報 文

着色・懸濁試料中の L-アスコルビン酸の高感度 フローインジェクション分析

三浦 恭之^{®1}, 赤木麻衣子¹

L-アスコルビン酸 (L-H₂A) の吸光光度検出フローインジェクション分析 (FIA) 法は試料溶液が有色物質や不溶性物質を含んでいる場合にしばしば困難である。本研究では、着色や懸濁の試料溶液中の 10⁻⁶ M レベルの L-H₂A を高感度に定量する FIA 法を確立した。本法は 2 つの操作から成り立っている。操作 I では、L-H₂A をヨウ素と反応させた後に残りのヨウ素を三ヨウ化物イオンとして波長 350 nm で吸光度測定し、L-H₂A によるヨウ素の消費による吸光度減少とマトリックスによる吸光度増加の合計が検出器応答として得られた。操作 II ではヨウ素を用いないで試料マトリックスに対する検出器応答だけを測定した。操作 I の検出器応答を操作 II の検出器応答で補正することにより、有色・懸濁の試料溶液中の 2.7 × 10⁻⁸ ~ 4.5 × 10⁻⁶ M (4.8 ~ 790 ppb) の L-H₂A を定量することができた。本法は従来の吸光光度法に比べて感度の高い分析法である。本法を有色や懸濁の清涼飲料水中の L-H₂A の定量に応用したところ、満足な結果が得られた。

1 緒 言

L-アスコルビン酸 (L-H₂A) は人が 1 日に約 70 mg 摂取することが推奨される特別なビタミンで、適切な摂取によって食物の栄養価を高くする働きを示し、不足すると鉄分の吸収を悪化して壊血病を引き起こす。L-H₂A は一般には新鮮な果物や野菜、フルーツジュース、清涼飲料水に含まれているが、容易に空気酸化されてデヒドロアスコルビン酸に変わる。L-H₂A の定量法には、吸光光度法^{1)~13)}、化学発光分析法¹⁴⁾や電気化学検出分析法^{15)~17)}などが多く報告¹⁸⁾されているが、多くは 10⁻⁴ M あるいは 10⁻⁵ M レベルの L-H₂A の定量法であり、定量感度があまり高くない。例えば、吸光光度法での L-H₂A について、Fung らは 1 ~ 10 µg/g³⁾、Lau らは 5 ~ 13 µg/g⁴⁾、Al-Tamrah は 7 µg/mL 以下⁶⁾、米村らは 2.5 × 10⁻⁶ ~ 1.2 × 10⁻⁴ M⁷⁾、Backheer らは 5 ~ 25 ppm⁸⁾、Qureshi らは 0.02 ~ 0.36 mg/mL⁹⁾、Safavi は 1 ~ 35 µg/mL¹⁰⁾、Abdelmageed らは 5 ~ 207 µg/mL¹¹⁾及び Srividya らは 40 µg/mL 以下¹²⁾と報告している。最近、Y. Fujita らは¹³⁾ L-H₂A を鉄(III) と反応させて生成する鉄(II) を、陽イオン界面活性剤の存在下で *p*-carboxyphenylfluorone との錯イオンとして吸光光度測定することによる 10⁻⁷ M レベルの L-H₂A を定量し、医薬品中の L-H₂A の分析に応用した。また、L-H₂A を共存する成分から分離して分析する高速液体クロマトグラフィー (HPLC)¹⁹⁾²⁰⁾も報告されているが、高価な分離カラムを必要とし、また、移動相

が分離カラムと平衡状態に達成するまでに長時間を要するという欠点がある。これに対し、FIA 法は一般的に安価な装置で目的成分を迅速に分析でき、安定性の低い成分の定量に有用である。種々の検出法 (吸光光度法^{21)~31)}、化学発光測定法^{32)~34)}、電気化学検出法³⁵⁾³⁶⁾など) を利用する L-H₂A の FIA 法が報告されており、吸光光度検出法が広く使用されている。Hernandez-Mendez らは²³⁾紫外部での光吸収物質の妨害を避けるため、ヨウ素-でんぶ錯体の吸光度 (580 nm) を測定する L-H₂A の間接吸光光度検出・FIA 法を報告した。この方法は定量感度が低いうえに検量線も曲がるため、分析する L-H₂A の濃度に合ったヨウ素酸塩の量を適切に選択して分析しなければならないという問題がある。

本研究では、有色や懸濁の試料溶液中のマトリックスに対する検出器応答を補正する 10⁻⁶ M レベル L-H₂A の高感度 FIA 法を確立した。まず、L-H₂A をヨウ素と反応させ [式 (1)]、残っているヨウ素を三ヨウ化物イオンとして波長 350 nm で測定した。

ここでの検出器応答は、L-H₂A のヨウ素の消費に基づく吸光度の減少と試料溶液のマトリックスによる吸光度の増加の合計として得られ、マトリックスによる吸光度増加だけ吸光度の減少が小さくなった。そこで、反応溶液の代わりにヨウ素を含まない溶液を用いて試料マトリックスに対する吸光度増加を測定して検出器応答を補正することによ

¹ 東海大学理学部化学教室: 259-1292 神奈川県平塚市北金目 1117

Fig. 1 Schematic diagram of FIA system

(1) Carrier: 0.1 M CH_3COOH ; (2) Reaction solution: 10×10^{-6} M I_2 -0.1 M I^- -0.1 M CH_3COOH ; (3) Pump: 0.8 mL min^{-1} ; (4) Sample injection valve: 200 μL , (5) Mixing T; (6) Reaction tubing: 0.5 mm i.d. $\times$ 140 cm; (7) UV/Vis detector: 350 nm; (8) Recorder

り, $\text{L-H}_2\text{A}$ を定量した. 本法によって有色・懸濁の試料溶液中の $2.7 \times 10^{-8} \sim 4.5 \times 10^{-6}$ M (4.8 ~ 790 ppb) $\text{L-H}_2\text{A}$ を定量することができた. 本法の $\text{L-H}_2\text{A}$ の定量感度はJainらの方法²⁷⁾に比べて約 30 倍, Hernandez-Mendez らの方法²³⁾に比べて約 50 倍高いこと, またバッチ法の吸光光度分析に比べても高感度であることが分かった.

2 実 験

2.1 装 置

本実験で使用した装置は, NSK 製の 2 つのピストンを備えた DMX-2000 型ポンプ, 200 μL サンプルループ付き Rheodyne 製の 7125 型試料注入バルブ (Berkley, CA, USA), 相馬光学製の S-3702 型吸光検出器から構成した. 記録計として島津製の U-135 型レコーダーと CR6A 型データ処理機を使用した. 接続チューブは内径が 0.5 mm のポリテトラフルオロエチレン製のものを使用した. 本装置の略図を Fig. 1 に示す.

2.2 試 薬

試薬はすべて市販の試薬特級品を用い, 精製することなく使用した. 水は 2 回蒸留し, 日本ミリポア製の Milli-Q Labo 純水製造装置で脱イオンして使用した.

$\text{L-H}_2\text{A}$ 標準溶液: L-アスコルビン酸 (和光純薬製, 純度 99.0%, $\text{MW} = 176.13$) 0.89 g を脱酸素水 (約 30 分間沸騰させて溶存酸素を除去した水) に溶解し, 100 mL まで希釈することによって約 0.05 M 溶液を調製した. この溶液はヨウ素滴定法によって標定し⁷⁾, 脱酸素水で適宜希釈して使用した. 1×10^{-3} M より低い濃度の溶液では, $\text{L-H}_2\text{A}$ の空気酸化が促進されて濃度が容易に変わるため, 媒質に 0.1 M 酢酸を用いて $\text{L-H}_2\text{A}$ を安定化させた. 2.5×10^{-4} M $\text{L-H}_2\text{A}$ の 0.1 M 酢酸溶液は室温で放置したとき, 少なくとも 5 時間は使用することができた⁷⁾.

ヨウ素-ヨウ化物溶液: ヨウ素 (和光純薬製, 純度 99.8%, $\text{MW} = 126.9$) 0.64 g をメタノール (和光純薬製, 純度 99.8%) に溶かし, 250 mL に希釈することによって 0.025 M ヨウ素のメタノール溶液を調製した. $\text{L-H}_2\text{A}$ の反応溶液に使用する 10×10^{-6} M ヨウ素, 0.1 M ヨウ化物, 0.1 M 酢酸の混合溶液は, 1×10^{-3} M ヨウ素メタノール溶液 2.5 mL をヨウ化カリウム (和光純薬製, 純度 99.5%, $\text{MW} = 166.0$) 4.2 g と 10 M 酢酸 2.5 mL を含む 200 mL の水溶液に加え, 水で 250 mL に希釈して調製した.

2.3 定量操作

2.3.1 操作 I (無色透明試料溶液中の $\text{L-H}_2\text{A}$ の定量)

キャリアー溶液として 0.1 M 酢酸を使用し, これを毎分 0.8 mL の流量で試料注入バルブ (200 μL のサンプルループ付き) を経由してミキシング T に流した. ここには他方から $\text{L-H}_2\text{A}$ の反応溶液を毎分 0.8 mL の流量で流してキャリアー溶液と混合させ, 反応チューブ (内径 0.5 mm, 長さ 140 cm のポリテトラフルオロエチレン製チューブ) を通して検出器に流した. このとき $\text{L-H}_2\text{A}$ は反応式 (1) に従ってヨウ素を消費した. 吸光度検出器では残っているヨウ素 (三ヨウ化物イオンとして) の吸光度を波長 350 nm でモニターし, レコーダーに記録した.

2.3.2 操作 II (有色や懸濁試料溶液のマトリックス吸光度測定) 反応溶液の代わりに 0.1 M 酢酸を使用し, 後は操作 I と同様に行ってマトリックスの吸光度を測定した.

3 結果と考察

3.1 吸収曲線

2.3 の定量操作での吸光度測定波長を決めるため, ヨウ素 (三ヨウ化物イオン) の吸収曲線を測定した. 10×10^{-6} M I_2 , 0.1 M KI 及び 0.1 M 酢酸の混合溶液は波長 350 nm で吸

Fig. 2 Typical detector response of various amounts of L-ascorbic acid

Concentrations of L-ascorbic acid: (a) 0, (b) 1.0×10^{-6} M, (c) 2.0×10^{-6} M, (d) 3.0×10^{-6} M, (e) 4.0×10^{-6} M, (f) 4.5×10^{-6} M

収極大を示した。また、 1×10^{-4} M L-H₂A 試料溶液は 300 nm より短い波長領域では強い光吸収を示したが、300 nm より長波長の領域では光吸収を示さなかった。そこで定量操作では検出器の波長を 350 nm に設定した。

3.2 検量線

L-H₂A の標準溶液を用い、2・3・1 の操作 I に従って得られた検出器応答ピークを Fig. 2 に示す。ここでのベースラインは反応溶液中のヨウ素（三ヨウ化物イオン）とキャリアとの混合溶液の吸光度に相当するために高い値を示した。これに対して L-H₂A の検出器応答は、ヨウ素が L-H₂A によって還元されて残ったヨウ素を測定するため、ベースラインからの吸光度の減少として負のピークを示した。各ピークは試料溶液注入後 30 秒以内に現れ、L-H₂A の濃度を変化させて繰り返し注入してもシャープで再現性の良いシグナルが得られた。濃度に対するピーク高さ（ベースラインからの吸光度の減少）をプロットした L-H₂A の検量線は、良好な直線を示し [Fig. 3 の (1)]、相関係数が 0.999 以上であった。 3.00×10^{-6} M L-H₂A 溶液 (522 ppm) を用いて 11 回繰り返し実験を行ったところ、定量値の平均は 3.01×10^{-6} M (524 ppm) で相対標準偏差が 0.3% であっ

Fig. 3 Standard addition method for L-ascorbic acid in various colored and turbid soft drink samples

(1) Standard solution of L-ascorbic acid; (2) Sample A in Table 3 (colored and turbid) diluted 1000-fold; (3) Sample B (colored) diluted 250-fold; (4) Sample C (colored) diluted 300-fold; (5) Sample C (colored) diluted 2000-fold

た。S/N = 3 としたときの検出限界は 2.7×10^{-8} M (4.8 ppb) であった。本法は Hernandez-Mendez らの方法²³⁾に比べて約 50 倍も高感度な L-H₂A の FIA 法である。また、本法はバッチ法の吸光光度分析に比べても感度の高い L-H₂A の定量法である。

3.3 キャリヤー溶液

L-H₂A は水溶液中では徐々に空気酸化されるが、0.1 M 酢酸媒質中では 2.5×10^{-5} M という低濃度でも少なくとも 5 時間まで安定化できることを既報で報告した⁷⁾。このことから 2・3 の操作ではキャリヤー溶液に 0.1 M 酢酸を使用することにした。

3.4 反応溶液の最適化

L-H₂A の高感度測定を目的とし、その検出器応答に対する反応溶液中のヨウ素、ヨウ化物及び酢酸の濃度の効果を 2・3・1 の操作 I に従って検討した。

まずは、ヨウ素の濃度の効果を調べた結果を Fig. 4 に示す。種々の濃度のヨウ素を含む 0.1 M ヨウ化物と 0.1 M 酢酸の混合溶液を使用した。 3×10^{-6} M より低い濃度のヨウ素では、その量が十分でないために L-H₂A は低い応答ピーク高さを示した。しかし、 5×10^{-6} ~ 15×10^{-6} M ではいずれも高い応答ピークを示した。ヨウ素の濃度を 15×10^{-6} M と高くすると、ベースラインのノイズがわずかに大きくなる傾向を示した。そこで 2・3 の操作ではヨウ素の濃度を 10×10^{-6} M に調節することにした。

Fig. 4 Effect of iodine concentration in the reaction solution containing 0.1 M I^- and $0.1 \text{ M CH}_3\text{COOH}$ on detector response of L-ascorbic acid

Concentration of L-H₂A: (1) $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, (2) $4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$

本法では L-H₂A に対して過剰のヨウ素を三ヨウ化物イオン ($\text{I}_2 + \text{I}^- \rightleftharpoons \text{I}_3^-$) として吸光度検出するため、その検出器応答は反応液中のヨウ化物イオンの濃度に当然影響される。そこで、 $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ヨウ素と 0.1 M 酢酸の混合溶液に種々の濃度のヨウ化物を加えてヨウ化物イオンの濃度の効果を検討した。ヨウ化物の濃度が $0.06 \sim 0.13 \text{ M}$ の範囲内ではその濃度の増加とともに L-H₂A のピーク（負のピーク）高さはわずかに大きくなった。しかし、 0.1 M ヨウ化物イオンを使用したとき、L-H₂A は再現性の良い大きな吸光度減少ピークを示した。このことから、ヨウ化物イオン濃度を 0.1 M に調節することにした。

反応溶液の酢酸の濃度は、キャリアー溶液と L-H₂A の標準溶液の各溶液が 0.1 M 酢酸を使用していることから 0.1 M に調節した。

$10 \times 10^{-6} \text{ M}$ ヨウ素、 0.1 M ヨウ化物と 0.1 M 酢酸の反応溶液は、調製後に長時間経過するとヨウ化物イオンが空気酸化されるため、検出器応答のベースラインをわずかに高く変化した。調製後 6 時間でも L-H₂A の定量に影響なく使用できた。

3.5 反応チューブの長さの効果

L-H₂A とヨウ素との反応時間の効果は、種々の長さの反応チューブ（内径 0.5 mm ）を 2.3.1 の操作 I で用いることによって検討した。その結果を Table 1 に示す。 $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-H₂A の検出器応答は反応チューブの長さが $100 \sim 200 \text{ cm}$ の範囲内ではほとんど一定のピークの高さ（負のピーク高さ）を示した。このことから 2.3 の操作では 140 cm の反応チューブを使用することにした。

Table 1 Effect of length of reaction tubing

Length of tubing ^{a)} /cm	Peak-height (detector response)/cm
	$2.5 \times 10^{-6} \text{ M L-H}_2\text{A}$
100	12.6
120	12.5
140	12.3
200	12.1

a) Tubing is 0.5 mm I.D. .

Table 2 Effect of foreign ions on determination of $2.00 \times 10^{-6} \text{ M L-H}_2\text{A}$

Ions	Amounts/ 10^{-6} M	Found/ 10^{-6} M	Error, %
Cu^{2+}	10	1.75	-12.5
	5	2.00	0
	$100^{\text{a)}$	2.02	1.0
Fe^{2+}	200	1.96	-2.0
Fe^{3+}	10	0.10	-95.0
	5	1.95	-2.0
	$10^{\text{a)}$	2.03	1.5
NO_2^-	1	1.76	-12.0
	0.5	1.90	-5.0
S^{2-}	1	2.30	15.0
	0.1	1.15	7.5
	$2^{\text{b)}$	2.03	1.5
SO_3^{2-}	1	2.41	20.5
	0.1	1.98	1.0
	$2^{\text{b)}$	2.02	1.0
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0.1	2.18	9.0

a) Cu^{2+} and Fe^{3+} were exchange for H^+ by using a Dionex AMMS. b) S^{2-} and SO_3^{2-} were removed as H_2S and SO_2 , respectively, by bubbling nitrogen gas through sample solution containing 0.12 M acetic acid at a flow rate of 200 mL/min .

3.6 共存物質の影響

$2 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-H₂A と種々の物質を含む試料溶液は 2.3 の操作に従って処理した。 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , F^- , Cl^- , I^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , プロピオン酸, リンゴ酸, コハク酸, 乳酸, ギ酸, 酪酸, シュウ酸, ブドウ糖（デキストリン酸）, 果糖, ラクトース, サッカースはそれぞれ $2 \times 10^{-3} \text{ M}$, NH_4^+ , Al^{3+} , クエン酸はそれぞれ $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, またマロン酸は $0.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ まで共存してもそれぞれ $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-H₂A の定量を妨害しなかった。妨害を示す物質についてはその結果を Table 2 に示す。 Cu^{2+} と Fe^{3+} は L-H₂A の空気酸化を促進することやヨウ化物イオンをヨウ素に酸化するためにそれぞれ $10 \times 10^{-6} \text{ M}$ の共存で妨害し、 Fe^{2+} は空気酸化されて Fe^{3+} になるために $200 \times 10^{-6} \text{ M}$ の共存で妨害した。これらのイオンは試料溶液を電気伝導度検出イオンクロマトグラフィーで使用される H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサ（Dionex 製 AMMS, CA, USA）に通し、 Cu^{2+} や Fe^{3+} を H^+ にイオン交換することを試みたところ、 Cu^{2+} が $100 \times 10^{-6} \text{ M}$ まで、また Fe^{3+} が

Fig. 5 Absorption spectra of colored and turbid soft drink samples diluted various-fold

(1) Sample A in Table 3 (colored and turbid) diluted 10-fold; (2) Sample B (colored) diluted 100-fold; (3) Sample C (colored) diluted 100-fold; (4) Sample D (colored) diluted 100-fold

10×10^{-6} M までの妨害を除去することができた。NO₂⁻は L-H₂A やヨウ化物イオンを酸化するため、また S²⁻、SO₃²⁻と S₂O₃²⁻はヨウ素を還元するためにそれぞれ 1×10^{-6} M の共存でも妨害を示した。S²⁻と SO₃²⁻は試料溶液を 0.12 M 酢酸溶液とした後、窒素を毎分 200 mL の流量で 30 分間バブリングして H₂S と SO₂ として除去したところ、それぞれ 2×10^{-6} M までの妨害を除去することができた。

3・7 有色・懸濁清涼飲料水中の L-H₂A の定量

波長 350 nm で光を吸収する有色物質や散乱する懸濁物質は 2・3・1 の操作 I で L-H₂A の検出器応答に影響を与えるが、これらの物質は 2・3・2 の操作 II で吸光度の増加（正のピーク）として測定することが可能である。操作 I で得られる L-H₂A の負のピークの高さは操作 II で得られる正のピークの高さ（試料溶液のマトリックスによる正のピーク高さ）だけ減少するため、本法では操作 I で得られる負のピークの高さに操作 II の正のピークの高さを加えて L-H₂A の負のピークの高さとした。

4 種の清涼飲料水試料（A は有色・懸濁、B、C と D は有色）を適当に希釈し、吸収曲線を測定した（Fig. 5）。試料 A の懸濁物質は汙紙（定量汙紙 No.5C）で汙過しても完全に除去することはできなかった。また、汙過の操作で L-H₂A の一部が分解した。各清涼飲料水はかなり希釈しても有色・懸濁物質による吸光度を示した。2・3 の操作で試料溶液 B の 200 倍希釈と 500 倍希釈、試料溶液 C の 200 倍希釈と 400 倍希釈の各溶液を使用し、得られた検出器応答

Fig. 6 Detector response of colored and turbid soft drink samples

Peak A: Obtained according to Procedure I; Peak B: Obtained according to Procedure II in which the reaction solution was substituted for 0.1 M CH₃COOH. Sample B in Table 3 (colored) diluted (a) 200-fold and (b) 500-fold; (II): Sample C (colored) diluted (c) 200-fold and (d) 400-fold

を Fig. 6 に示す。操作 I では負のピーク [Fig. 6 の Peak (A)] が得られ、操作 II では反対に正方向のピーク [Fig. 6 の Peak (B)] が得られた。本法による 4 種の清涼飲料水試料中の L-H₂A の定量結果を Table 3 に示す。本法の定量値は既報⁷⁾の結果とよく一致し、各試料の希釈率を変えても定量値は変化しなかった。標準添加実験の結果を Fig. 3 に示す。各清涼飲料水を使用して得られた検量線は L-H₂A の標準溶液を用いて得られた検量線と互いに平行な直線を示した。このことから清涼飲料水中の共存物質は本法による L-H₂A の定量を全く妨害しないことが分かった。本法の精度を確かめる目的で、1000 倍希釈の試料溶液 A、200 倍希釈の試料溶液 B と C 及び 2000 倍希釈した試料溶液 D を用いて 11 回繰り返し実験したところ、Table 3 に示すように、各希釈した 4 種の清涼飲料水（A、B、C、D）中の L-H₂A の定量値の平均はそれぞれ 1.57 μM（相対標準偏差、RSD = 0.2%）、3.40 μM（RSD = 0.2%）、1.88 μM（RSD = 0.3%）と 0.85 μM（RSD = 0.3%）であった。また、試料溶液に既知量の L-H₂A を添加して回収実験を行ったとこ

Table 3 Analysis of L-H₂A in colored and turbid samples

Sample	Dilution/fold	Added/ 10 ⁻⁶ M	Found/ 10 ⁻⁶ M	Content in original sample/10 ⁻³ M	Recovery, %	Spectrophotometric method ⁷⁾ /10 ⁻³ M
A	1000	0	1.57 (<i>n</i> = 11)	1.57	—	1.59
		0.50	2.08	1.58	102.0	
		2.00	2.78	1.56	99.5	
B	200	0	3.40 (<i>n</i> = 11)	0.680	—	0.693
		0.50	3.88	0.696	96.0	
		2.00	3.37	0.685	100.5	
C	200	0	1.88 (<i>n</i> = 11)	0.376	—	0.381
		1.00	2.88	0.376	100.0	
		2.00	2.93	0.372	99.5	
D	2000	0	0.85 (<i>n</i> = 11)	1.70	—	1.81
		1.00	1.87	1.74	102.0	
		2.00	2.45	1.80	101.0	

A is colored and turbid sample and B, C and D are colored samples.

ろ、回収率は 96～102% で良好な結果が得られた。

文 献

- 1) M. A. Eldawy, A. S. Tawfik, S. R. Elshabouri : *Anal. Chem.*, **47**, 461 (1975).
- 2) T. Pal, D. S. Maity : *Anal. Lett.*, **18**, 1131 (1985).
- 3) Y.-S. Fung, S.-F. Luk : *Analyst*, **110**, 201 (1985).
- 4) O.-W. Lau, S.-F. Luk, K.-S. Wong : *Analyst*, **112**, 1023 (1987).
- 5) A. Besada : *Talanta*, **34**, 731 (1987).
- 6) S. A. Al-Tamrah : *Anal. Chim. Acta*, **209**, 309 (1988).
- 7) 米村康信, 三浦恭之, 康智三 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **39**, 567 (1990).
- 8) E. Y. Backheet, K. M. Emara, H. F. Askal, G. A. Saleh : *Analyst*, **116**, 861 (1991).
- 9) S. Z. Qureshi, A. Seed, S. Haque, M. A. Khan : *Talanta*, **38**, 637 (1991).
- 10) A. Safavi, L. Fotouhi : *Talanta*, **41**, 1225 (1994).
- 11) O. H. Abdelmageed, P. Y. Khashaba, H. F. Askal, G. A. Saleh, I. H. Refaat : *Talanta*, **42**, 573 (1995).
- 12) K. Srividya, N. Balasubramanian : *Analyst*, **121**, 1653 (1996).
- 13) Y. Fujita, I. Mori, T. Yamaguchi, M. Hoshino, Y. Shigemura, M. Shimano : *Anal. Sci.*, **17**, 853 (2001).
- 14) Z. He, X. Li, H. Meng, S. Lu, G. Song, L. Yuan, Y. Zeng : *Anal. Lett.*, **31**, 1553 (1998).
- 15) 内山俊一, 山口孝生, 浜本修, 鈴木周一 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 286 (1989).
- 16) S. Uchiyama, Y. Umetsu : *Anal. Chim. Acta*, **255**, 53 (1991).
- 17) M. J. Esteve, R. Fare, A. Frigola : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 804 (1995).
- 18) M. C. Yebra-Biurrun : *Talanta*, **52**, 367 (2000).
- 19) Y. Miura, T. Maruyama, T. Koh : *Anal. Sci.*, **11**, 617 (1995).
- 20) Y. Miura, M. Hatakeyama, T. Hoshino, P. R. Haddad : *J. Chromatogr. A*, **951**, 77 (2002).
- 21) F. Lazaro, A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel : *Analyst*, **111**, 163 (1986).
- 22) F. Lazaro, A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel : *Analyst*, **111**, 167 (1986).
- 23) J. Hernandez-Mendez, A. Alonso Mateos, M. J. Almendral Parra, C. Garcia de Maria : *Anal. Chim. Acta*, **184**, 243 (1986).
- 24) 山根兵, 小川庸生 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 625 (1987).
- 25) D. T. Burns, N. Chimpalee, D. Chimpalee, S. Rattanariderom : *Anal. Chim. Acta*, **243**, 187 (1991).
- 26) K. K. Verma, A. Jain, A. Verma, A. Chaurasia : *Analyst*, **116**, 641 (1991).
- 27) A. Jain, A. Chaurasia, K. K. Verma : *Talanta*, **42**, 779 (1995).
- 28) J. A. Nobrega, G. S. Lopes : *Talanta*, **43**, 971 (1996).
- 29) A. V. Pereira, O. Fatibello-Filho : *Talanta*, **47**, 11 (1998).
- 30) A. Molina-Diaz, I. Ortega-Carmona, M. I. Pascual-Reguera : *Talanta*, **47**, 531 (1998).
- 31) K. Grudpan, K. Kamfoo, J. Jakmunee : *Talanta*, **49**, 1023 (1999).
- 32) A. A. Alwarthan : *Analyst*, **118**, 639 (1993).
- 33) Z. Zhang, W. Qin : *Talanta*, **43**, 119 (1996).
- 34) I. B. Agater, R. A. Jewsbury : *Anal. Chim. Acta*, **356**, 289 (1997).
- 35) S. S. L. Castro, V. R. Balbo, P. J. S. Barbeira, N. R. Stradiotto : *Talanta*, **55**, 249 (2001).
- 36) A. P. S. Paim, C. M. N. V. Almeida, B. F. Reis, R. A. S. Lapa, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima : *J. Pharm. And Biomed. Anal.*, **28**, 1221 (2002).

Sensitive FIA of L-Ascorbic Acid in Colored and Turbid Aqueous Solution

Yasuyuki MIURA¹ and Maiko AKAGI¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokai University, 1117, Kitakaname, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-1292

(Received 28 August 2008, Accepted 18 November 2008)

The photometric detection-FIA of L-ascorbic acid (L-H₂A) in colored and turbid aqueous solution is often difficult due to light-absorbing by coloring matter and light-scattering by an insoluble material. A FIA method has been developed for the determination of L-H₂A at the 10⁻⁶ M level in colored and turbid samples. It is based on the reaction of L-H₂A with iodine, and then a photometric measurement of the absorbance for the residual iodine as triiodide at 350 nm. The proposed method consists of two procedures: procedure I can measure the sum peak-height of the both absorbance-decrease (negative-peak) from the background as a result of iodine consumption with L-H₂A and absorbance increase (positive-peak) by the colored and insoluble elements in the sample; procedure II can measure a positive-peak of the absorbance-increase by the matrix. The detector response corresponding to L-H₂A in the sample was estimated by a correction of the sum peak-height obtained in procedure I with the peak-height of the absorbance-increase in procedure II. The calibration graph was linear over the range 2.7 × 10⁻⁸ M ~ 4.5 × 10⁻⁶ M (4.8 ~ 790 ppb) L-H₂A. The proposed method was successfully applied to the determination of L-H₂A in colored and turbid soft-drink samples without any tedious pretreatment, and the obtained results were compared with those by our previous spectrophotometric method. This method is approximately 50-fold more sensitive than a FIA method of Hernandez-Mendez *et al.* using iodate as an oxidation reagent of L-H₂A. Good recoveries of L-H₂A added to the sample solutions were achieved by using the proposed method.

Keywords : flow-injection analysis ; L-ascorbic acid ; iodine measurement ; colored solution ; turbid solution ; matrix correction.