

VPLYV POVRCHOVE AKTÍVNYCH LÁTOK A POUŽITIE L-CYSTEÍNU AKO ŠTANDARDU PRI POLAROGRAFICKOM STANOVENÍ SH-LÁTOK V RASTLINNOM MATERIÁLI*

JOZEF SEDLÁK

Endokrinologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Kvantitatívnemu stanoveniu SH-látok v biologickom materiáli sa v poslednom čase venuje veľká pozornosť. Pod SH-látkami rozumieme zlúčeniny s voľncu tiolovou skupinou. V rastlinnom materiáli sa spomedzi SH-látok najčastejšie vyskytuje SH-glutatión (GSH), L-cysteín, kyselina tioglykolová, prípadne jej estery. Podľa Zumana [1] SH-látky dávajú anodickú vlnu pri potenciáli o 300 mV negatívnejšom, ako je vlna kyseliny L-askorbovej. Úhrnné množstvo SH-látok pri polarografickom stanovení, ale aj pri stanoveniach titračných, kolorimetrických a potenciometrických sa najčastejšie vyjadruje v mg % SH-glutatiónu, pretože podľa údajov z literatúry GSH takmer vždy tvorí hlavný podiel SH-látok v biologickom materiáli.

Úlohou tejto práce je zistiť, do akej miery je správne pomocou kalibračnej krivky GSH v základnom elektrolyte hodnotiť polarografické vlny SH-látok v rastlinnej šťave, kde sú povrchove aktívne látky prítomné v značnom množstve. Keďže sa spozorovalo, že aj L-cysteín dáva jednu anodickú vlnu za prítomnosti rastlinnej šťavy, vyskúšal sa ako štandard pre SH-látky namiesto SH-glutatiónu, ktorý je látkou ťažšie dostupnou.

Experimentálna časť

Zariadenie

Pracovalo sa na Heyrovského polarografe, typ V 301 v obvyklom polarografickom zapojení, s Kalouskovou nádobkou a referentnou merkurosulfátovou elektródou. Výška rezervoára $h = 72$ cm, doba kvapky meraná pri potenciáli -700 mV v základnom elektrolyte $t = 1,6$ sek., prietoková rýchlosť ortuti $5,75 \cdot 10^{-3}$ g sek. $^{-1}$, akum. 4 V.

Reagencie

Ako štandardné látky sa používali L-cysteínhydrochlorid BLB Paríž a SH-glutatión Light Colbrook. Obidve sa prechovávali nad P_2O_5 a analyzovali sa jodometrickou titráciou podľa Kuhna [2] v prostredí 80—90 % kyseliny octovej. Výsledok jodometrickej ana-

* Prednesené na sjazde chemikov v Banskej Štiavnici v júli 1954.

lýzy pri L-cysteínhydrochloride bol 98,9 %, pri SH-glutatióne 98,2 %. Roztoky štandardných látok sa pripravovali vždy čerstvé rozpustením návažku v acetátovom tlmivom roztoku o pH 4,7, zbavenom kyslíka. Na polarometrické titrácie sa používal 10^{-3} M roztok *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného v Britton—Robinsonovom tlmivom roztoku o pH 9,8. Koncentrácia tohto roztoku sa stanovila polarometrickou titráciou $4 \cdot 10^{-4}$ M roztokmi L-cysteínhydrochloridu a SH-glutatiónu v acetátovom tlmivom roztoku. Oboma titráciami sa dostali rovnaké výsledky. Jeden ml 10^{-3} M roztoku *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného odpovedá 26,3 μ g SH alebo 0,246 mg GSH. Na prípravu vzoriek pre polarografické stanovenie i ako základný elektrolyt sa používal acetátový tlmivý roztok o pH 4,7. Vzdušný kyslík z roztokov a štiav sa odstraňoval vybublávaním s medicínovým dusíkom.

Metóda

Všetky polarografické analýzy sa robili Zumanovou polarografickou metódou stanovenia SH-látok v rastlinnom materiáli [1] so zmenami vyplývajúcimi použitím tejto metódy na nové druhy rastlinného materiálu.

Vzorkovanie rastlinného materiálu

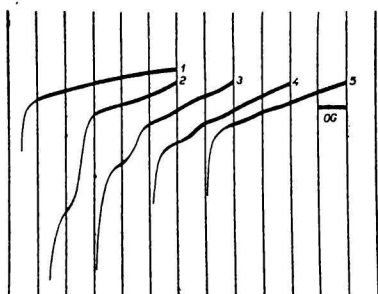
Pre polarografické stanovenie SH-látok v zelenine a ovocí s veľkým obsahom šťavy (napr. v moruši, malinách, ríbezliach, egreši, uhorke, rajčine, vo vnútri melóna a pod.) možno rastlinnú šťavu pripraviť jednoduchým vytlačeníím z 10 alebo 20 g vzorky cez gázu, ako navrhol Zuman [1]. Získaná šťava sa potom polarografuje alebo priamo, alebo až po zriedení acetátovým tlmivým roztokom. V prípade vyššieho obsahu SH-látok, ktorý v samom druhu zeleniny a ovocia veľmi kolíše podľa jednotlivých vzoriek (tab. 1), urobí sa pri niektorých druhoch takýmto spôsobom prípravy vzorky chyba v polarografickom stanovení. Preto aj pri týchto šťavnatých druhoch sa v prípade vyššieho obsahu SH-látok pripravila vzorka rozotieraním návažku s pieskom a s acetátovým tlmivým roztokom.

Tab. 1. Kolísanie obsahu SH-látok v jednom druhu zeleniny alebo ovocia

druh	mg SH-látok v 100 g návažku								priemer
špenát	9,1	158,4	32,2	30,4	95,9	13,2	18,9	33,6	38,2
jarný	26,4	16,5	6,0	79,2	11,0	12,7	12,5	15,9	
melón	1,5	3,3	27,9	2,5	1,1	0,7	13,2	1,3	6,2
žltý	2,7	25,6	2,9	4,0	2,5	6,9	—	2,5	
rajčiny	5,9	5,8	7,2	6,9	5,2	18,8	5,9	8,8	7,7
	6,7	7,8	6,6	8,4	4,4	5,5	4,9	6,8	
egreš	1,3	9,5	3,6	14,1	2,4	1,5	2,0	1,6	4,3
	8,7	2,3	1,9	1,5	3,7	7,4	5,4	1,5	

Z rastlinného materiálu, ako je špenát, kapusta, šťavel, petržlen, mrkva, kel, redkova a pod., šťava sa ťažko vytláča. Vzorky na polarografické stanovenie SH-látok v týchto druhoch sa pripravovali takto: Najprv sa 20 g vzorky rozotrela v porcelánovej trecej miske s čistým kremenným pieskom „na sucho“ a potom sa vzorka opäť rozotierala po pridaní 10 ml acetátového tlmivého roztoku. Šťava sa získala vytlačeníím cez gázu. Zvyšok po vytlačení sa znova rozotieral v trecej miske s 10 ml acetátového tlmivého roz-

toku a šťava sa opäť vytlačila cez tú istú gázu ako po prvýkrát a pripojila sa k prvému podielu. Význam tohto extraktívneho spôsobu prípravy vzorky na polarografické stanovenie SH-látok vidieť na polarograme 1, kde sú zaznamenané vlny SH-látok v každom jednotlivom extrakte z vňati petržlenu s 10 ml acetátového tlmivého roztoku.



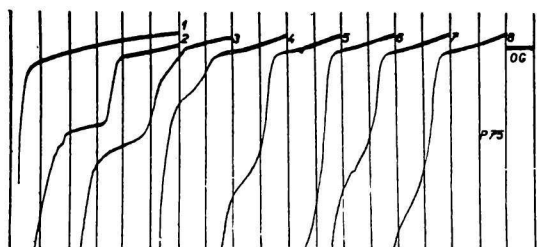
Polarogram 1. Anodické vlny SH-látok v šťave vňate petržlenu. *Krivky:* 1. acetátový tlmivý roztok o pH 4,7; 2. prvá extrakcia 10 g vňate s 10 ml tlmivého roztoku; 3—5. ďalšie extrakcie zvyšku vždy s 10 ml acetátového tlmivého roztoku. Krivky od 10. drôtu späť; merkurosulfátová elektróda; citl. 1 : 20; 200 mV abs.

Z polarogramu 1 vidieť, že až vo štvrtom extrakte je obsah SH-látok bezvýznamný. Podobný polarogram sa získal pri redkovke, kapuste, kalerábe a podobných druhoch. Štandardný postup prípravy vzorky pre záznam vln SH-látok ťažko predpísať pre všetky druhy zeleniny a ovocia. Kým niektoré druhy (napr. špenát, petržlen) pri návažku 20 g treba trikrát extrahovať s 10 ml acetátového tlmivého roztoku, iné druhy (napr. kapustu, kaleráb a pod.) stačí dvakrát extrahovať s 10 ml acetátového tlmivého roztoku. Všetky operácie pri príprave vzoriek na polarografické stanovenie SH-látok v rastlinnom materiáli vzhľadom na ich citlivosť voči vzdušnému kyslíku sa musia robiť v atmosfére CO_2 a polarografický záznam vln SH-látok treba vždy urobiť ihneď po získaní šťavy. Otvoreným problémom ostáva vplyv státia zeleniny a ovocia na obsah SH-látok po zbere, ktorý ťažko sledovať pre veľké kolísanie SH-látok v tom istom druhu rastlinného materiálu podľa vzoriek, ako aj v tom istom plode podľa anatomických častí, ako to pozoroval Zuman [1] v rajčine, Röhlting, Jirousek a Petráčková [3] v křmnej repe a kapuste.

Vyhodnotenie polarografických vln SH-látok

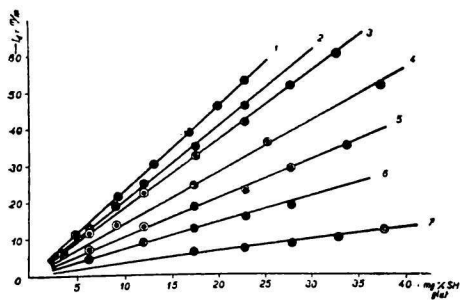
Metóda štandardného pridania je jedným z najpresnejších spôsobov vyhodnotenia vln pri polarografických analýzach. Jej nevýhodou pri väčšom počte stanovení je častá príprava štandardného roztoku a strata času dvojnásobným záznamom kriviek na polarograme a pri výpočtoch. Preto častejšie sa používa spôsob vyhodnotenia polarografických vln pomocou kalibračnej krivky. Aby sa zistila prípadná chyba pri vyhodnotení polarografických vln SH-látok v rastlinnom materiáli pomocou kalibračnej krivky GSH v acetátovom tlmivom roztoku, SH-látky sa v desiatich druhoch zeleniny a ovocia stanovovali oboma metódami a výsledky sa porovnali s polarometrickou titráciou roztokom *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného. Súčasne sa pri stanovení SH-látok me-

tódou štandardného pridania použil ako štandardná látka L-cysteínhydrochlorid, pričom získané hodnoty sa prepočítali na mg % GSH (tab. 2). Z každého druhu zeleniny a ovocia sa pripravilo najmenej 40 ml šťavy na polarografický záznam vln SH-látok v poradí podľa polarogramu 2.

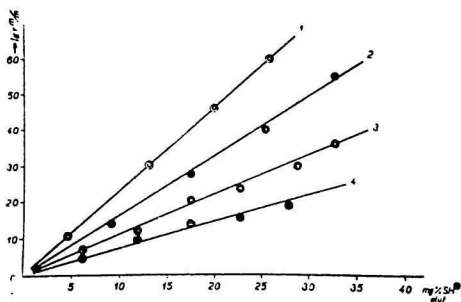


Polarogram 2. Anodické vlny SH-látok v šťave redkovky po pridaní L-cysteínu a SH-glutatiónu. *Krivky:* 1. 10 ml acetátového tlmivého roztoku; 2. 10 ml acetátového tlmivého roztoku + 0,5 ml 10^{-2} M L-cysteínhydrochloridu; 3. 10 ml acetátového tlmivého roztoku + 0,5 ml 10^{-2} M SH-glutatiónu; 4. 10 ml šťavy redkovky; 5. ako pri 4 + 0,5 ml 10^{-2} M L-cysteínhydrochloridu; 6. ako pri 5 + 0,5 ml 10^{-2} M L-cysteínhydrochloridu; 7. 10 ml šťavy redkovky + 0,5 ml 10^{-2} M GSH; 8. ako pri 7 + 0,5 ml 10^{-2} M GSH. Krivky od 10. drôtu späť; merkurosulfátová elektróda; citl. 1 : 20; 200 mV abs.

Nakoniec sa vykonala polarometrická titrácia SH-látok pomocou 10^{-3} M roztoku *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného postupom podľa Matouška [4]. Do 6 alebo 10 ml šťavy sa pridával 0,5—1 ml 10^{-3} M roztok *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného a sledovala sa závislosť výšky prvej vlny *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného od pridaných ml činidla. Z výsledkov jednotlivých analýz sa zostavila tab. 2.



Graf 1. *Priamka 1.* Kalibračná krivka GSH v acetátovom tlmivom roztoku; ďalšie priamky pre šťavu: 2. rajčiny; 3. egreša; 4. uhorky; 5. malín (vzorka 10 g + 5 ml acetátového tlmivého roztoku); 6. špenátu (vzorka 10 g + 5 ml acetátového tlmivého roztoku); 7. zeleného hrášku (vzorka 10 g + 10 ml acetátového tlmivého roztoku).



Graf 2. *Priamka 1.* Kalibračná krivka GSH v acetátovom tlmivom roztoku; ďalšie priamky pre šťavu špenátu: 2. vzorka 10 g špenátu + 40 ml acetátového tlmivého roztoku; 3. vzorka 10 g špenátu + 20 ml acetátového tlmivého roztoku; 4. vzorka 10 g špenátu + 5 ml acetátového tlmivého roztoku.

Aby sa zistil vplyv povrchove aktívnych látok prítomných v rastlinnej šťave na veľkosť difúzneho prúdu GSH, zostrojila sa kalibračná krivka GSH pre šťavu z každého skúmaného druhu zeleniny a ovocia (graf 1).

Tab. 2. Porovnanie obsahu SH-látok, stanoveného tromi metódami hodnotenia polarografických analýz, s hodnotami získanými polarometrickou titráciou

mg SH-látok vyjadrené ako SH-glutatión v 100 g návažku, určené metódou								
č. vz.	druh zeleniny a ovocia	polaromet. titr. roztokom p-chlórmertkuribenzoan.	štandard. pridaním GSH	rozdiel v %	odčítaním z kalibr. krivky GSH v acet. tlmivom roztoku	rozdiel v % voči polaromet. titrácii	štandard. pridaním L-cysteínhydrochloridu	rozdiel v % voči polaromet. titrácii
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	špenát jarný	47,9	50,4	+5,2	29,6	-37,0	12,3	-74,0
2	špenát jarný	32,0	31,8	-0,6	17,9	-44,0	22,8	-29,0
3	redkovka červená jesenná	8,2	8,4	+2,4	4,0	-51,0	4,6	-44,0
4	redkovka červená jesenná	5,2	5,2	—	3,4	-35,0	4,0	-23,0
5	šťaveľ jarný	13,0	14,3	+10,0	6,2	-52,0	8,3	-36,0
6	šťaveľ jarný	17,4	18,6	+6,7	10,1	-42,0	11,2	-35,0
7	ríbezle biele	2,6	2,8	+7,7	1,6	-38,0	0,7	-73,0
8	petržlen vňat	25,8	24,7	-4,2	13,5	-48,0	20,0	-22,0
9	petržlen koreň	14,2	14,3	+0,7	9,1	-35,0	11,2	-21,0
10	melón žltý	1,5	1,4	-6,5	0,5	-67,0	0,5	-67,0
11	maliny	20,6	20,0	-2,9	13,8	-32,0	15,6	-24,0
12	maliny	8,2	8,0	-2,4	5,6	-32,5	6,2	-24,2
13	jahody záhradné	4,4	4,5	+2,2	3,4	-22,0	4,9	+11,0
14	rajčiny	8,5	8,9	+4,7	7,0	-18,0	3,5	-59,0
15	rajčiny	5,8	5,6	-3,4	4,7	-19,0	5,4	-6,9
priemerný rozdiel				±3,9	—	-38,1	—	-36,6

V snahe zistiť, či výšku vlny GSH, pridaného do rastlinnej šťavy, okrem povrchove aktívnych látok neovplyvňuje i enzymatický oxidačný dej alebo chemické viazanie GSH tiolovými jedmi, stanovovala sa koncentračná závislosť GSH v troch vzorkách špenátu, pripravených za použitia 5, 20 a 40 ml acetátového tlmivého roztoku na rozotieranie pri 10 g návažku (graf 2).

Nanášané hodnoty I_d v mm pri zostrojení grafu 1 a 2 sa vypočítali tak, že sa od celkovej výšky vlny SH-látok, poskytovanej pridaným štandardným 10^{-2} M roztokom GSH, odčítala výška vlny SH-látok v čistej šťave po príslušných korekciách na objem. V tab. 3 sa hodnoty SH-látok, vypočítané pomocou kalibračnej krivky GSH v šťave jednej vzorky špenátu alebo redkovky, porovnali s hodnotami, získanými metódou štandardného pridaní GSH pri spomínaných druhoch, aby sa potvrdila správnosť hodnotenia polarografických vln SH-látok v rastlinnom materiáli pomocou kalibračných kriviek GSH, získaných priamo s rastlinnými šťavami.

Tab. 3. Porovnanie obsahu SH-látok, stanoveného odčítaním z kalibračnej krivky GSH v šťave, s hodnotami získanými metódou štandardného pridania

mg SH-látok vyjadrené ako SH-glutatión v 100 g návažku určené							
v špenáte metódou				v redkovke metódou			
č. vz.	odčítaním z kalibr. krivky GSH v šťave	štandard. pridaním GSH do šťavy	rozdiel v %	č. vz.	odčítaním z kalibr. krivky GSH v šťave	štandard. pridaním GSH do šťavy	rozdiel v %
1	2	3	4	5	6	7	8
1	12,6	10,9	+15,0	1	5,8	5,5	+5,4
2	17,4	17,7	-1,7	2	8,9	9,4	-5,5
3	29,4	29,5	-0,3	3	6,3	5,9	+6,8
4	10,0	10,4	-8,2	4	12,6	14,3	-11,5
5	16,5	16,3	+1,2	5	5,2	5,4	-3,7
6	12,1	13,3	-9,0	6	11,2	10,1	+10,8
7	12,4	11,4	+8,7	7	5,2	5,2	—
8	14,8	16,3	-9,2	8	7,7	9,0	-14,4
9	13,4	14,5	-7,6	9	12,3	12,7	-3,1
10	20,4	19,6	+4,1	10	27,5	29,7	-7,7
priemerný rozdiel			±6,5	priemerný rozdiel			±6,9

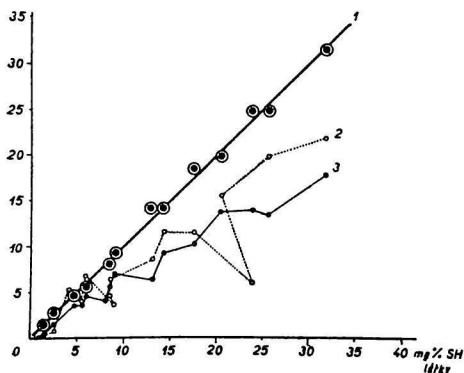
Diskusia

Zhodu alebo nezhodu jednotlivých metód hodnotenia polarografických vln SH-látok s polarometrickou titráciou roztokom *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného dobre vidieť na grafe, kde sa porovnávajú výsledky jednotlivých metód (tab. 1, graf 3). Pri biologickom materiáli sa metóda štandardného pridania GSH veľmi dobre zhoduje s polarometrickou titráciou za použitia roztoku *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného, ktorý viacerí autori, napr. Hata [5], Donnell [6], Matoušek [4], Pihár [7], označili ako veľmi selektívne činidlo pre SH-látky.

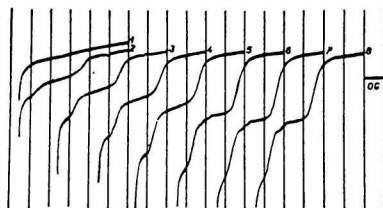
Nemožno však hovoriť o zhode výsledkov metódy štandardného pridania L-cysteínu s polarometrickou titráciou roztokom *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného. L-cysteín sa nemôže použiť ako štandardná látka pre SH-látky v čistom acetátovom tlmivom roztoku, pretože podľa Grubnera [8] už približne pri koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M zreteľne poskytuje dve anodické vlny v rozsahu pH 1—8,5, z ktorých negatívnejšia veľmi zavčasu, už pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ M dosahuje limitnú hodnotu difúzneho prúdu. Koncentrácia L-cysteínu, pri ktorej nastáva rozdelenie jeho anodickej vlny na dve vlny a dosahuje sa limitná hodnota difúzneho prúdu negatívnejšej vlny, závisí podľa Grubnera [8] od pH základného elektrolytu, ďalej od konštant kvapkovej elektródy, napr. od povrchu kvapky, prietokovej rýchlosti ortuti atď. Preto koncentračná

závislosť L-cysteínu sa stanovila v základnom elektrolyte, pri konštantách kapiláry uvedených v práci.

Anodická vlna L-cysteínu v acetátovom tlmivom roztoku o pH 4,7 pri konštantách kapiláry udaných na začiatku práce podľa polarogramu 3 rozdelila sa pri koncentrácii $0,63 \cdot 10^{-4}$ M L-cysteínu; limitná hodnota difúzneho prúdu negatívnejšej vlny sa dosiahla pri koncentrácii $3,59 \cdot 10^{-4}$ M L-cysteínu.



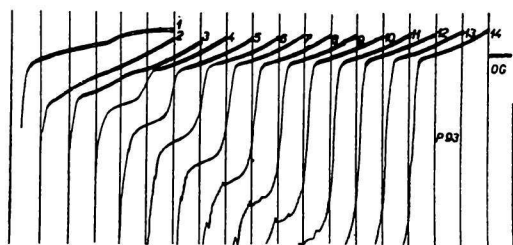
Graf 3. Grafické porovnanie metód z tab. 1. Priamka 1. Štandardné pridanie GSH; krivka 2. štandardné pridanie L-cysteinhydrochloridu; krivka 3. odčítanie z kalibračnej krivky GSH v acetátovom tlmivom roztoku; 1—3. porovnanie voči polarometrickej titrácii s roztokom *p*-chlórmerkuriibenzoanu sodného.



Polarogram 3. Anodické vlny L-cysteínu v acetátovom tlmivom roztoku o pH 4,7 — koncentračná závislosť. Krivky: 1. acetátový tlmivý roztok; 2—8. 10 ml acetátového tlmivého roztoku za pridania po 0,1 ml 100 mg % roztoku L-cysteinhydrochloridu. Krivky od 10. drôtu späť; merkurosulfátová elektróda; citl. 1 : 20; 200 mV abs.

L-cysteinhydrochlorid, ktorý sa vyskúšal ako štandardná látka pre SH-látky v 10 druhoch zeleniny a ovocia metódou štandardného pridania, poskytoval vždy jednu pekne prekreslenú anodickú vlnu pri polarografických záznamoch v rozsahu koncentrácie $0,5\text{--}1,4 \cdot 10^{-3}$ M L-cysteínu. Rozdelenie anodickej vlny, limitná hodnota difúzneho prúdu negatívnejšej vlny L-cysteínu sa pri citlivosti 1 : 20 prakticky nepozorovala ani v jednom druhu rastlinnej šťavy (polarogram 2 a 4). Pri citlivosti 1 : 70 rozdelenie anodickej vlny nastalo pri koncentrácii $1,5 \cdot 10^{-3}$ M L-cysteínu. Rovnako sa dosiahla limitná hodnota difúzneho prúdu negatívnejšej vlny pri koncentrácii $2,5 \cdot 10^{-3}$ M L-cysteínu aj za prítomnosti rastlinných štiav. Tento zaujímavý zjáv spôsobuje obsadenie rozhrania fáz na povrchu kvapkovej elektródy povrchove aktívnymi látkami prítomnými v značnom množstve v každom druhu rastlinnej šťavy. Povrchove aktívne látky podľa údajov z literatúry [9] spomaľujú vlastný elektródový dej a majú značný vplyv aj na veľkosť a priebeh difúzneho prúdu (znižujú ho). V rastlinnej šťave pravdepodobne viacej vplývajú na difúzny prúd tým, že sťažujú vlastnú difúziu SH-látok k povrchu kvapky. Poskytovanie jednej

anodickej vlny L-cysteínu v rastlinnej šťave je spôsobené tým, že pri rovnakej koncentrácii L-cysteínu v rastlinnej šťave a v acetátovom tlmivom roztoku sa elektródového deja v rastlinnej šťave zúčastní menej častíc L-cysteínu než v acetátovom tlmivom roztoku. Aby nastalo rozdelenie anodickej vlny a dosiahla sa limitná hodnota difúzneho prúdu negatívnejšej vlny L-cysteínu, jeho koncentrácia v rastlinnej šťave musí byť väčšia než v acetátovom tlmivom roztoku za inak rovnakých podmienok. Tento zjav nemožno analyticky využiť, lebo koncentračná závislosť L-cysteínu napr. v šťave hlávkového šalátu (polarogram 4) nie je lineárna. Pri grafickom znázornení dáva krivku tvaru adsorpčnej izotermy.



Polarogram 4. Anodické vlny L-cysteínu v šťave šalátu — koncentračná závislosť. *Krivky:* 1. acetátový tlmivý roztok o pH 4,7; 2. 10 ml šťavy šalátu; 3—14. 10 ml šťavy šalátu za pridania po 0,2 ml 10^{-2} M roztoku L-cysteínhydrochloridu. Krivky od 10. drôtu späť; merkurosulfátová elektróda, citl. 1 : 20; 200 mV abs.

Polarografické vlny L-cysteínu teda ani za prítomnosti rastlinných štiav v rozsahu pH 3,5—6,8 nemajú rýdzo difúzny charakter. Preto hodnoty v tab. 2 a na grafe 3, ktoré sa získali štandardným pridaním L-cysteínu, sú oveľa nižšie v porovnaní s hodnotami získanými polarometrickou titráciou za použitia *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného.

Obsah SH-látok, zistený odčítaním z kalibračnej krivky GSH v acetátovom tlmivom roztoku, v porovnaní s hodnotami nájdenými metódou štandardného pridania GSH a polarometrickou titráciou roztokom *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného je značne nižší. Chyba stanovenia pri niektorých druhoch je väčšia než 60 %. Takúto veľkú chybu možno jednoducho vysvetliť podstatne iným prostredím pre záznam vln GSH v rastlinných šťavách v porovnaní s čistým základným elektrolytom. Rozhranie fáz na povrchu ortuťovej kvapky, podobne ako sme uviedli pri L-cysteíne, je obsadené povrchove aktívnymi látkami prítomnými v rastlinnej šťave, ako sú látky pektínové, dusíkaté látky nebielkovinovej povahy, rastlinné bielkoviny a farbivá. Všetky tieto povrchove aktívne látky, ktorých obsah, zloženie a povrchová aktivita v rastlinnej šťave sa menia podľa druhu zeleniny a ovocia, vytvárajú súvislú vrstvu na povrchu ortuťovej kvapky. Táto vrstva alebo adsorbovaný film je podľa druhu rastlinnej šťavy menej alebo viacej priepustný pre difúziu SH-glutatiónu

k povrchu kvapkovej elektródy. Avšak na rozdiel od L-cysteínu všetky grafické znázornenia koncentračných závislostí GSH v rastlinných šťavách sú lineárne (graf 1 a 2). Tým je splnená najzákladnejšia podmienka ich využitia pre analytické účely.

Závislosť difúzných prúdov SH-glutatiónu od jednotlivých druhov zeleniny a ovocia vidieť na grafe 1. V šťavnatých druhoch, ako v rajčínach, egreši, smernice priamok 2 a 3 na grafe 1 sa veľmi nelíšia od smernice priamky 1 v čistom acetátovom tlmivom roztoku. V tejto oblasti sa nachádzajú i priamky pre žltý a červený melón, pre ríbezle a hrozno. Chyba polarografického stanovenia SH-látok v šťavách týchto druhov nie je veľká, aj keby sa hodnotili vlny SH-látok odčítaním z kalibračnej krivky v acetátovom tlmivom roztoku. Priamky 4, 5 a 6 strednej časti grafu 1 predstavujú oblasť menej šťavnatých druhov, ako je špenát, petržlen, mrkva, kaleráb, redkovka, šťavel a pod. Šťavy týchto druhov, aj keď sa pripravujú na polarografické stanovenie rozotieraním s acetátovým tlmivým roztokom, dávajú kalibračné krivky, ktorých smernice (napr. priamky 5 a 6 na grafe 1) sú značne menšie v porovnaní s čistým systémom. Preto pri týchto druhoch nemožno vlny SH-látok hodnotiť pomocou kalibračnej krivky v čistom acetátovom tlmivom roztoku bez značnej chyby v stanovení. Ďalšiu oblasť tvoria druhy podobné zelenej fazuli (priamka 7 na grafe 1). Sem patria zelený hrášok a zelený bôb. Smernice kalibračných kriviek týchto druhov sú niekoľkokrát menšie v porovnaní so smernicou kalibračnej krivky GSH v acetátovom tlmivom roztoku (priamka 1 na grafe 1). Zrejmy je tu vplyv rastlinných bielkovín, ktoré tieto druhy spomedzi rastlinného materiálu obsahujú v najväčšom množstve (až 11 %). Chyba polarografického stanovenia SH-látok vyhodnotením vln SH-látok pri uvedených druhoch pomocou kalibračnej krivky GSH v čistom acetátovom tlmivom roztoku dosahuje až 80 %. Výsledkami v tab. 3 sa dokázala vhodnosť použitia kalibračných kriviek GSH, zostrojených priamo v rastlinných šťavách. Smernica kalibračnej krivky GSH v rastlinnej šťave závisí pri každom druhu aj od množstva acetátového tlmivého roztoku použitého na prípravu vzorky pre polarografické stanovenie. Čím viac acetátového tlmivého roztoku sa použije na prípravu vzorky, tým viac sa smernica kalibračnej krivky GSH v rastlinnej šťave blíži k pomerom v čistom systéme (graf 2). Avšak riedením rastlinnej šťavy acetátovým tlmivým roztokom sa súčasne znižuje aj vlastná vlna SH-látok. Najdôležitejšou úlohou je nájsť najlepší spôsob prípravy vzorky pre polarografické stanovenie a použiť najvhodnejší pomer acetátového tlmivého roztoku pre návažok vzorky, čo sa musí osobitne vyskúšať pre každý druh zeleniny a ovocia. Týmto štandardným spôsobom vyskúšaným pre jeden druh sa potom vykoná celá séria polarografických analýz.

Autor ďakuje RNDr. Zumanovi za poskytnutie SH-glutatiónu, prof. RNDr. Krasnecovi a RNDr. Jirouskovi za kyselinu p-chlórmerkuričbenzoovú.

Súhrn

Z menej šťavnatých druhov zeleniny a ovocia, ako špenátu, redkovky, petržlenu a pod., treba šťavu na polarografické stanovenie získať rozotieraním 20 g návažku s pieskom 2 až 3-krát vždy za súčasnej extrakcie SH-látok s 10 ml acetátového tlmivého roztoku.

Celkový difúzny prúd SH-látok v rastlinných šťavách je výhodné vyhodnotiť pomocou osobitne zhotovenej kalibračnej krivky SH-glutatiónu (GSH) pre každý druh zeleniny a ovocia priamo v šťave. Smernica takejto kalibračnej krivky sa mení podľa druhu rastlinného materiálu vplyvom povrchove aktívnych látok na celkový difúzny prúd GSH; pri tom istom druhu sa mení podľa zriadenia rastlinnej šťavy acetátovým tlmivým roztokom o pH 4,7. Naproti tomu vyhodnotenie celkového difúzneho prúdu SH-látok v rastlinnej šťave pomocou kalibračnej krivky GSH v acetátovom tlmivom roztoku nie je správne. Týmto spôsobom získané obsahy SH-látok v skúmaných 10 druhoch zeleniny a ovocia v porovnaní s výsledkami získanými metódou štandardného pridania GSH a polarometrickou titráciou SH-látok roztokom *p*-chlórmerkuribenzoanu sodného mali chybu v stanovení podľa druhu zeleniny a ovocia 18—67 %.

L-cysteínhydrochlorid pridaný do rastlinných štiav sa na rozdiel od acetátového tlmivého roztoku vplyvom povrchove aktívnych látok prejavil jednou anodickou vlnou v rozsahu koncentrácií $0,5\text{--}1,4 \cdot 10^{-3}$ M L-cysteínu a pri pH 3,3—6,8. Analytické využitie L-cysteínu ako štandardu pre polarografické stanovenie SH-látok v rastlinnom materiáli však nevedlo k úspechu, pretože vlny L-cysteínu aj za prítomnosti rastlinných štiav v rozsahu pH 3,3—6,8 nemajú rýdzo difúzny charakter.

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И УПОТРЕБЛЕНИЕ L-ЦИСТЕИНА КАК СТАНДАРТА ПРИ ПОЛЯРОГРА- ФИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ SH-ВЕЩЕСТВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

ИОСИФ СЕДЛАК

Эндокринологический институт Словацкой Академии Наук в Братиславе

Выводы

Получение сока и количественную экстракцию SH-веществ из различных менее сочных овощей и фруктов как шпинат, морковь, редиска, петрушка и т. п. при полярографическом определении, необходимо проводить растиранием 20 гр. навески с песком 2—3 раза всегда с одновременной экстракцией SH-веществ с 10 мл. ацетатового раствора-регулятора.

Общий диффузионный ток SH-веществ в растительных соках выгодно оценивать при помощи особо построенной калибрационной кривой SH-глутатиона (G-H) для каждого сорта овощей и фруктов прямо в соке. Направление такой калибрационной кривой под влиянием поверхностно-активных веществ, присутствующих в каждом растительном соке

на общий ток GSH меняется в зависимости от сорта растительного материала и в том же самом сорте в зависимости от разжижения сока ацет. раствором-регулятором с pH 4,7. Наоборот оценка общего диффузионного тока SH-веществ в растительном соке при помощи калибрационной кривой GSH и ацет. раствора-регулятора не является правильной. Таким образом полученное содержание SH-веществ в пробирках 10 сортов овощей и фруктов при сравнении с результатами, полученными методом стандартной добавки GSH и полярометрической титрацией SH-веществ раствором п-хлормеркурибензоата натрия давали ошибки при определении в зависимости от сорта овощей и фруктов 18—67 %.

Приданный L-цистеин гидрохлорид к растительным сокам под влиянием поверхностно-активных веществ проявляется в отличии от ацет. раствора-регулятора анодическую волною в границах концентрации $0,5—1,4 \cdot 10^{-3}$ м L-цистеина с pH 3,3—6,8. Аналитическое использование L-цистеина как стандарта для полярографического определения SH-веществ в растительном материале не вело к успеху потому что волны L-цистеина и в присутствии растительных соков в пределах pH 3,3—6,8 не имеют чисто диффузионный характер.

EINFLUSS OBERFLÄCHENAKTIVER STOFFE UND VERWENDUNG VON L-CYSTEIN ALS STANDARDS BEI DER POLAROGRAPHISCHEN BESTIMMUNG VON SH-STOFFEN IM PFLANZENMATERIALE

JOZEF SEDLÁK

Endokrinologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Zusammenfassung

Die Saftgewinnung und die quantitative Extraktion der SH-Stoffe aus weniger saftreichen Gemüse- und Obstarten, wie Spinat, Radieschen, Petersilie u. ähnl. zum Zwecke der polarographischen Bestimmung wird notwendigerweise so durchgeführt, dass eine Einwaage von 20,-g zwei- bis dreimal mit Sand zerrieben wird, und zwar immer unter gleichzeitiger Extraktion der SH-Stoffe mit 10 ml Azetatpuffer.

Der Gesamtdiffusionsstrom der SH-Stoffe in Pflanzensäften wird vorteilhaft mit Hilfe einer besonders hergestellten Kalibrationskurve des SH des Glutathions (GSH) für jede Gemüse- und Obstart direkt im Saft ausgewertet. Die Richtung einer solchen Kalibrationskurve durch den Einfluss der in jedem Pflanzensaft anwesenden oberflächenaktiver Stoffe auf den Gesamtdiffusionsstrom des GSH ändert sich nach Massgabe des jeweiligen Pflanzenmaterials und bei derselben Art nach der Verdünnung des Pflanzensaftes durch den Azetatpuffer pH 4,7. Demgegenüber ist die Auswertung des Gesamtdiffusionsstromes der SH-Stoffe im Pflanzensaft mit Hilfe einer Kalibrationskurve des GSH und des Azetatpuffers nicht richtig. Die auf diese Weise gewonnenen Gehalte an SH-Stoffen in 10 untersuchten Gemüse- und Obstarten enthielten, im Vergleich mit den Ergebnissen, die durch die Methode des standardisierten Zufügens von GSH und durch polarimetrische Titration der SH-Stoffe mit einer Lösung von Natrium-p-chlormercuribenzoat gewonnen wurden, einen Fehler bei der Bestimmung je nach der Gemüse- und Obstart von 18—67 %.

Das den Pflanzensäften beigefügte L-Cysteinhydrochlorid drückt sich durch den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe zum Unterschied vom Azetatpuffer durch eine anodische Stufe im Gebiete der Konzentration $0,5—1,4 \cdot 10^{-3}$ м des L-Cysteins pH 3,3—6,8 aus. Die analytische Benützung des L-Cysteins als Standards für die polarographische Bestimmung von SH-Stoffen im Pflanzenmaterial führte jedoch nicht zum Erfolg, weil die Stufen des L-Cysteins auch in Gegenwart von Pflanzensäften im pH-Bereiche 3,3—6,8 keinen rein diffusen Charakter aufweisen.

LITERATÚRA

1. Zuman P., Chem. Listy 46, 73 (1952). 2. Kuhn R., Birkhofer L., Quackenbusch F. W., Ber. 72, 407 (1939). 3. Röhling S., Petráčková M., Jirousek L., Chem. Listy 47, 1458 (1953). 4. Matoušek L., Laučíková O., Chem. Listy 47, 1062 (1953). 5. Hata T., Res. Food Sci. 2, 13 (1949). Cit. z knihy Březina M., Zuman P., *Polarografie v lékařství, biochemii a farmácii*, Praha 1952, 265. 6. McDonnell L. R., Silva R. B., Feeney R. R., Arch. Biochem. Biophys. 32, 288 (1951). 7. Pihár O., Chem. Listy 47, 1401 (1953). 8. Grubner O., Chem. Listy, 47, 1133 (1953). 9. Vlček A. A., Chem. Listy 47, 1428 (1953).

STANOVENIE METYLOLOVÝCH SKUPÍN VO FENOLFORMALDEHYDOVÝCH REZOLOCH*

VLADIMÍR VOROBYOV

Výskumný ústav káblov a izolantov v Bratislave

Hoci sú fenolformaldehydové rezoly jedny z najstarších syntetických živíc, dosiaľ sa hodnotia buď konvenčnými, alebo nedokonalými chemicko-analytickými metódami. Chýba predovšetkým chemicko-analytická metóda na hodnotenie jednej z najdôležitejších vlastností rezolov — tvrditeľnosti teplom a kyselinami. Tvrditeľnosť rezolov spôsobujú metylolové skupiny, prípadne dimetyléterické mostíky; dosiaľ v literatúre uvádzané metódy na ich zisťovanie sú však obvykle nešpecifické, veľmi zdĺhavé a nepresné.

Sprung [1] sa pokúšal nájsť metódu na stanovenie metylolových skupín sledovaním bromácie čistých fenolalkoholov. Avšak Rudermaň [2] podrobnejším výskumom zistil, že sa rôzne fenolalkoholy rôzne chovajú pri bromácii, a preto nemožno vypracovať jednotný predpis na bromáciu živíc, ktoré sú ich zmesami.

Lilley a Osmond [3] zistili, že špecifickou reakciou pre metylolové skupiny je oxydácia jódom v alkalickom prostredí. Zistili však, že pri oxydácii prebieha aj vedľajšia reakcia — substitúcia jódu do jadra. Súčasným stanovením kyseliny jodovodíkovej a zložitým výpočtom eliminujú vedľajšiu reakciu, pričom dostávajú výsledky s chybou 0,5—3 %, počítané na čisté fenolalkoholy. Pri živiciach, ktoré majú nižší obsah metylolových skupín, je táto chyba značne väčšia. Pre amoniakové rezoly dala metóda autorom príliš nízke výsledky. Metóda okrem toho má rad ďalších nedostatkov. Problematický je už vlastný vzorec pre výpočet obsahu metylolových skupín. Metóda dáva vysoký obsah metylolových skupín v novolakoch, takže bola všeobecne kritizovaná aj v lite-

* Prednesené na sjazde chemikov v Banskej Štiavnici v júli 1954.