинаковое количество аскорбиновой кислоты, и только предлагаемый способ (способ I) дает одинаковые значения. Способ II частично выявляет добавленную дегидроаскорбиновую кислоту (отклонение в порциях 1 и 2 вызвано неточностью способа). Способ III зачастую дает сильное искажение вследствие введения гомоцистеина, который включается в качестве восстановителя. Однако дегидроаскорбиновая кислота также вызывает значительное увеличение значения.

Предлагаемый способ определения аскорбиновой кислоты (витамина С) и дегидроаскорбиновой кислоты прост и по сравнению с известными способами значительно более специфичен, более устойчив к мешающему влиянию других веществ и менее длителен.

Т а б л и ц а 1

Исходный раствор и ход опыта	Холостая проба, мл	Проба, мл	Концентрация при испытании
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,5	1,5	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 3,6% Лимонная кислота 2%
Лимонная кислота 4% рН 5			Тритон X 100 1,5%
Тритон X 100 + 3% ЕДТА 0,09%			ЕДТА 0,045%
Вода	1,0	1,0	
Проба	0,1	0,1	0,176-8,8 мг/л ас- корбата (0,0000176- -0,00088%)
ААО* 0,05%	0,02	-	Испытуемый раствор 0,000333%
МТТ 0,062%	0,2	0,2	0,00414%
ФМС** 0,0375%	0,2	0,2	0,025%
ААО 0,05%	-	0,02	0,000333%

\* После введения ААО инкубируют 2 мин.

\*\* После введения ФМС инкубируют до прекращения реакции (около 30 мин).

Т а б л и ц а 2

Компоненты	Состав, вес.%		
	1	2	3
Фосфатно-цитратный буфер	20	2,4	0,5
Тритон X 100	1,0	0,1	1,5
ЕДТА	0,01	0,0045	0,045
Аскорбатоксидаза	0,005	0,0001	0,002
МТТ	0,03	0,0003	0,009
ФМС	0,00025	0,0005	0,0025
Вода	до 100	до 100	до 100

Т а б л и ц а 3

Способ	Содержание аскорбиновой кислоты, г/л вес.% в порциях		
	1	2	3
I	0,133 (0,0133)	0,130 (0,0130)	0,134 (0,0134)
II	0,140 (0,0140)	0,155 (0,0155)	0,255 (0,0255)
III	0,144 (0,0144)	0,201 (0,0201)	0,162 (0,0162)

## Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения аскорбиновой или дегидроаскорбиновой кислоты с использо-  
ванием обработки исследуемой пробы реа-  
гентом, содержащим четвертичную соль  
тетразолия и буферный раствор, с после-  
дующим измерением интенсивности окрас-  
ки образующегося окрашенного соединения,  
отличающийся тем, что, с  
целью сокращения длительности определе-  
ния и повышения специфичности, берут  
две пробы, к первой пробе добавляют  
реагент, содержащий фосфатно-цитратный  
буфер, полиэтиленгликолевый эфир октил-  
фенола, этилендиаминтетрауксусную кисло-  
ту 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-ди-  
фенилтетразолбромид, феназинметосульфат  
и воду при следующем соотношении ком-  
понентов, вес.%,

Фосфатно-цитратный  
буфер 0,5-20  
Полиэтиленгликолевый  
эфир октилфенола 0,1-1,5  
Этилендиаминтетра-  
уксусная кислота 0,0045-0,045  
3-(4,5-диметил-  
тиазолил-2)-2,5-

-дифенилтетразол-  
бромид

0,0003-0,03

Феназинметосульфат

0,00025-0,0025

Вода

До 100

и к другой параллельной пробе добавляют  
указанный реагент, содержащий дополнитель-  
но аскорбатоксидазу в количестве 0,0001-  
0,005 вес.%, вычитают экстинкцию парал-  
лельной пробы из экстинкции первой  
пробы и рассчитывают содержание аскор-  
биновой кислоты, причем в случае опреде-  
ления дегидроаскорбиновой кислоты первую  
исследуемую пробу предварительно обраба-  
тывают избытком гомоцистеина при pH  
7-8 и содержание дегидроаскорбиновой  
кислоты определяют по разности между  
общим содержанием аскорбиновой и де-  
гидроаскорбиновой кислот и содержанием  
аскорбиновой кислоты.

## Источники информации,

принятые во внимание при экспертизе

1. Schormüller, Jerg. J. Hand-  
buch der Lebensmittelchemie. Bd,  
11,2 ... Springer-Verlag, Berlin-  
Heidelberg, 1967, S. 764-765.
2. Там же, с. 765-769.
3. Там же, с. 765-789 (прототип).

Составитель Л. Русанова

Редактор Л. Пчелинская Техред Е. Харитончик

Корректор С. Шекмар

Заказ 8459/81

Тираж 887

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4