

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXI, 6

SECTIO D

1976

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Wydział Farmaceutyczny
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik Zakładu: doc. dr hab. Stanisław Biliński
Lubelska Wytwórnia Surowic i Szczepionek
Dyr.: dr Marian Biernacki

Cezariusz CHOJNOWSKI, Jerzy ISKIERKO

**Badania metodyczne nad możliwością zastosowania chlorku żelazowego
do ilościowego oznaczania cytrynianów**

Методические исследования возможности применения хлористого железа для
количественного применения цитратов

Methodical Research on the Possibility of Applying Ferric Chloride for the Quanti-
tative Indication of Citrates

Podstawą większości obecnie stosowanych metod ilościowego oznaczania cytrynianów w materiale biologicznym jest reakcja utleniania i bromowania kwasu cytrynowego do pięciobromoacetonu opisana przez Cohoursa (1); Stahre (9) zastosował tę reakcję do wykrywania jakościowego, Kunz (4) przystosował ją do ilościowej analizy cytrynianów. Pucher i wsp. (8) pierwsi opisali mikrofotometryczną metodę ilościowego oznaczania cytrynianów. Istnieje szereg metod kolorymetrycznego oznaczania cytrynianów, które są w zasadzie różnymi modyfikacjami tej klasycznej metody. Johnson (3), Dickens (2), Taylor (10) i inni wywoływali barwną reakcję pięciobromoacetonu przy pomocy siarczku sodowego. Taussky i Shorr (11), posługiwali się do tego celu jodkiem sodowym, a Natelson i wsp., (7) tiomocznikiem. Natomiast Lindenhein i wsp. (6—5) wprowadzili wywoływanie barwnej reakcji pirydyną w środowisku alkalicznym.

W przedstawionej pracy podjęto metodyczne badania nad możliwościami zastosowania chlorku żelazowego do ilościowego oznaczania cytrynianów. Punktem wyjścia badań było spostrzeżenie, że cytryniany tworzą z chlorkiem żelazowym w obecności kwasu solnego barwny cytrynowopomarańczowy związek. Przeprowadzono badania optymalnych warunków reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym, jak np. wpływu kwasu solnego, stężenia chlorku żelazowego, promieni świetlnych na intensywność zabarwienia tworzącego się połączenia. Określono również wpływ długości fali świetlnej na wartość absorpcji barwnego produktu reakcji jonów cytrynianowych z chlorkiem żelazowym.

MATERIAŁY I METODYKA

W pracy stosowano: 5% roztwór FeCl_3 i rozcieńczony HCl (0,1n) oraz wzorcowe roztwory cytrynianu sodowego o stężeniach 0,5%—2%. Wszystkie stosowane roztwory przygotowywano z odczynników cz. d. a. Absorbencję barwnych produktów reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym mierzono spektrofotometrycznie stosując Spektromom „201” typ F 31 MOM Budapest w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 1 cm przy różnych długościach fali świetlnej 380—460 nanometrów.

1. Wpływ kwasu solnego na intensywność zabarwienia produktu reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym.

Do 8 próbek zawierających po 1 ml 0,5% wzorcowego roztworu cytrynianu sodowego i 1 ml chlorku żelazowego dodawano wzrastające ilości rozcieńczonego kwasu solnego 0, 1, 2, 3,4, 5, 6, i 9 ml, a następnie uzupełniano wodą redestylowaną do łącznej objętości 10 ml. Równolegle przygotowywano dla każdej próbki odpowiedni odnośnik bez cytrynianu sodowego. Ekstynkcję badanych próbek wobec odnośników oznaczano spektrofotometrycznie przy różnych zakresach długości fali od 380 do 460 nanometrów. Wyniki doświadczeń przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Wpływ stężenia kwasu solnego na intensywność zabarwienia (na ekstynkcje E) badanych próbek

The effect of hydrochloric acid concentration upon the colour intensity (upon extinctions E) examined material

na nanomole	Ilość ml rozcieńczonego kwasu solnego							
	0	1	2	3	4	5	6	9
380	0,065	0,135	0,135	0,140	0,110	0,095	0,065	0,085
390	0,080	0,185	0,160	0,165	0,125	0,110	0,080	0,095
400	0,227	0,465	0,460	0,455	0,380	0,335	0,265	0,195
405	—	0,530	0,600	0,620	0,560	0,490	0,415	0,260
410	0,255	0,525	0,640	0,685	0,630	0,550	0,470	0,285
415	0,200	0,435	0,610	0,660	0,615	0,530	0,460	0,275
420	0,230	0,490	0,550	0,600	0,560	0,490	0,420	0,255
430	0,150	0,335	0,420	0,460	0,430	0,375	0,330	0,200
440	0,105	0,255	0,315	0,340	0,310	0,270	0,225	0,155
450	0,065	0,185	0,220	0,240	0,215	0,190	0,160	0,120
460	0,030	0,130	0,145	0,160	0,125	0,125	0,100	0,090

Badana próbka: 1 ml 0,5% cytrynianu + 1 ml FeCl_3 + x ml HCl + x ml H_2O dopełniono do objętości 10 ml. Odnośnik: 1 ml FeCl_3 + x ml HCl + x ml H_2O dopełniono do objętości 10 ml.

Examined material: 1 ml 0.5% citrate + 1 ml FeCl_3 + x ml HCl + x ml H_2O ad 10 ml. Footnote: 1 ml FeCl_3 + x ml HCl + x ml H_2O ad 10 ml.

2. Wpływ stężenia chlorku żelazowego na intensywność zabarwienia

Do 6 próbek zawierających po 1,0 ml 0,5% wzorcowego roztworu cytrynianu sodowego i 3,0 ml rozcieńczonego kwasu solnego dodano wzrastające ilości chlorku żelazowego (0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 ml) i uzupełniono wodą do objętości 10,0 ml. Jednocześnie przygotowano dla każdej próbki odpowiedni odnośnik o analogicznym składzie bez cytrynianu sodowego.

Następnie przy pomocy spektrofotometru oznaczono ekstynkcję badanych próbek wobec odnośników przy różnych długościach fali świetlnej w zakresie 360—450 nm i wykreślono krzywe absorpcyjne. Wyniki doświadczeń przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Wpływ stężenia chlorku żelazowego na intensywność zabarwienia (absorpcję)
The effect of ferric chloride concentration upon colour intensity (absorption)

mn	Ilość ml roztworu chlorku żelazowego					
	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
360	0,690	0,240	0,150	0,120	0,100	0,065
370	0,845	0,465	0,160	0,125	0,100	0,065
380	0,930	0,820	0,250	0,130	0,105	0,065
385	0,940	0,940	0,415	0,140	—	—
390	0,900	0,980	0,620	0,170	0,120	0,070
395	—	0,960	0,790	0,290	—	—
400	0,800	0,920	0,860	0,500	0,195	0,075
405	—	0,860	0,820	0,660	0,360	0,115
410	0,660	0,770	0,775	0,710	0,550	0,235
415	—	0,700	—	0,680	0,640	0,410
420	0,510	0,610	0,620	0,620	0,620	0,475
430	0,380	0,470	0,470	0,470	0,475	0,450
440	0,280	0,340	0,345	0,345	0,350	0,330
450	0,180	0,230	0,235	0,245	0,250	0,225

Badana próbka: 1 ml 0,5% cytrynianu + x ml FeCl_3 + 3 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ dopełniano do objętości 10 ml. Odnośnik: x ml FeCl_3 + 3 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ dopełniano do objętości 10 ml.

Examined sample: 1 ml 0.5% citrate + x ml FeCl_3 + 3 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ ad 10 ml. Footnote: x ml FeCl_3 + 3 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ ad 10 ml.

Tab. 3. Wpływ promieni świetlnych na trwałość odczynu barwnego (absorpcję)
The effect of light rays upon the durability of colour reaction

na	Światło sztuczne lub dzienne rozproszone			Promienie słoneczne	
	0 min.	30 min.	60 min.	5 min.	60 min.
360	—	—	—	—	0,135
370	—	—	—	—	0,135
380	—	—	—	—	0,135
390	0,135	0,140	0,145	2,270	0,110
400	0,410	0,400	0,410	0,390	0,080
405	0,580	0,570	0,580	0,500	0,000
410	0,650	0,640	0,650	0,550	—
415	0,630	0,630	0,630	0,540	0,050
420	0,580	0,575	0,580	0,510	—
430	0,445	0,440	0,440	0,430	0,100
440	0,325	0,325	0,325	0,365	0,125
460	—	—	—	—	—

Badana próbka: 1 ml 0,5% cytrynianu + 1 ml FeCl_3 + 4 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ dopełniano do objętości 10 ml. Odnośnik: 1 ml FeCl_3 + 4 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ dopełniano do objętości 10 ml.

Examined sample: 1 ml 0.5% citrate + 1 ml FeCl_3 + 4 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ ad 10 ml. Footnote: 1 ml 0.5% citrate + 1 ml FeCl_3 + 4 ml $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ ad 10 ml.

3. Wpływ promieni świetlnych na trwałość barwy barwnego produktu reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym

Celem sprawdzenia trwałości barwnego produktu reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym w środowisku kwaśnym i jego wrażliwości na światło wykonano następujące doświadczenie. Do 3 próbek zawierających po 1,0 ml 0,5% wzorcowego roztworu cytrynianu sodowego dodano po 1,0 ml roztworu FeCl_3 oraz 4,0 ml rozcieńczonego HCl i uzupełniono wodą do objętości 10,0 ml. Jednocześnie przygotowano odpowiednie odnośniki o analogicznym składzie bez cytrynianu sodowego. Pierwszą próbkę poddano działaniu promieni słonecznych, próbkę drugą — działaniu światła dziennego rozproszonego, próbkę trzecią — działaniu światła sztucznego rozproszonego. W określonych odstępach czasu (0—60 min.) oznaczano ekstynkcję badanych próbek przy różnych długościach fali świetlnej w zakresie 360—450 nm. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tab. 3.

OMÓWIENIE WYNIKÓW — DYSKUSJA I WNIOSKI

Z przedstawionej tab. 1 wynika, że intensywność barwy produktu reakcji jonów cytrynianowych z chlorkiem żelazowym zależy od stężenia kwasu solnego. Istnieje pewne optimum stężenia kwasu, przy którym tworzący się związek wykazuje najwyższą ekstynkcję. Zarówno niższe, jak i wyższe od optymalnego stężenie kwasu solnego obniża wielkość ekstynkcji barwnego produktu reakcji.

Tab. 2 świadczy o zależności intensywności zabarwienia badanej próbki od stężenia dodanego do analizy chlorku żelazowego. Wartość ekstynkcji badanych prób była z reguły tym wyższa, im niższe było stężenie dodanego do analizy chlorku żelazowego. Spostrzeżenie to jest istotne dla doboru optymalnego a zarazem wystarczającego stężenia chlorku żelazowego dla prawidłowego przebiegu reakcji z jonami cytrynianowymi i uzyskania maksymalnego natężenia barwy powstającego związku. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń ustalono, że ekstynkcję produktu reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym najkorzystniej jest określać przy długości fali świetlnej w zakresie 410—420 nanometrów.

Tab. 3 wskazuje na wyraźny wpływ światła na barwny produkt reakcji cytrynianów z chlorkiem żelazowym. Pod wpływem promieni słonecznych zachodzi wizualna zmiana zabarwienia badanych próbek z koloru żółtopomarańczowego na brunatny. Jednocześnie zmienia się wartość ekstynkcji, która przy 400 nm spada prawie do zera. Przeprowadzając reakcje cytrynianów z chlorkiem żelazowym oraz pomiary ekstynkcji przy świetle sztucznym lub dziennym rozproszonym zabarwienie jest stabilne co najmniej przez okres 1 godziny. Przeprowadzone badania świadczą o możli-

wości zastosowania chlorku żelazowego jako reagenta do ilościowej analizy cytrynianów.

PIŚMIENICTWO

1. Cahours A.: Ann. Chim. 19, 484, 1847.
 2. Dickens F.: J. Biochem. 35, 1011, 1941.
 3. Johnson W. A.: Biochem. J. 33, 1046, 1939.
 4. Kunz R.: Arch. Chem. Mikr. 7, 285, 1914.
 5. Lindenhayn K. D., Hirthe De Neve W.: Z. med. Labortech. 11, 6, 318, 1970.
 6. Lindenhayn K. D., Hirthe: Clin. Chim. Acta 17, 149, 1967.
 7. Natelson S., J. B. Pincus, J. K. Lugovoy: J. Biol. Chem. 175, 745, 1948.
 8. Pucher C. W., C. C. Sherman, H. B. Vickery: J. Biol. Chem. 113, 235, 1936.
 9. Stahre L. Z.: Anal. Chem. 36, 195, 1897.
 10. Taylor T. G.: Biochem. J. 54, 48, 1953.
 11. Tausky H. H., E. Shorr: J. Biol. Chem. 169, 103, 1947.
- Otrzymano 4 X 1974.

РЕЗЮМЕ

Проводились методические исследования над возможностью применения хлористого железа для количественного определения цитратов. Хлористое железо образует с ионами цитратов соединение желто-оранжевого цвета и эта реакция использовалась для количественного определения цитратов.

Изучалось также влияние концентрации соляной кислоты, хлористого железа на интенсивность окраски продукта реакции цитратов с хлористым железом. Кроме того, исследовалось влияние световых лучей на прочность цвета образующегося соединения. Проведенные исследования доказывают возможность применения хлористого железа в качестве реagenta для количественного определения цитратов.

SUMMARY

Methodical research on the possibility of applying ferric chloride for the quantitative indication of citrates has been carried out. Ferric chloride with citrate ions constitutes a yellowish orange compound and this reaction has proved useful in the quantitative indication of citrates.

Another investigation has been carried out to test the influence of hydrochloric acid ferric chloride concentration on the intensity of tinting in the reaction product of citrates with ferric chloride. Besides; the influence of light rays on the colour durability which forms the combination was also investigated.

The carried out research proves the possibility of applying ferric chloride, as a (reagent) for the quantitative indication of citrates.

