

DE FOTOCHEMISCHE DESTRUKTIE  
van het  
L-ASCORBINEZUUR  
in aanwezigheid van  
RIBOFLAVINE als  
FOTOSENSIBILISATOR

---

**PROEFSCHRIFT**

tot het verkrijgen van de graad van Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen op gezag van de Rector, Prof. Dr. ir. A. G. BAPTIST

Promotor : Prof. Dr. A. VAN DEN HENDE

door

**IR. W. DESCHACHT**

DE FOTOCHEMISCHE DESTRUKTIE  
van het  
L-ASCORBINEZUUR  
in aanwezigheid van  
RIBOFLAVINE als  
FOTOSENSIBILISATOR

---

**PROEFSCHRIFT**

tot het verkrijgen van de graad van Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen op gezag van de Rector, Prof. Dr. ir. A. G. BAPTIST

Promotor : Prof. Dr. A. VAN DEN HENDE

door

**IR. W. DESCHACHT**

---

Gent, 8 juni 1967.

Voorwoord.

Bij het samenstellen van de tekst verwijlden mijn gedachten vaak bij de herinnering aan Professor A. DE VLEESCHAUWER. Onder zijn begeesterende invloed werden immers, in verband met dit werk, de eerste ideeën geformuleerd. Ik draag dan ook met een diep gevoel van erkentelijkheid graag de bekomen resultaten aan zijn gedachtenis op.

Bij het neerleggen van dit proefschrift gaan mijn gevoelens van diepe erkentelijkheid naar mijn Promotor, Professor Dr. VAN DEN HENDE. Spijts het vele werk dat zijn aandacht volledig opeiste, nam hij de ondankbare taak op de schouders om mij verder bij te staan in het afwerken van de reeds op stapel gezette experimenten. Graag betrek ik in dezelfde hulde de Heren Professoren juryleden en in het bijzonder Professor H. HENDRICKX en Professor Dr. SCHAMP met wie ik vele malen mocht discussieren bij het uitvoeren van de experimenten en bij het samenstellen van de tekst.

Mijn dank gaat uiteraard ook naar het Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek onder wiens auspiciën ik de gelegenheid kreeg om de vereiste proefnemingen te kunnen uitvoeren op het Rijkszuivelstation en op het Proefstation voor Zeevisserij. Graag richt ik ook een bijzonder woord van dank aan het technisch personeel. De nauwgezetheid waarmee de experimenten uitgevoerd werden heeft in een belangrijke mate tot de verwezenlijking van dit proefschrift bijgedragen.

Tenslotte dank ik allen op wier kennis en ervaring ik in de loop van dit werk beroep heb gedaan en die hier niet zouden vermeld zijn.

# De Fotochemische Destrukctie van het

## l-Ascorbinezuur

in aanwezigheid van Riboflavine als Fotosensibilisator.

### 1. Inleiding.

Men is zich nog maar kort geleden bewust geworden van de belangrijke rol, die riboflavine als fotosensibilisator in de natuur kan vervullen (1). Een van de belangrijkste onderzoekingsdomeinen, waarin het gedrag van vitamine B<sub>2</sub> als fotosensibilisator naar voor getreden is, zijn de technologische studies die verricht worden in verband met het ontstaan van smaakgebreken in de melk. Het ontrafelen van de mechanismen, waardoor de konsumptiemelk in organoleptische kwaliteit vermindert, is een bijzonder complex studieobject. Daar de ontwikkeling van de smaakgebreken in grote mate afhankelijk is van het zuurstofgehalte in de melk (2, 3, 4, 5), heeft dit probleem een belangrijke economische achtergrond gekregen, tengevolge van de succesvolle aanpak van de hygiënische melkwinning, -bewerking en -distributie.

Onderzoekingen hebben aan het licht gebracht, dat de gevoeligheid van de melk ten aanzien van het ontstaan van de smaakgebreken in het algemeen afhankelijk is van het seizoen (6, 7, 8, 9), van de voeding (6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), van het ras en het individu (6, 19, 20, 21) en van de behandeling van de melk, in het bijzonder van het pasteuriseren, het homogeniseren en het transporteren (6, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37).

Met uitzondering van het zuurstofgehalte, zijn de opgesomde factoren echter van sekundair belang. Ze beïnvloeden weliswaar de vormingssnelheid van de smaakstoffen, maar zijn geen absolute vereiste voor de ontwikkeling van deze stoffen. Momenteel wordt vooropgesteld, dat de smaakstoffen gevormd worden door de oxydatie van labiele verbindingen en dat deze degradatie reacties gekatalyseerd worden door zware metaalionen, door enzymen en door het licht.

### 1.1. De chemische oxydaties.

Tot deze klasse rekent men de afbraakreacties die onder de invloed van de katalytische werking van metaalionen tot stand komen. Reeds in 1930 is vastgesteld geworden (38) dat zware metaalionen een belangrijke vermindering van de organoleptische kwaliteit van de melk konden veroorzaken. Uitvoerige studies zijn ondernomen geworden door BROWN & medewerkers (11, 12, 22, 23), OLSON & BROWN (39), EPPLE & HORALL (40), KRUKOVSKY & GUTHRIE (41), DE VLEESCHAUWER & medewerkers (42, 43, 44, 45), KRUKOVSKY (46), STRIBLEY & medewerkers (37) en door GODED Y MUR (47). Al deze onderzoeken brachten aan het licht, dat zowel in de vetfase als in de waterige fase degradaties tot stand komen. De smaakgebreken worden echter hoofdzakelijk toegeschreven aan de oxydatieve afbraak van de onverzadigde vetzuren. Al naar gelang de ligging van de doorbroken dubbele binding ontstaan hieruit lagere vetzuren en carbonylverbindingen. Het groot aantal voorhanden zijnde vetzuren resulteert uiteraard in een zeer complex mengsel van afbraakprodukten en het wekt dan ook geen verbazing te moeten vaststellen dat de precise toedracht nog niet helemaal opgehelderd is. In het licht van deze vooropstelling werd de verdeling nagegaan van toegevoegde koper- en ijzerionen tussen de eiwit- en de vetfractie (48, 49). In overeenstemming met de onderzoeken van THURSTON & medewerkers (50) postuleerde KRUKOVSKY (46) de hypothese, dat een

onderscheid dient gemaakt te worden tussen de oxydatiesmaken, die afkomstig zijn van de degradaties van de vetten, en de smaakstoffen, die hun oorsprong vinden in de oxydatieve veranderingen van de fosfolipiden. De mogelijke oxydatieve degradatie van laatst genoemde verbindingen en het verband met de oxydatiegebreken werd nagegaan (51, 52, 53) en door STARK & FORSS (54) wordt de mening verdedigd, dat de oorsprong van de smaakgebreken in afgeroomde melk bij die afbraakreacties te vinden is.

Het ligt voor de hand aan te nemen, dat de vorming van de smaakstoffen kan voorkomen worden, door ieder contact tussen de melk en het koper, het ijzer of de legeringen hiervan te vermijden. De onderzoeken van LUSAS & medewerkers (55) en van DUNKLEY & KING (56) hebben echter aangetoond, dat een dergelijke voorzorgsmaatregel lang niet altijd leidt tot een voldoening gevende toestand. Het van nature uit aanwezige koper (0,2 - 0,3 ppm) wordt namelijk geadsorbeerd door de gebruikelijke roestvrije apparatuur en vormt dan plaatselijke, zeer reactieve oxydatiezones. Antioxydanten (17, 57, 58, 59) en complexerende verbindingen (60) zijn onderzocht geworden op hun waarde als bestrijdingsmiddel van deze smaakgebreken. Nadat OLSON & BROWN (61) er in geslaagd waren de vorming van de smaakstoffen te remmen met behulp van glutathion, zijn tal van onderzoeken aan de vrijstelling van de sulfhydrylgroepen in melk gewijd geworden (62, 63, 64). Ook het mogelijke verband tussen de vrijstelling van de sulfhydrylgroepen, de smaakontwikkeling en de gebruikte temperatuur-duur combinatie bij het steriliseren en het pasteuriseren (29, 31, 65, 66, 67) is uitvoerig onderzocht geworden. In overeenstemming met de aldus bekomen gegevens zijn RUSSELL & DAHL (68) er in geslaagd om de smaakgebreken tegen te gaan door 0,2 % magere melkpoeder toe te voegen aan melk en melkprodukten.

### 1.2. De enzymatische oxydaties.

KENDE (cfr GREENBANK 69) meende reeds in 1931, dat de smaakgebreken een gevolg kunnen zijn van enzymatische reacties. Aan deze stelling is lang getwijfeld geworden (69). De bewaring bij lage temperatuur aktiveert immers de vorming van de smaakstoffen en pH veranderingen van de grootte orde van 0,1 pH eenheid kunnen een uitgesproken invloed hebben op het proces van de smaakvorming. In 1954 heeft GREENBANK (70) vastgesteld dat het xanthineoxydase smaakgebreken veroorzaakte. Deze waarneming is bevestigd geworden door de onderzoeken van KURAMOTO (71), AURAND (72, 73) en van SMITH & DUNKLEY (74).

### 1.3. De fotochemische oxydaties.

Meer dan vijftientig jaar geleden formuleerden FLAKE & medewerkers (75, 76) op grond van hun waarnemingen het besluit, dat het zonlicht aanleiding geeft tot het ontstaan van een smaakgebrek. Aanvankelijk is dit verschijnsel niet als een oxydatie herkend geworden (77). Aan de hand van hun resultaten hebben WEINSTEIN & medewerkers (4, 20, 30, 78, 79) gemeend de oorsprong van de lichtsmaken in een minorkomponent van de weieiwitten te kunnen lokaliseren. PATTON & medewerkers (80, 81, 82) zijn nog verder gegaan en meenden uit hun waarnemingen te mogen afleiden, dat de oxydatie van het methionine de oorsprong is van de lichtsmaken. Deze konklusie wordt gesteund door het werk van ORO & medewerkers (83), die er in slaagden het methional af te zonderen en die de organoleptische eigenschappen van dit produkt bestudeerden. De hypothese van PATTON wordt verder gesteund door het feit dat in waterige oplossingen de fotooxydatie van aminozuren in aanwezigheid van een fotosensibilisator (methyleenblauw) aangetoond is (84), door het feit dat uit de onderzoeken

van STRAUSS & NICKERSON (85, 86) gebleken is dat het riboflavine als fotosensibilisator op kan treden en door het feit dat een toename van de vrije aminozuren in de melk blijkbaar de snelheid van de tot standkoming van een smaakgebrek verhoogt (87).

Nochtans zijn niet alle experimentele gegevens in overeenstemming met de stelling van PATTON. PRODANSKI (88) kon geen, en meer recente onderzoeken (89) konden slechts kleine hoeveelheden vrij methionine in melk aantonen. SAMUELSSON (90, 91) meende dat het methionine onder de invloed van het licht uit meer complexe verbindingen vrijgesteld zou worden, maar zijn experimenten met di- en tripeptiden van methionine mislukten. Tussen de concentratie aan vrije aminozuren in melk en de snelheid waarmee het smaakgebrek tot ontwikkeling kwam konden HENDRICKX & medewerkers (89) op grond van hun waarnemingen nog geen verband vinden. AURAND & medewerkers (92) hebben ondertussen de mening vooropgezet dat een reactie van het tryptofaan eigenlijk aan de basis van het smaakgebrek zou liggen. WHISNER & KEENEY (93, 94) vonden inderdaad geen methionine in melk, maar deze onderzoekers achten het niet uitgesloten dat die verbinding via andere reacties zou verdwijnen.

In ieder geval bezitten de fotonen, die door het zichtbare licht getransporteerd worden, een te geringe energieinhoud om door een rechtstreekse actie veel degradaties te laten doorgaan. In melk dienen derhalve stoffen voorhanden te zijn, die na de opname van dergelijke fotonen de energie kunnen overdragen op min of meer gestedabiliseerde verbindingen. Tot de laatst genoemde soort verbindingen worden stoffen gerekend met een elektronegatief stikstof- of zwavelatoom (sarcosine, glycine, alanine, N-methylalanine, E.D.T.A. en methionine) en het l-ascorbinezuur, zoals duidelijk volgt uit de onderzoeken van DE VLEESCHAUWER & medewerkers (95). Als licht-



absorberend systeem komen vitamine A en de carotenen (96, 97, 98, 99) en het riboflavine in aanmerking. In het werk van DE VLEESCHAUWER & medewerkers (45) en van VELANDER & PATTON (100) wordt duidelijk aangetoond, dat het vitamine B<sub>2</sub> tussenkomt bij de ontwikkeling van de smaakgebreken. Wanneer de melk bevrijd wordt van het aanwezige riboflavine door het te adsorberen op een kolom florösil, dan komt het smaakgebrek bij het belichten niet tot stand. Wordt aan dergelijke melk terug riboflavine toegevoegd, dan ontwikkelt zich de lichtsmaak wel. Verder tonen de resultaten van HENDRICKX & medewerkers (101) aan dat de riboflavine vrije melk een belangrijk groter reflekterend vermogen heeft voor licht met een golflengte die door het vitamine B<sub>2</sub> opgenomen kan worden.

Ten onrechte wordt vaak gemeend, dat alleen een direkte zonsbestraling aanleiding kan geven tot het smaakgebrek. Diffuus daglicht en kunstlicht, zowel van gloeilampen als van fluorescentiebuisen veroorzaken dezelfde reacties (102, 103, 104, 45). Uiteraard wordt de beste bescherming bekomen door de melk zo weinig mogelijk bloot te stellen aan om het even welke vorm van licht. Voor de distributie van drinkmelk zijn ondoorlatende of licht absorberende verpakkingen dan ook ten zeerste aan te bevelen (100, 104, 105, 106, 107), ofschoon bij het laatst vermelde type rekening dient gehouden te worden met het feit, dat de geabsorbeerde energie omgezet wordt in warmte en derhalve moeilijkheden van bacteriologische aard kunnen optreden (108). Uitvoerige gegevens betreffende de temperatuurstijging bij het bestralen van melk in diverse verpakkingen worden gegeven door HENDRICKX (109).

#### 1.4. De terminologie.

Voor het aanduiden van de organoleptisch vastgestelde veranderingen worden in de literatuur vele benamingen gebruikt, zo-

als talkig, vissig, ranzig, geoxydeerd, geactiveerd, karton smaak, lichtsmaak, enz. Meer en meer worden echter slechts twee grote groepen van smaakgebreken weerhouden, namelijk de geoxydeerde smaken en de lichtsmaken. Hierbij wordt de term van geoxydeerde smaken voorbehouden aan de verschijnselen die zich afspelen in de vetfase, wat ook de katalysator is. Smaakgebreken die onder de invloed van een sensibilisator en licht in de vetfase tot stand komen, noemt men momenteel dus ook oxydatiesmaken.

De term lichtsmaken wordt dan voorbehouden aan de organoleptische veranderingen die in aanwezigheid van een fotosensibilisator en licht in de waterige fase van de melk tot stand komen, ofschoon chemisch gezien de reacties waardoor de smaakstoffen gevormd worden uiteraard oxydaties kunnen zijn.

#### 1.5. De rol van het l-ascorbinezuur in de vorming van de smaakgebreken.

Het verdwijnen van het l-ascorbinezuur in melk waarin onder de invloed van metaalionen of van het licht smaakgebreken ontstaan, is een van de markantste feiten, die uit de literatuur naar voren treden. Talrijke onderzoekers hebben dan ook gepoogd om de rol van het l-ascorbinezuur in het smaakvormingsproces te achterhalen, maar de bekomen resultaten laten niet toe om een welbepaalde stelling als de meest waarschijnlijke naar voren te halen.

Op grond van de algemene eigenschappen van het l-ascorbinezuur kan verwacht worden, dat deze verbinding de redoxpotentiaal van melk zal verlagen en derhalve de oxydaties zal tegenwerken. Tal van onderzoekers zijn tot dergelijke konklusie gekomen (110, 111, 112, 113, 114, 115). Verder, en in overeenstemming met dit standpunt,

stelde GOULD (116) vast, dat de daling van het reducerend vermogen van melk bij het belichten of na een kontaminatie met koperionen toegeschreven moet worden aan het verlies van het l-ascorbinezuur. Ook in recente onderzoeken is men tot de bevinding gekomen dat het l-ascorbinezuur de vorming van de smaakgebreken tegengaat (117).

Andere onderzoekers (23, 39, 118) aanvaardden wel het feit dat het l-ascorbinezuur de vorming van de smaakgebreken zou tegengaan, maar dat dit slechts zou kunnen gebeuren onder de voorwaarde dat het l-ascorbinezuur gestabiliseerd is. Blijkbaar vond men bij deze onderzoeken een parallelisme tussen de vertraging in de destructie van het l-ascorbinezuur en de snelheid waarmee de smaakstoffen gevormd werden. Het toevoegen van l-ascorbinezuur aan melk zou dan ook resulteren in een sterkere smaakontwikkeling, indien men er niet in slaagt de afbraak van die verbinding af te remmen. Deze hypothese houdt dus rekening en met de redoxpotentiaal verlagende eigenschappen van het l-ascorbinezuur en met de zeer merkwaardige karakteristiek van deze verbinding om geïnduceerde oxydaties te veroorzaken. Volgens GODED Y MUR (47) heeft de toevoeging van lactose de gewenste verhoging van de stabiliteit van het l-ascorbinezuur voor gevolg, maar deze resultaten zijn niet in overeenstemming met de onderzoeken van HOLMES (119).

Aan de hand van het werk van GREENBANK (120) kan een korrelatie tussen de veranderingen van de  $E_h$  potentiaal en de toename van de smaakstoffen echter betwist worden. De proeven, die door deze onderzoeker uitgevoerd geworden zijn, tonen aan, dat de redoxpotentiaalverlaging door het toevoegen van l-ascorbinezuur verwaarloosbaar klein kan zijn, terwijl de vorming van de smaakstoffen toch achterwege blijft. Ook de experimenten van LARSEN & medewerkers (36) zijn in dit opzicht leerrijk. Het bleek namelijk, dat een homogenisatie wel

de melk beschermd tegen het ontstaan van smaakgebreken, maar niet tegen de veranderingen in de  $E_h$  potentiaal. GODDARD & MUR (121) daarentegen legt wel een verband tussen de veranderingen van de redoxpotentiaal en het ontstaan van de smaakstoffen.

Een derde werkhypothese kent een belangrijk aandeel toe aan de verhouding tussen het l-ascorbinezuur en de som van het l-ascorbinezuur en het dehydro-l-ascorbinezuur (41, 77, 122) in de reacties die tot de vorming van de smaakstoffen leiden. Deze laatste zouden slechts gevormd kunnen worden wanneer de bedoelde verhouding groter is dan 0,4 en de gevormde smaakcomponenten zouden opnieuw vernietigd worden, wanneer de verhouding groter wordt dan 0,7. De gedeeltelijke afbraak van het l-ascorbinezuur is derhalve een *conditio sine qua non* voor de tot stand koming van de smaakgebreken, zodat een snelle en totale vernietiging van deze verbinding een bescherming zou opleveren tegen het tot stand komen van het gebrek. De experimenten van CHILSON & medewerkers (123) schijnen deze veronderstelling te steunen. Het vernietigen van het l-ascorbinezuur kan echter niet gebeuren door een belichting, daar onder deze voorwaarden een lichtsmaak tot uiting komt. Daartegenover hebben GJESSING & TROUT (65) vastgesteld, dat na het verdwijnen van het l-ascorbinezuur sommige melkmonsters geen, andere melkmonsters wel smaakgebreken vertoonden in de aanwezigheid van koperionen.

Voor wat de fotochemisch veroorzaakte smaakgebreken betreft, heeft PATTON (81) nog een ander hypothese voorgesteld, namelijk, dat de aanwezigheid van dicarbonylverbindingen in het algemeen en de aanwezigheid van het dehydro-l-ascorbinezuur in het bijzonder, de vorming van de smaakstoffen zou katalyseren. Volgens DUNKLEY & medewerkers (117) zou het l-ascorbinezuur in geen geval de vorming van de lichtsmaak remmen.

Een groot aantal onderzoekers (4, 27, 42, 43, 45, 105, 106, 107, 124, 125, 126) veronderstellen het bestaan van een parallelisme tussen het verdwijnen van het l-ascorbinezuur en het ontstaan van de smaakgebreken en gebruiken de afbraakreactie van het l-ascorbinezuur als een indiktorreactie voor de studie van het probleem van de smaakgebreken.

Slechts in een enkel onderzoek (127) is de mening vooropgezet geworden, en wel na de statistische verwerking van een groot aantal resultaten, dat er geen verband zou bestaan tussen het verdwijnen van het l-ascorbinezuur en de ontwikkeling van de smaakgebreken.

Ondanks het groot aantal onderzoekingen, die betrekking hebben op het l-ascorbinezuur in het kader van de ontwikkeling van de smaakgebreken, ondanks de vaak sterk uiteenlopende, soms tegenstrijdige interpretaties die aan de bekomen resultaten gekoppeld worden, ondanks het feit dat de afbraaksnelheid (128) eventueel een maatstaf zou kunnen zijn voor de gevoeligheid van een melkmonster ten opzichte van de ontwikkeling van de smaakgebreken en ondanks het feit dat de afbraak een testreactie zou kunnen zijn om de evolutie van het gebrek te volgen is het opmerkelijk dat zo weinig aandacht aan het verzamelen van kinetische gegevens over de afbraak van het l-ascorbinezuur is besteed geworden.

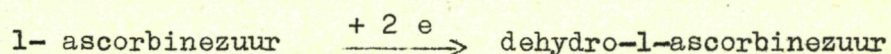
#### 1.6. De oxydatieve degradatie van het l-ascorbinezuur.

##### 1.6.1. Chemische informaties.

De oxydatieve afbraak van het l-ascorbinezuur is uitvoerig onderzocht geworden door HERBERT & medewerkers (129). Volgens deze onderzoekers wordt het l-ascorbinezuur door het verlies van twee waterstofatomen eerst omgezet tot het dehydro-l-ascorbinezuur. Deze

reactie is onder fysiologische kondities reversiebel. Onder dezelfde voorwaarden wordt echter ook de laktonring opengeboken, zodat het dehydro-1-ascorbinezuur irreversiebel omgezet wordt tot het 2,3-diketo-1-gulonzuur. Bij het verder doorvoeren van de oxydatie wordt de molekule opgeboken in twee stukken, waarbij het oxaalzuur en het 1-threonzuur gevormd worden. Dit schema wordt thans algemeen aanvaard, ofschoon momenteel niet met volledige zekerheid uitgemaakt is of het 1-ascorbinezuur de twee waterstofatomen in één enkele of in twee opeenvolgende stappen verliest. Op grond van hun onderzoekingen over de reductie van het fosfowolframzuur hebben BEZSSONOFF & medewerkers (130) het bestaan van een mono-dehydro-1-ascorbinezuur gepostuleerd. CATTANEO & SARTORI (131) zijn er evenwel niet in geslaagd deze tussenvorm aan te tonen bij het polarografisch onderzoek van de oxydatie van het 1-ascorbinezuur. Het gebruik van deze techniek heeft echter de vooropstelling van een tussenvorm met zeer korte levensduur voor gevolg gehad. Dit tussenprodukt ontstaat door het gelijktijdig verlies van beide protonen (132).

Wanneer de omzetting van het 1-ascorbinezuur met chemische analyse methodes gevolgd wordt, zal dergelijk tussenprodukt uiteraard niet gedetekteerd worden en zal alleen de totaalreactie bestudeerd worden :



Een en ander wordt weergegeven in het hierbij gevoegde schema (figuur 1).

#### 1.6.2. Kinetische gegevens over de oxydatieve afbraak van het 1-ascorbinezuur onder de invloed van metaalionen.

Aanvankelijk is vooropgesteld geworden dat de oxydatieve

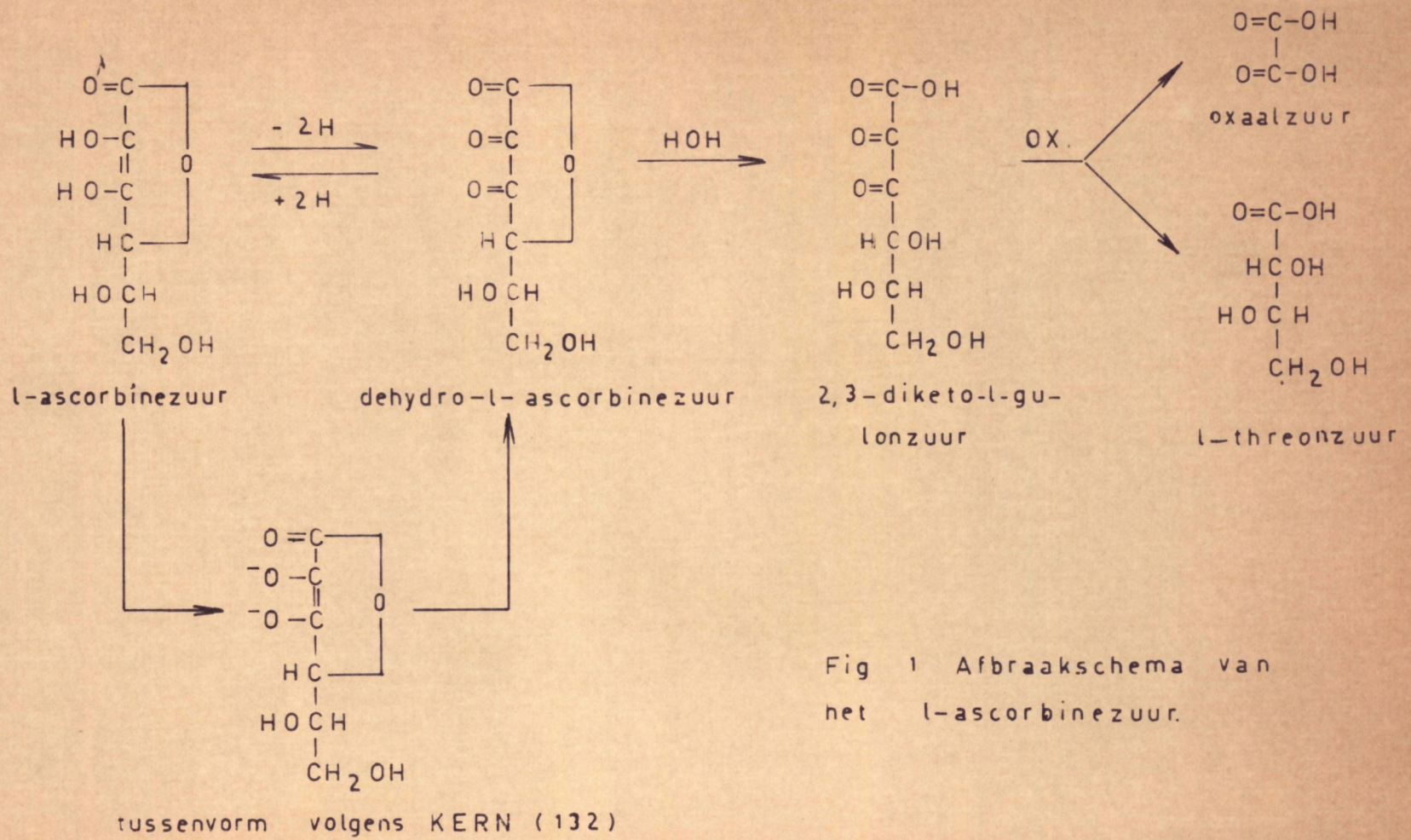


Fig 1 Afbraakschema van het l-ascorbinezuur.

afbraak van het l-ascorbinezuur onder de invloed van metaalionen zou verlopen volgens een reactie van de nulde orde (77). Studies op waterige oplossingen (133, 134, 135, 136, 137, 138) en op melk (139) hebben echter aangetoond, dat het l-ascorbinezuur onder deze voorwaarden volgens een reactie van de eerste orde tot het dehydro-l-ascorbinezuur omgezet wordt. Hierbij dient aangestipt te worden, dat de afwijkingen van de resultaten ten opzichte van de mathematische wet eigenlijk vrij groot zijn en het aantal waarnemingen over het algemeen zeer beperkt is. Door op de bekomen resultaten de stelling van LIVINGSTONE (140) waarin gezegd wordt, dat eenvoudige reacties in oplossingen verlopen volgens een eenvoudige wet, toe te passen, kan men de getrokken besluiten wel verrechtvaardigen.

Een tweede belangrijke vaststelling is afkomstig van GERO & LE GALLIC (141). Aan de hand van de uitgevoerde experimenten konden deze onderzoekers niet alleen tot een reactie van de eerste orde besluiten, maar konden ze ook aantonen dat de afbraak verloopt over het mono-ascorbaation.

Door de vergelijking van de gebruikte analysetechnieken komt een opmerkenswaardig gegeven aan het licht. Met uitzondering van twee mededelingen zijn alle onderzoeken gebaseerd op het gebruik van het 2,6-dichlorofenol-indofenol reagens voor de dosering en het volgen van de evolutie van de concentratie van het l-ascorbinezuur. In een onderzoek van TOBIAS & HERREID (125) en in een onderzoek van DE VLEESCHAUWER & medewerkers (45) is voor het eerst met deze bijna traditionele werkwijze gebroken geworden. Deze onderzoekers hebben het 2,4-dinitrofenylhydrazine reaktief gebezigd, maar het aantal doseringen dat uitgevoerd werd in de loop van één enkele proef is te gering om een nauwkeurige bepaling van de reaktiesnelheidskonstante toe te laten.



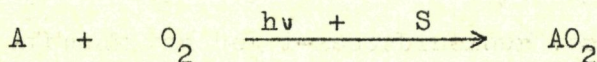
### 1.6.3. Kinetische gegevens over de oxydatieve afbraak van het l-ascorbinezuur in aanwezigheid van een fotosensibilisator en van licht.

In de geraadpleegde literatuur spreken slechts SMITH & DUNKLEY (139) zich uit over de gevolgde reactieorde ten aanzien van het l-ascorbinezuur. Deze onderzoekers beweren dat de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur verloopt volgens een reactie van de nulde orde. Die veronderstelling schijnt echter in tegenspraak te zijn met alle andere zij het dan ook kwalitatieve gegevens die over deze destructie in waterige oplossingen en in melk gevonden worden.

### 1.6.4. Het riboflavine als fotosensibilisator.

Wanneer een oplossing van l-ascorbinezuur bestraald wordt met licht van een voldoende hoge energetische inhoud, dan ondergaat het l-ascorbinezuur een afbraak (142). Dergelijke fotolyse doet zich evenwel niet voor wanneer bedoelde oplossing licht met een groter golflengte opvangt. Onder deze condities wordt slechts in aanwezigheid van een fotosensibilisator een afbraak van het l-ascorbinezuur vastgesteld (143).

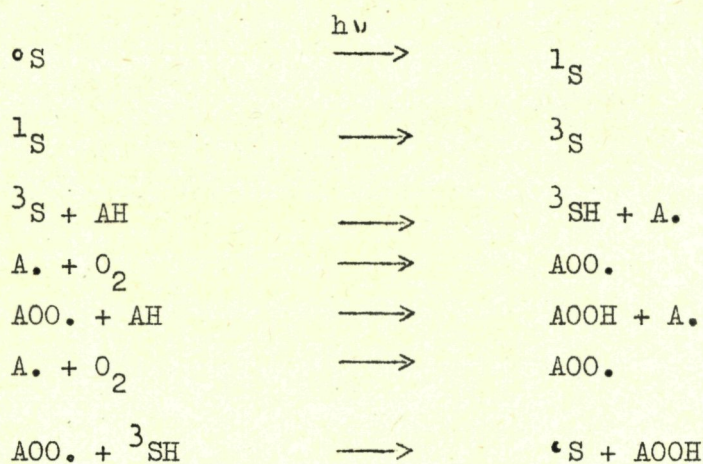
De totaal reactie in aanwezigheid van een fotosensibilisator kan door onderstaand schema weergegeven worden (144) :



maar ofschoon hierin begin- en eindtoestand vervat zijn, kunnen meerdere opeenvolgende tussentrappen voorkomen vooraleer het eindresultaat bereikt wordt.

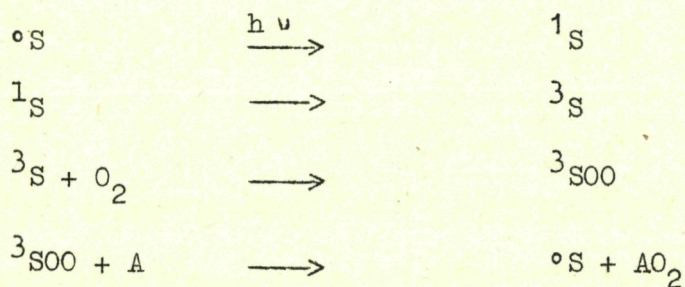
### 1.6.5. Het effect van de fotosensibilisator op de afbraak van het l-ascorbinezuur.

Een eerste mogelijkheid wordt een Backström-type fotogesensibiliseerde auto-oxydatie genoemd. De diverse tussentrappen worden in het hiernavolgend schema voorgesteld :



Hierin stellen  $\text{°S}$ ,  $\text{1S}$  en  $\text{3S}$  de molekulen voor van de sensibilisator respektievelijk in de grond-, singulet- en triplettoestand. Deze kettingreactie komt echter niet in aanmerking om de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur te verklaren.

In een tweede schema worden in het bijzonder de vorming van peroxyden (145, 146) of transannulaire peroxyden (147, 148, 149) vooropgezet. De werking van de sensibilisator zou volgens het schema verlopen :

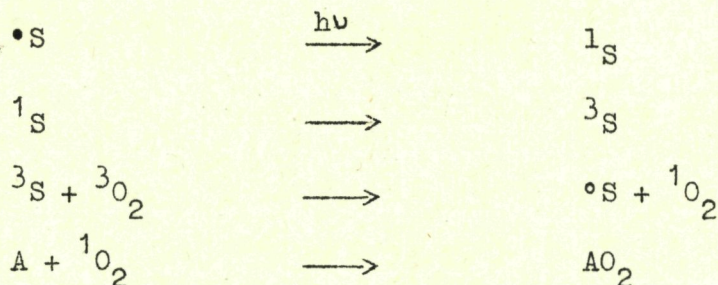


Dit schema is uitvoerig aangewend geworden, ondermeer bij de studie

van de oxydaties die door het chlorophyle als fotosensibilisator (150) veroorzaakt worden, maar wordt momenteel in het gedrang gebracht door het feit dat :

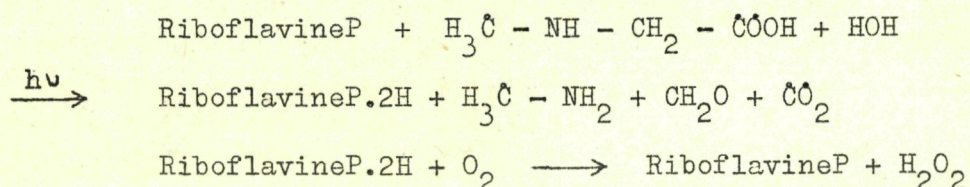
1. wanneer de sensibilisator en de acceptor geadsorbeerd worden op verschillende plaatsen de reactie toch door- gaat ;
2. in anthraceen één molekule nodig is als sensibilisator en één als acceptor, waarbij het gevormde moloxide niet tot een ringsluiting mag overgaan, maar de zuurstof eers dient over te dragen op een tweede molekule.

Deze gegevens hebben tot de ontwikkeling geleid van de theorie waarin de zuurstof, normaal als een triplet diradikaal aanwezig, onder de invloed van de sensibilisator omgezet wordt tot de singulettoestand (151, 152, 153). Het schema zou dan worden :



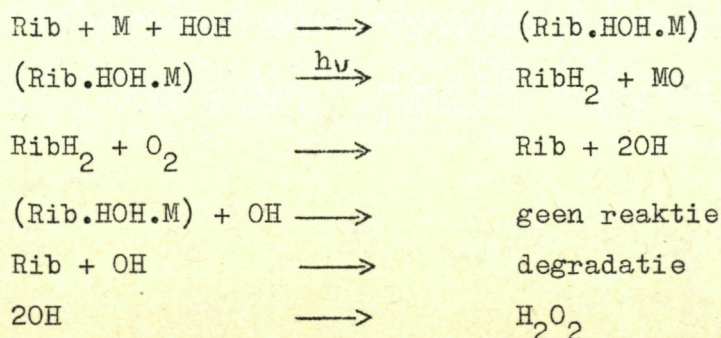
Dergelijk schema zou uiteraard aangewend kunnen worden om de werking van het riboflavine als fotosensibilisator te verklaren. Vanaf de eerste systematische onderzoeken in dit verband is echter naar voor gekomen dat het water in de door riboflavine gesensibiliseerde reacties een grote rol schijnt te spelen. In het basisschema voorgesteld door FRISELL & medewerkers (154) en weergegeven in figuur 2 komt dit nog niet tot uiting. Maar teneinde de afbraak van het

radioactief gemerkte sarcosine te kunnen verklaren, zijn deze onderzoekers gedwongen geweest het water mee te laten reageren :



Wel nemen deze onderzoekers nog aan, dat eerst de riboflavinemolekule dient geactiveerd te worden, zodat verondersteld mag worden, dat de reactie via de triplettoestand verloopt. Op grond van spektrofotometrische technieken is door deze onderzoekers ook besloten geworden, dat er tussen het riboflavine en de acceptor geen complexen gevormd worden.

In tegenstelling met deze waarneming stellen NICKERSON & STRAUSS (85, 86) de vorming van een complex tussen de sensibiliserende molekule, het water en de acceptor voorop. Deze hypothese heeft het belangrijke voordeel, dat de triplettoestand eigenlijk niet in een driemoleculaire botsing moet betrokken geraken, daar de aktivering en de daaropvolgende destruktie doorgaat op het complex. Hun vooropstelling wordt gesteund door het feit dat geleidbaarheidsmetingen wel op de vorming van dergelijke complexen schijnen te wijzen. In aanwezigheid van luchtzuurstof wordt door deze onderzoekers het volgende schema vooropgesteld :

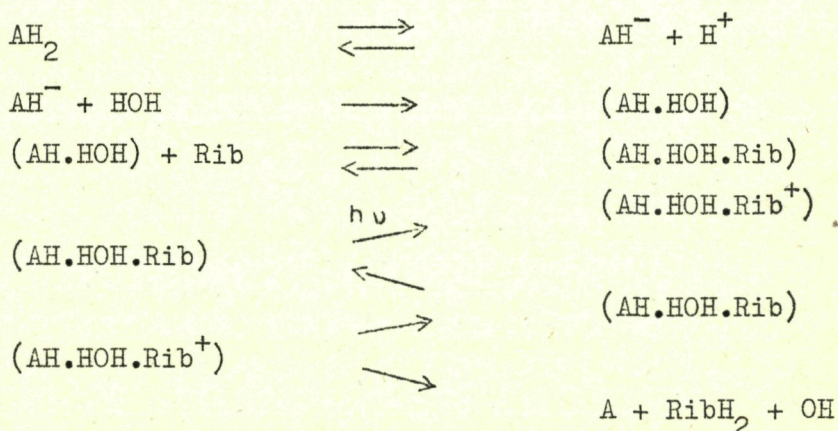


De bekomen resultaten bij het belichten van een riboflavineoplossing in aanwezigheid van een overmaat acceptor zijn sprekend voor wat betreft de bescherming van de riboflavinemolekule tegen de afbraak door het waterstofperoxyde.

Een complexvorming van de sensibilisator-molekule, het riboflavine, en het substraat, de proteïnen, is bij de studie van de lichtsmaken gepostuleerd geworden door AURAND & medewerkers (59, 92), maar in tegenstelling met de resultaten van NICKERSON & STRAUSS (85, 86) werd door deze onderzoekers een uitgesproken afbraak van het vitamine B<sub>2</sub> vastgesteld.

#### 1.7. Doel van het onderzoek.

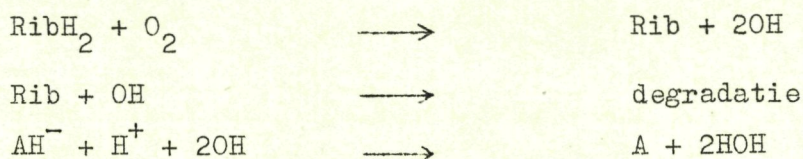
De geldigheid van de hypothese van NICKERSON & STRAUSS is bijzonder attractief voor wat de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur betreft. Daarenboven wordt vooropgesteld, dat wat ook de aard van de katalysator is, hetzij zware metaalionen hetzij een sensibilisator en licht, de oxydatieve afbraak van het l-ascorbinezuur verloopt via een eerste orde reactie en over het mono-ascorbaation. Wordt hiermede rekening gehouden dan zou volgend schema opgebouwd kunnen worden.



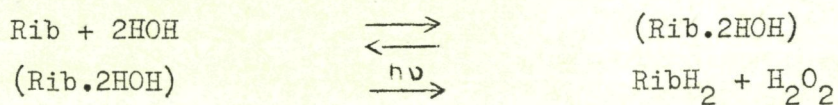
BIJSTELLINGEN:

1. Siggia en Hanna hebben ten onrechte gemeend, dat er een invloed merkbaar was van de aanwezigheid van de snelst reagerende verbinding op de reactiesnelheidskonstante van de traagst reagerende verbinding bij eerste orde reacties.
2. Van de foutenverdelingskurven in de spectrofotometrie geldt voor de chemicus alleen de klassieke foutenverdelingswet.
3. Het is mogelijk om spectrofotometers voor het zichtbare en U.V.-gebied met behulp van eenvoudige technieken te controleren op de golflengteinstelling, de fotometrische nauwkeurigheid en de fotometrische schaal.

De commissie stelt voor de eerste bijstelling te verdedigen.



Wanneer daarenboven een overschot aan riboflavine voorhanden is, dient nog rekening gehouden te worden met de reacties :



Het kernpunt van deze reeks reacties ligt bij de derde vergelijking. Het daarin weergegeven evenwicht wordt uiteraard beheerst door de wet van GULDBERG en WAAGE. Wanneer nu aangenomen wordt, dat de afbraak ten aanzien van het l-ascorbinezuur een reactie van de eerste orde is en wanneer de recirkulatiesnelheid van het gebruikte riboflavine voldoende groot is, dan wordt de concentratie aan fotosensibilisator schijnbaar een konstante. Hieruit volgt dat de wet van de massawerking

$$\frac{(\text{AH}. \text{HOH}. \text{Rib})}{(\text{AH}. \text{HOH})(\text{Rib})} = K$$

vereenvoudigd kan worden tot

$$\frac{(\text{AH}. \text{HOH}. \text{Rib})}{(\text{AH}. \text{HOH})} = K'$$

waarin  $K' = (\text{Rib})K$ .

Het is hierbij duidelijk, dat een verhogen van de concentratie aan l-ascorbinezuur geen invloed heeft op de gemeten reactie-

snelheidskonstante, daar bij een reactie van de eerste orde alleen de verhouding tussen het aantal molekulen bij de aanvang van de controle, moment  $t_1$ , en de resterende hoeveelheid molekulen na een reaktieduur  $T$ , op het moment  $t_2$ , de waarde van de reaktiesnelheidskonstante bepalen. De studie van de invloed van toenemende concentraties aan l-ascorbinezuur kan derhalve weinig gegevens aan het licht brengen.

Een geheel ander aspekt biedt echter de studie van de invloed van de concentratie aan fotosensibilisator. Uit de wet van de massawerking volgt immers dat een toenemende concentratie aan riboflavinemolekulen de verhouding tussen de complexmolekulen en de beschikbare substraatmolekulen verandert en daarmee wordt tevens de reaktiesnelheidskonstante gewijzigd. Uit de vereenvoudigde wet van GULBERG-WAAGE volgt echter, dat er een concentratie aan lactoflavinemolekulen zal gevonden worden, waarbij de schijnbare concentratie aan de complexe molekulen gelijk wordt aan de concentratie beschikbare substraatmolekulen. Vanaf dat ogenblik heeft de reaktiesnelheidskonstante een maximale waarde. Wijzigingen van het aantal beschikbare substraatmolekulen, van het aantal absorbeerbare fotonen of van de vorm van de belichtingskuvet zullen derhalve wel de absolute waarde van deze reaktiesnelheidskonstante beïnvloeden, maar onder de gewijzigde voorwaarden zal steeds bij dezelfde vitamin B<sub>2</sub> concentratie de maximale snelheidskonstante gevonden worden. Uiteraard dient hierbij verondersteld te worden, dat door de gewijzigde voorwaarden, noch de recirkulatiesnelheid van de riboflavinemolekulen ernstig verlaagd wordt, noch de concentratie aan zuurstofmolekulen limiterend wordt, noch het quantumrendement van de sensibilisator-molekule gewijzigd wordt.

Het ligt voor de hand, dat het aantonen van een dergelijke concentratie aan lactoflavinemolekulen een sterk argument is in het



voordeel van de hypothese, dat de werking van het riboflavine als sensibilisator verloopt via een complexvorming, zonder dat hierbij echter gegevens bekomen worden over de aard van het complex. Een eventueel bestaan van een dergelijke karakteristieke concentratie van de sensibilisator kan achterhaald worden door het bepalen van de reaktiesnelheidskonstanten onder diverse voorwaarden

De grootste struikelblok ten aanzien van het experimenteel vastleggen van de reaktiesnelheidskonstanten, is de doseringstechniek van het l-ascorbinezuur. Tot deze vaststelling komt men aan de hand van de reeds geraadpleegde literatuur, maar overduidelijk wordt dit, wanneer de gegevens bestudeerd worden in verband met de normaal daartoe gebruikte 2,6-dichlorofenol-indofenol-titratie.

Teneinde te kunnen overgaan tot het verzamelen van de noodzakelijke gegevens om de complexvorming te staven, is het derhalve noodzakelijk, dat allereerst een geschikte doseringstechniek op punt gesteld wordt of gevonden wordt. Het eerste deel van dit werk is hieraan besteed geworden, terwijl in het tweede deel achtereenvolgens onderzocht wordt of de reactie een wet van de eerste orde volgt, of de afbraak verloopt over het mono-ascorbaation, welke invloed de pH op de reaktiesnelheidskonstante heeft, wat de invloed is van de belichtingsintensiteit en van de vorm van de belichtingskuvet op de reaktiesnelheidskonstante en wat de invloed is van de concentratie aan riboflavine bij verschillende pH waarden en bij verschillende belichtingsintensiteiten op de reaktiesnelheidskonstante.

## 2. De dosering van het l-ascorbinezuur.

### 2.1. Vereisten waaraan de gebruikte doseringsmethode moet beantwoorden

De factoren, die de keuze bepalen van de aan te wenden analysetechniek, zijn afhankelijk van het te onderzoeken probleem. Daar de studie van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur een belangrijke bijdrage kan vormen tot een beter begrijpen van de ontwikkeling van een smaakgebrek in melk, is het verantwoord om de concentratie van het vitamine C en van het riboflavine in de proefoplossingen gelijkwaardig te stellen aan de gemiddelde concentratie van beide bestanddelen in melk. Dit betekent voor het l-ascorbinezuur een concentratie van ongeveer 20,0 mg per liter. Ofschoon het in principe mogelijk is om de reaktiesnelheidskonstante te bepalen aan de hand van twee waarnemingen, is dergelijke werkwijze niet bijzonder betrouwbaar. Het verzamelen van meerdere waarnemingen en het verwerken van deze gegevens met een aangewezen statistische techniek is zeker te verkiezen. Hieruit vloeit echter voort, dat de gebruikte analysemethode een voldoende hoge gevoeligheid moet bezitten, zodat de dosering kan doorgevoerd worden op een kleine hoeveelheid van de belichte vloeistof. Alleen onder deze voorwaarde is het mogelijk om een betrekkelijk groot aantal waarnemingen te verrichten zonder de laagdikte of de belichte oppervlakte van de proefoplossing sterk te veranderen.

Een tweede voorwaarde volgt uit de voorziene proefduur. Uiteraard kan wel een dergelijke combinatie van de proefvoorwaarden (belichtingsintensiteit, pH waarde en concentratie aan riboflavine) verwacht worden, waarbij de oorspronkelijke hoeveelheid van het l-ascorbinezuur in een betrekkelijk korte tijd tot op 10 % gereduceerd wordt. Zo in deze tijdspanne meerdere waarnemingen moeten tot stand

gebracht worden, dient de gevolgde analysetechniek eenvoudig te zijn, of moet de techniek een soepel werkschema mogelijk maken.

Uiteindelijk dient nog vooropgesteld te worden, dat het gebruikte reagens niet mag beïnvloed worden door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur, door de gebruikte fotosensibilisator, of door de gebruikte bufferbestanddelen.

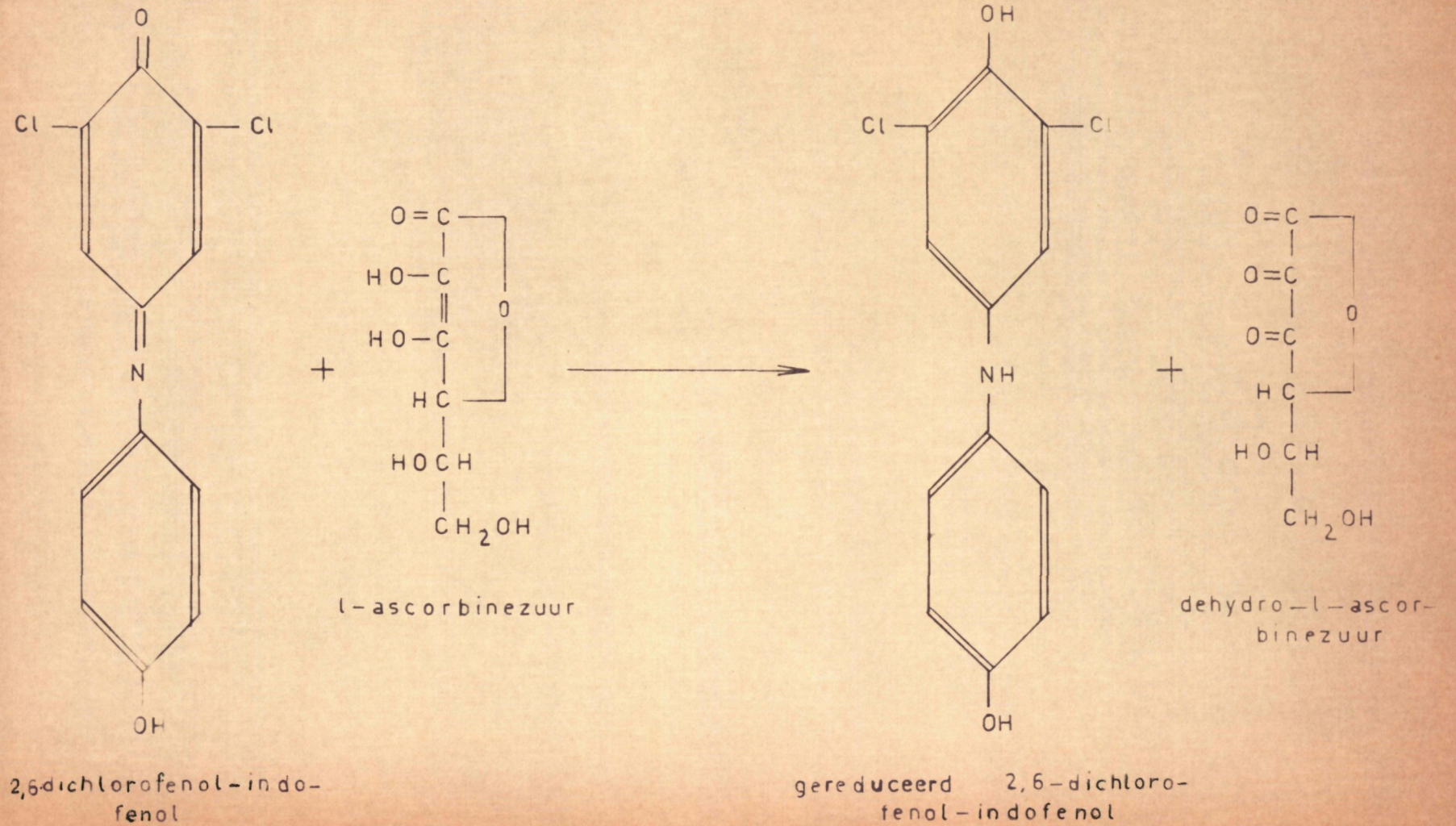
## 2.2. De 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie.

Deze methode berust op het reducerend vermogen van het l-ascorbinezuur. Het is de oudste, maar veruit nog de meest toegepaste werkwijze en ze is ontwikkeld geworden door TILLEMANS & medewerkers (155, 156). In alkalisch midden is de geoxydeerde vorm van het reaktief blauw gekleurd, in zuur midden roze. De gereduceerde vorm is kleurloos, zodat bij het titreren van een zure l-ascorbinezuuroplossing met een licht alkalische 2,6-dichlorofenol-indofenol-oplossing het eindpunt van de titratie aangeduid wordt door een kleuromslag naar roze. Dit is af te leiden uit de in figuur 3 weergegeven totaalreactie.

Voor een uitvoerige behandeling van de te volgen werkwijze kan verwezen worden naar de voorschriften van de ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS (157), naar de werken van GSTIRNER (158), van MARX (159), naar de voorschriften van de A.O.A.C. (160) en naar het SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH (161). Vrij spoedig na het in gebruik nemen van deze techniek zijn bezwaren gerezen ten opzichte van de betrouwbaarheid van de bekomen resultaten (162). Ten gevolge van het weinig specifieke karakter van het reagens zijn talrijke storende bestanddelen aangetoond geworden, onder meer het glutathion, cysteine, reducton, reductinezuur en het juglon (163), melanoïden en de afbraakprodukten

Fig 3

Reaktieschema titrimetrische dosering l-ascorbinezuur



van het pektine, galakturonzuur en pektenen (164, 165), anthocyaninen (166), cystine, sulfiet, thiosulfaat, zwavelwaterstof, quinol en ureum (167), tweewaardige ijzerionen (168, 169, 170, 171), tin (172) en zwaveligzuuranhydride (173) en waarvan het **oysteïne** voor melk veruit het belangrijkste is. De studie van het elimineren van deze bestanddelen is dan ook zeer uitgebreid geworden (174). Op sporen van de zware metaalionen na, kan a priori beweerd worden dat deze stoffen niet in de te gebruiken proefoplossingen zullen voorhanden zijn.

In het voorgaande hoofdstuk is reeds gewezen worden op de vrij grote afwijkingen die optreden ten opzichte van de gepostuleerde wetmatigheid waarlangs de omzetting verloopt van het l-ascorbinezuur naar het dehydro-l-ascorbinezuur. Er is inderdaad vooropgesteld geworden dat deze reactie verloopt volgens een wet van de eerste orde. Dit houdt in dat er tussen de concentratie van de uitgangsverbinding, het l-ascorbinezuur, en de reaktieduur een semi-logaritmisch verband bestaat. In figuur 4 zijn de resultaten weergegeven die door DE VLEESCHAUWER & medewerkers (175) bekomen worden zijn gedurende een fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur en met behulp van de 2,6-dichlorofenol-indofenoltitratie. Het is duidelijk dat tussen de reaktieduur en de concentratie aan vitamine C het verband niet goed weergegeven wordt door een semi-logaritmische betrekking.

Meerdere redenen kunnen aangehaald worden om deze afwijkingen te verklaren. Het zou mogelijk zijn dat de omzetting van het l-ascorbinezuur niet verloopt volgens een reactie van de eerste orde. Het is echter even zo goed mogelijk dat het gebruikte reaktief beïnvloed wordt door het aanwezige waterstofperoxyde, dat, volgens het opgestelde reaktieschema, gevormd wordt en waarvan momenteel niet uitgemaakt is of het al dan niet verbruikt wordt in een chemische oxydatie van het l-ascorbinezuur. Uiteindelijk zou het reagens gevoelig kunnen

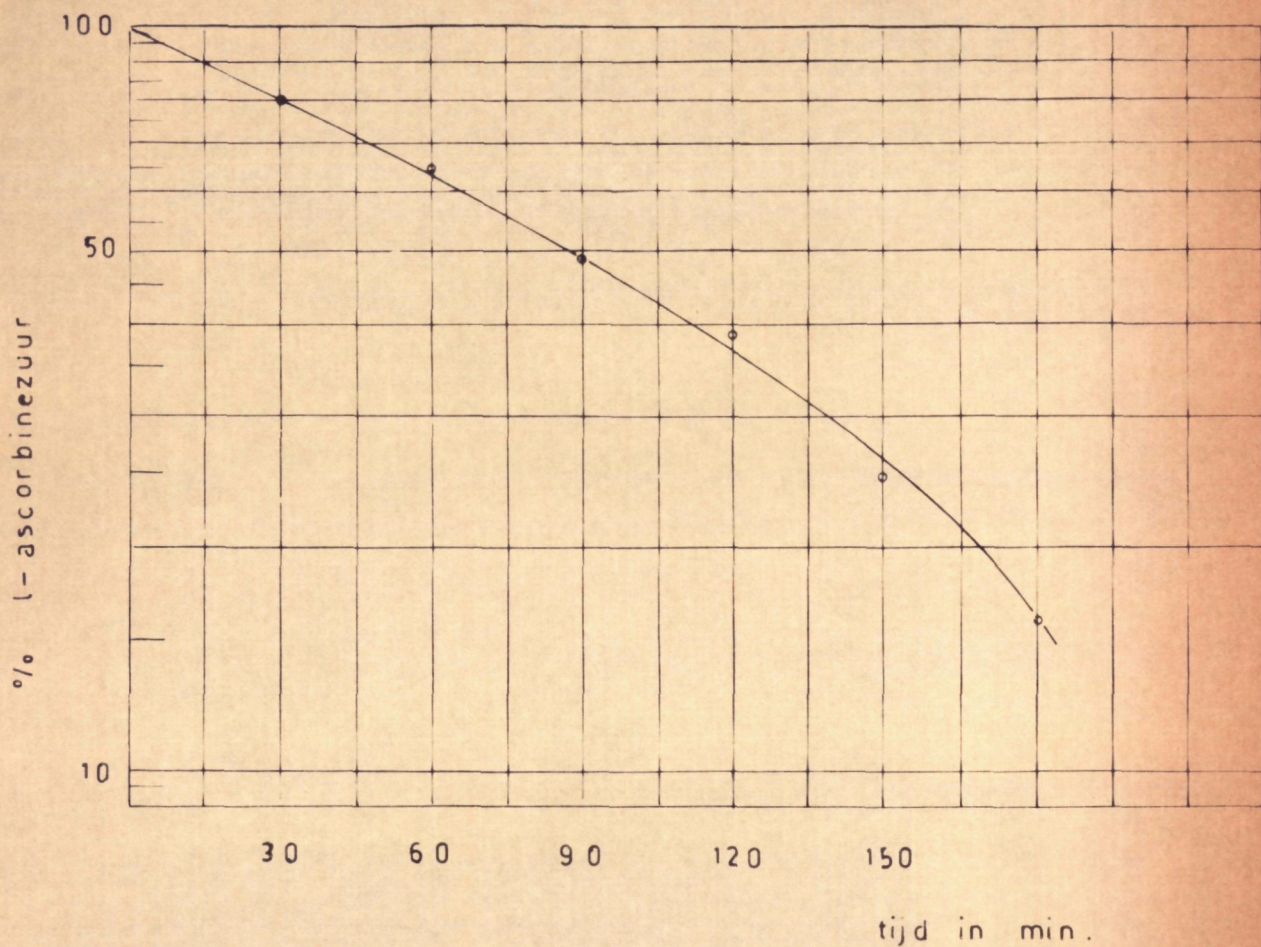


Fig 4 Fotogesensibiliseerde  
afbraak van het l-ascorbinezuur  
DE VLEESCHAUWER & medewerkers (175).

zijn voor de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur.

Tot het laatst vermelde storingstype menen BEZSSONOFF & medewerkers (130) te mogen besluiten. Op grond van het gedrag van het l-ascorbinezuur ten opzichte van diverse oxydatiemiddelen hebben deze onderzoekers vooropgezet, dat het l-ascorbinezuur over een mono-dehydro-l-ascorbinezuur tot het dehydro-l-ascorbinezuur omgezet wordt en dat het l-ascorbinezuur, het mono-dehydro-l-ascorbinezuur en het 2,3-diketo-l-gulonzuur een aequivalente hoeveelheid 2,6-dichlorofenol-indofenol verbruiken. Daar het bestaan van een éénmaal geoxydeerde molekulen van het l-ascorbinezuur door andere onderzoekingen niet is bevestigd geworden (131), neemt GSTIRNER (158) aan dat bij de dosering van het l-ascorbinezuur de aanwezige 2,3-diketo-l-gulonzuur molekulen als twee l-ascorbinezuur molekulen zullen bepaald worden. Deze vooropstelling stemt echter niet overeen met de resultaten van HUELIN (176). Deze onderzoeker heeft slechts een geringe storing kunnen vaststellen door het 2,3-diketo-l-gulonzuur bij het gebruik van het 2,6-dichlorofenol-indofenol reagens.

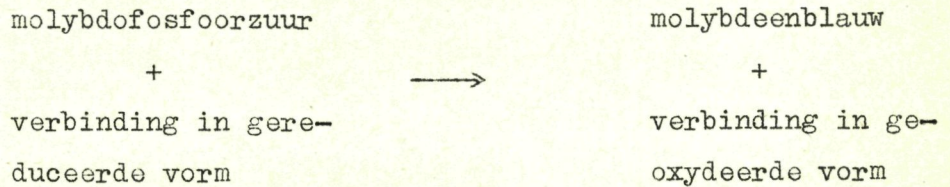
Ofschoon deze techniek uiteraard qua gevoeligheid en eenvoudigheid zeker beantwoordt aan de gestelde eisen, lijkt een zeker wantrouwen gewettigd ten opzichte van de resultaten die met deze methode bij het volgen van de oxydatieve omzetting van het l-ascorbinezuur bekomen worden.

### 2.3. De molybdeenblauwreactie.

#### 2.3.1. Principe van de methode.

Deze techniek is ontwikkeld geworden uitgaande van de door FEIGL (177) beschreven spottest voor het l-ascorbinezuur. In principe kan de grondreactie volgens WOODS & MELLON (178) door het

onderstaand evenwicht voorgesteld worden :



Daar het reagens gevormd wordt door het mengen van een molybdaatoplossing met een fosfaatoplossing en de aard van de kleur niet beïnvloed wordt door de concentratie van de reductor, kan met succes het fosfaation als limiterende faktor vervangen worden door het l-ascorbinezuur, zodat de te volgen werkwijze geïnspireerd kan worden door de overbekende fosfaatdoseringsmethodes (179). Deze redenering is gevolgd geworden door CAMOOZO (180), maar de gevoeligheid van de door deze onderzoeker ontwikkelde techniek is lang niet voldoende om het verschijnsel van de fotochemische oxydatie van het l-ascorbinezuur te kunnen bestuderen. Dit grondprincipe is verder bevestigd geworden door de resultaten bekomen door JOHANTOVA (181).

Gezien de kleurvorming een gevolg is van een oxydatie-reduktie reactie is het te verwachten dat het reagens weinig specifiek is. Maar door de onderzoekingen van BEZSSONOFF & medewerkers (130, 182) met het molybdofosfo-wolframzuur en door de onderzoekingen van FUJITA & EBIHARA (183) en van MICHAELIS & STRAUB (184) met het fosfo-wolframzuur is komen vast te staan dat de reductie van deze heteropolyzuren niet gestoord wordt door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur. Daar ook het molybdofosfoorzuur een heteropolyzuur is, kan op grond van de analogie verwacht worden, en dat met een redelijke kans op succes, dat deze reductie evenmin door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur zal gestoord worden.



## 2.3.2. Reactieven.

## Ammoniummolybdaatoplossing :

6,25 g ammoniummolybdaat p.a. worden opgelost in een minimum van gedistilleerd of gedeïoniseerd water. Hieraan worden 75 ml zwavelzuuroplossing van ongeveer 10 N toegevoegd en het geheel wordt aangelengd met water tot 250 ml.

## Fosfaatoplossing I :

5,5 g kaliumdiwaterstoffosfaat p.a. werden opgelost in en aangelengd tot 250 ml met gedistilleerd of gedeïoniseerd water.

## Fosfaatoplossing II :

5,5 g kaliumdiwaterstoffosfaat p.a., 1,5758 g oxaalzuur p.a. en 3,0920 g boorzuur p.a. worden opgelost in en aangelengd tot 250 ml met gedistilleerd of gedeïoniseerd water.

## Zwavelzuuroplossing van ongeveer 10 N :

280 ml zwavelzuur p.a. met een densiteit van 1,84 worden voorzichtig uitgegoten in ongeveer 500 ml water. Na het afkoelen van deze oplossing tot op kamertemperatuur wordt verder aangelengd met water tot de merkstreep.

## Stock- en testoplossingen van het l-ascorbinezuur.

250,0 mg voorafgaandelijk gedroogd, kristallijn l-ascorbinezuur p.a. worden opgelost in en aangelengd tot 1.000 ml met ge-

distilleerd of gedeïoniseerd water. Eventueel kan deze oplossing gestabiliseerd worden door middel van 3,5 mg E.D.T.A. De complexerende verbinding wordt onder de vorm van 1,0 ml van een waterige oplossing toegevoegd vooraleer de l-ascorbinezuur oplossing aangelengd wordt tot de merkstreep.

De testoplossingen worden door verdunning gemaakt uitgaande van de stockoplossing en dit juist voor ze nodig zijn. Deze oplossingen kunnen eveneens met behulp van 3,5 mg E.D.T.A. beschermd worden.

### 2.3.3. Methodiek.

In een droge recipiënt worden achtereenvolgens 1,0 ml van de ammoniummolybdaatoplossing, 10,0 ml testoplossing en 1,0 ml fosfaatoplossing I gebracht. Het geheel wordt goed gemengd en gedurende 5 minuten in een waterbad bij 37° C geplaatst. Daarop wordt de oplossing snel gekoeld met behulp van stromend water, de blauw gekleurde vloeistof wordt overgebracht in een kolorimeterkuvet met een lichtpad van 20,0 mm en wordt uitgemeten met een kolorimeter of een spektrofotometer bij een geschikte golflengte.

Door gebruik te maken van de tweede fosfaatoplossing, wordt het l-ascorbinezuur door het oxaalzuur beschermd tegen een oxydatie door de luchtzuurstof, maar de snelheid van de doseringsreactie wordt sterk vertraagd. Een verhogen van de reaktietemperatuur kan dit euvel gedeeltelijk ondervangen, maar een mogelijke afbraak van het 2,3-diketo-l-gulonzuur dient voorkomen te worden. Daartoe wordt gebruik gemaakt van de eigenschappen van het boorzuur. De bepaling wordt onder deze voorwaarden als volgt uitgevoerd : 1,0 ml ammoniummolybdaatoplossing, 10,0 ml proefoplossing en 1,0 ml fos-

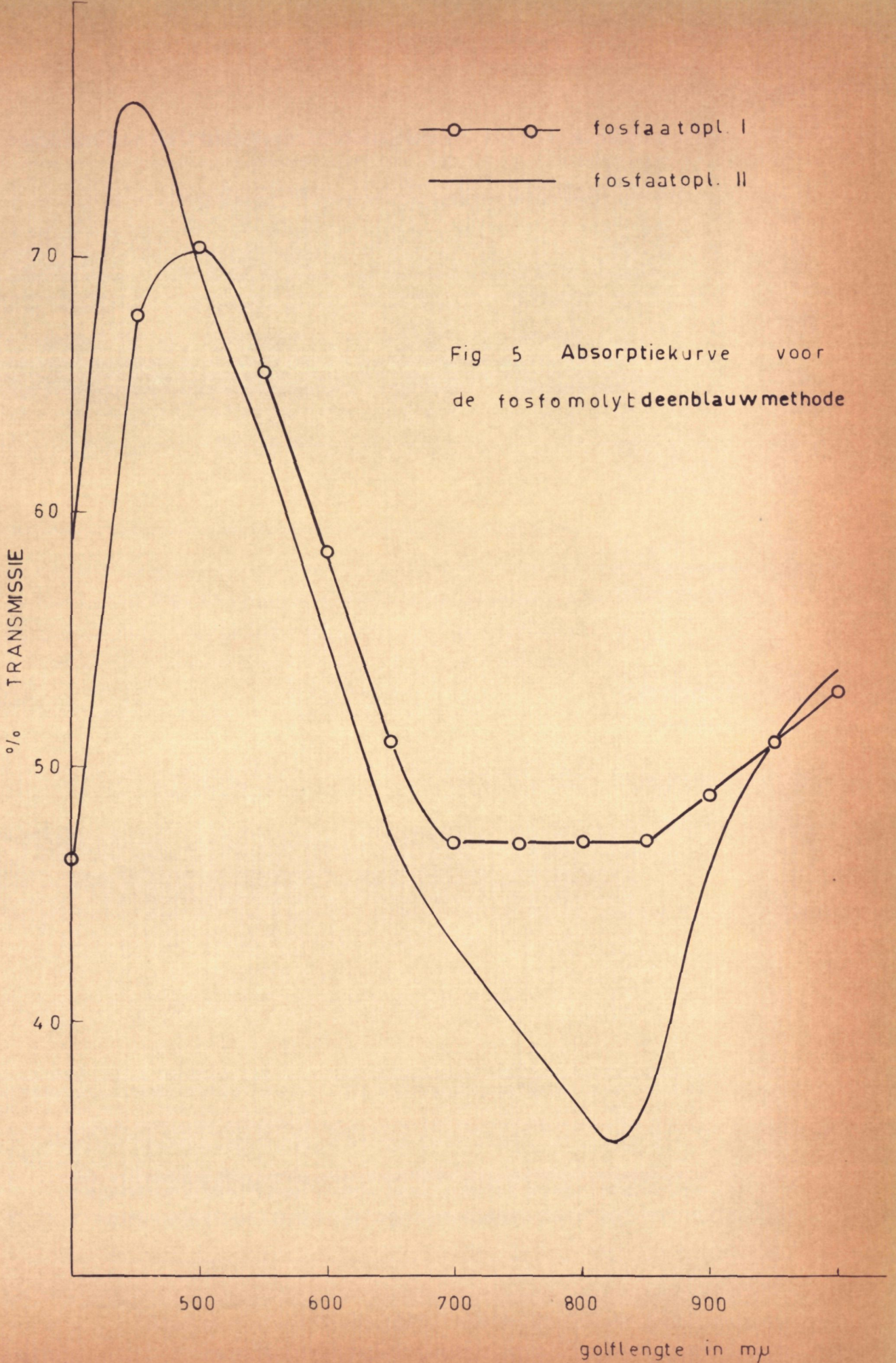
faatoplossing II worden achtereenvolgens in een geschikte recipiënt gebracht en goed gemengd. Het geheel wordt gedurende 30 minuten in een waterbad op 60° C geplaatst. Vervolgens wordt de oplossing gekoeld met behulp van stromend water, de vloeistof wordt overgebracht in een kolorimeterkuvet met een lichtpad van 20,0 mm en wordt uitgemeten met een kolorimeter of een spektrofotometer bij een geschikte golflengte.

#### 2.3.4. Absorptiecurve.

De nodige waarnemingen zijn uitgevoerd geworden met een Beckman DU spektrofotometer. De bekomen gegevens zijn samengevat in tabel 1 voor de methode die gebruik maakt van de eerste fosfaatoplossing en in tabel 2 voor de methode met de tweede fosfaatoplossing. De twee absorptiecurven zijn weergegeven in figuur 5, waaruit duidelijk blijkt dat bij de eerste techniek een zeer breed absorptie-maximum bekomen wordt. De absorptieband is smaller bij het gebruik van de tweede methode, maar de bepaling vergt veel meer tijd, zodat alleen de eerste techniek verder aangewend geworden is bij de studie van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur. Aan te stippen is nog, dat er een belangrijke verschuiving in het absorptie-maximum opgetreden is in vergelijking met de fosfaatdoseringmethode. Bij deze laatste techniek wordt immers uitsluitend gemeten bij 600  $m\mu$ , daar waar de bekomen resultaten voor de l-ascorbinezuurdosering duidelijk aantonen dat bij gebruik van de fosfaatoplossing I gemeten moet worden in het gebied van 700-850  $m\mu$  en bij gebruik van de fosfaatoplossing II in het interval 820 tot 830  $m\mu$ .

#### 2.3.5. Invloed van de pH van de testoplossing op de kleurvorming.

De invloed van de waterstofionenconcentratie in de proefoplossingen op de kleurvorming is nagegaan geworden door de vitamine-



Tabel 1. - Absorptiecurve voor de methode met de fosfaatoplossing I. Beckman DU - 10,0 mm glaskuvetten -  
 Blanko : gedistilleerd water.

Golflengte m $\mu$	% Transmissie		% Transmissie gemiddelde
	I	II	
400	47,0	45,8	46,4
450	68,6	66,7	67,7
500	70,2	70,8	70,5
550	64,9	66,0	65,5
600	57,6	59,1	58,4
650	50,0	51,9	51,0
700	46,8	47,1	47,0
750	46,8	47,0	46,9
800	46,9	47,3	47,1
850	47,0	47,2	47,1
900	48,9	48,9	48,9
950	51,0	50,9	51,0
1.000	53,0	53,0	53,0

Tabel 2. - Absorptiecurve voor de methode met de fosfaatoplossing II. Beckman DU - 10,0 mm glaskuvetten -  
 Blanko : gedistilleerd water.

Golflengte m $\mu$	% Transmissie		% Transmissie gemiddelde
	I	II	
400	58,9	58,9	58,9
450	77,1	75,2	76,2
500	69,2	69,2	69,2
550	62,6	62,6	62,6
600	54,8	54,8	54,8
650	47,7	47,1	47,4
700	42,9	42,9	42,9
750	39,8	39,9	39,9
790	37,0	36,9	37,0
800	36,6	36,6	36,6
810	36,0	35,8	35,9
820	35,2	35,2	35,2
830	35,2	35,2	35,2
840	36,7	36,6	36,7
850	36,9	36,9	36,9
860	38,0	38,0	38,0
900	46,0	46,1	46,1
950	50,8	50,9	50,9
1.000	53,7	53,8	53,8

oplossingen te bereiden met behulp van CLARK & LUBS buffers (185). Van een vitamine C stockoplossing, die 200,0 mg l-ascorbinezuur per liter bevat, worden daartoe 10,0 ml afgepipeteerd en aan het mengsel van de buffercomponenten toegevoegd. De maatkolffjes worden daarop aangelengd tot 100,0 ml met gedistilleerd water en de oplossingen worden onderzocht met de snelste techniek. De aflezingen gebeuren met een Pulfrich-Wepho kolorimeter, die uitgerust is met een filter met een werkzaam optisch zwaartepunt bij 750 m $\mu$ .

De resultaten tonen aan, dat de stabiliteit van het l-ascorbinezuur niet meer voldoende groot is in oplossingen met een pH waarde groter dan vier, zodat oplossingen met een pH waarde van vijf en van zes door een toevoeging van 3,5 mg E.D.T.A. moeten gestabiliseerd worden.

Uit de resultaten, die samengevat zijn in tabel 3, blijkt duidelijk dat de waterstofionenconcentratie van de testoplossing geen invloed heeft op de kleurontwikkeling bij pH waarden lager dan 7,0.

#### 2.3.6. Invloed van de verwarmingsduur op de kleurvorming.

Door de verwarmingsduur te verlengen is nagegaan geworden of de vooropgestelde duur van vijf minuten volstaat om de maximale kleurintensiteit te bekomen en zo ja om uit te maken of een verlengde verblijfsduur in het waterbad eventueel een nadelige invloed heeft op de resultaten. De onderzochte oplossingen bevatten 20,0 mg l-ascorbinezuur per liter en zijn klaargemaakt geworden met water, zonder het gebruik van E.D.T.A. of bufferbestanddelen. De metingen zijn uitgevoerd geworden met de Pulfrich-Wepho kolorimeter.

Uit de resultaten volgt, dat een verlenging tot 25 minuten geen merkbare veranderingen op de kleurontwikkeling voor gevolg heeft.

Tabel 3. - Invloed van de pH van de proefoplossing op de kleur-  
vorming.

pH van de oplossing	% Transmissie	Gemiddelde % Transmissie	E.D.T.A.
1,0	26,0 25,8 25,9	25,9	geen
2,0	25,9 26,0 25,9	25,9	geen
3,0	25,5 25,9 25,8	25,7	geen
4,0	26,4 25,9 26,2	26,2	geen
5,0	29,2 28,9 29,0	29,0	geen
5,0	27,1 27,0 26,7	26,9	wel
6,0	38,2 35,0 33,2	35,5	geen
6,0	26,2 25,4 24,5	25,4	wel



wat voldoende is om de kleinere moeilijkheden op te lossen, die eventueel op zouden rijzen bij het onderzoek van de fotochemische reactie. De waarnemingen zijn samengevat in tabel 4.

Tabel 4.- Invloed van de verwarmingsduur op de bekomen kleur bij de analyse van waterige oplossingen.

Verwarmings- duur in minuten	% Transmissie			Gemiddelde % Transmissie
	I	II	III	
5	27,2	27,9	27,4	27,5
10	26,9	27,8	27,5	27,4
15	27,2	27,5	27,8	27,5
20	26,9	27,8	27,5	27,4
25	27,0	27,5	27,4	27,3

#### 2.3.7. Standaardkurve.

Van een voorafgaandelijk gedroogd kristallijn l-ascorbinezuur preparaat p.a. zijn 250,0 mg afgewogen en opgelost geworden. Vooraleer de oplossing aan te lengen met water tot 1.000 ml zijn 3,5 mg E.D.T.A. toegevoegd geworden. Uitgaande van deze stockoplossing zijn vijf verdunningen aangelegd geworden, verdunningen die per liter respectievelijk 2,5 ; 7,5 ; 12,5 ; 17,5 en 22,5 mg l-ascorbinezuur hetzij 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 en 25,0 mg l-ascorbinezuur per liter bevatten. Iedere verdunning is gestabiliseerd geworden met behulp van 3,5 mg E.D.T.A. en is in tweevoud onderzocht geworden met behulp van de snelste techniek. De aflezingen zijn uitgevoerd geworden met behulp van een Pulfrich-Wepho fotoelektrische kolorimeter, die voorzien was van een filter S 75 en 20,0 mm kuvetten en de metingen zijn uitgevoerd geworden ten opzichte van gedistilleerd water.

In het totaal zijn vijf dergelijke reeksen, ieder vertrekend van een nieuwe stockoplossing, onderzocht geworden. De bekomen resultaten zijn samengevat in tabel 5. Hierin stelt  $x_i$  de concentratie voor aan l-ascorbinezuur in mg/liter uitgedrukt,  $y_i$  de bekomen aflezing in % Transmissie,  $\bar{y}_i$  de gemiddelde aflezing in % Transmissie,  $n$  het aantal waarnemingen,  $s$  de standaardafwijking op de enkele bepaling en  $s/\sqrt{n}$  de standaardafwijking op de gemiddelde waarde van het % Transmissie.

Op grond van de wet van Lambert-Beer wordt verwacht dat de betrekking tussen de onafhankelijk veranderlijke  $x$  en de afhankelijk veranderlijke  $z$ , de optische densiteit, zal uitgedrukt worden door de vergelijking :

$$z = bx \quad (1)$$

Daar het vrij onwaarschijnlijk is om een reeks experimenten uit te voeren, waarbij de proeffouten elkander precies opheffen, zal voor een concentratie 0,0 normaal een waarde van  $z$  gevonden worden die niet gelijk is aan 0,0000, zodat het verband tussen de experimentele punten beter beschreven zal worden door de vergelijking :

$$z = a + bx \quad (2)$$

Er dient echter aangestipt te worden, dat het intercept  $a$  binnen de grenzen van de proeffouten aanvaardbaar moet zijn. Is dit niet het geval dan moet aangetoond worden dat de gebruikte blanco een konstante fout voor gevolg had, ofwel dat de wet van Lambert-Beer niet gevolgd wordt.

Tabel 5. - Standaardkurve voor de fosfomolybdeenblauwmethode uitgevoerd met een Pulfrich-Wepho voorzien van een filter S75 en 20,0 mm kuvetten.

$x_i$ (koncentratie mg/liter)	$y_i$ (% Transmissie)		n	s	$\bar{y}_i$ (Gemiddelde % transmissie)	$s/\sqrt{n}$
	hoogste	laagste				
2,5	85,2	84,8	10	0,30	84,96	0,095
5,0	73,5	72,5	10	0,43	73,15	0,136
7,5	63,5	62,0	10	0,60	62,65	0,189
10,0	52,0	51,0	10	0,43	51,60	0,136
12,5	45,0	44,0	10	0,40	44,35	0,126
15,0	38,0	36,9	10	0,57	37,51	0,180
17,5	32,0	31,5	10	0,20	31,78	0,063
20,0	26,2	25,2	10	0,33	25,83	0,104
22,5	22,2	21,5	10	0,26	21,98	0,082
25,0	18,5	17,8	10	0,23	18,21	0,073

Op grond van de waarnemingen moet dus overgegaan worden tot de bepaling van de waarden voor a en b. Daartoe wordt het principe van de kleinste kwadraten aangewend (186). Het invoeren van de waarden a en b in de vergelijking (2) voor een gegeven  $x_i$  met de daarbij gevonden  $z_i$  zal uiteraard niet leiden tot de vergelijking :

$$a + bx_i - z_i = 0 \quad (3)$$

maar wel tot :

$$a + bx_i - z_i = e_i \quad (4)$$

waarin  $e_i$  de fout voorstelt. Voor de kleinst mogelijke waarde van  $\sum e_i^2$  worden de beste waarden bekomen voor a en b. Uit de betrekking  $\sum (a + bx - z)^2$  kan de waarde voor deze twee koëfficiënten berekend worden door het uitwerken van de groep binnen het sommatieteken, het partieel differentieren naar de waarde a en naar de waarde b en deze koëfficiënten daarop te berekenen door de normaalvergelijkingen gelijk te stellen aan nul.

De bekomen normaalvergelijkingen zijn :

$$\sum x(a + bx - z) = 0 \quad (5)$$

en

$$\sum (a + bx - z) = 0 \quad (6)$$

Uit de vergelijking (6) volgt dan de waarde voor de koëfficiënt a.

$$\text{Immers } \sum (a + bx - z) = an + b\sum x - \sum z = 0$$

$$\text{zodat } a = \frac{\sum z - b\sum x}{n} \quad (7)$$

$$\text{of} \quad a = \bar{z} - b\bar{x} \quad (8)$$

Uit de vergelijking (5) volgt anderzijds dat

$$\sum (ax + bx^2 - zx) = 0 \quad (9)$$

$$a\sum x + b\sum x^2 - \sum zx = 0 \quad (10)$$

en door het vervangen van de waarde a door de bekomen uitdrukking in de vergelijking (7) wordt vergelijking (10) gelijk aan :

$$\frac{(\sum z - b\sum x)\sum x + nb\sum x^2 - n\sum zx}{n} = 0 \quad (11)$$

$$(\sum z - b\sum x)\sum x + nb\sum x^2 - n\sum zx = 0 \quad (12)$$

$$\sum z\sum x - b(\sum x)^2 + nb\sum x^2 - n\sum zx = 0 \quad (13)$$

$$b \left[ n\sum x^2 - (\sum x)^2 \right] = n\sum zx - \sum z\sum x \quad (14)$$

$$\text{zodat} \quad b = \frac{n\sum zx - \sum z\sum x}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (15)$$

De noodzakelijke gegevens voor het berekenen van de standaardkurve zijn weergegeven in tabel 6.

Met behulp van deze gegevens kunnen dan de berekeningen uitgevoerd worden voor de bepaling van de waarde a en de waarde b :

$$\begin{aligned} \sum x &= 137,5 \\ \sum xz &= 69,8225 \\ \sum x^2 &= 2.406,25 \end{aligned}$$

Tabel 6. - Gegevens voor het berekenen van de standaardkurve voor de l-ascorbinezuurdosering met de fosfomolybdeenblauwmethode en de Pulfrich-Wepho voorzien van een filter S75 en 20,0 mm kuvetten.

$x_i$ mg/liter	$\bar{y}_i$ % Transmissie	$\log \bar{y}_i$	$z_i$ Optische densiteit	$x_i z_i$
2,5	84,96	1,9292	0,0708	0,17700
5,0	73,15	1,8642	0,1358	0,67900
7,5	62,65	1,7969	0,2031	1,52325
10,0	51,60	1,7126	0,2874	2,87400
12,5	44,35	1,6469	0,3531	4,41375
15,0	37,51	1,5741	0,4259	6,38850
17,5	31,78	1,5022	0,4978	8,71150
20,0	25,83	1,4121	0,5879	11,75800
22,5	21,98	1,3420	0,6580	14,80500
25,0	18,21	1,2603	0,7397	18,49250

Tabel 7. - Referentiepunten voor de berekende kurve.

x in mg/liter	z (optische densiteit)
0,0	- 0,01421
10,0	0,28409
20,0	0,58239

$$\begin{array}{rcl}
 \sum z & = & 3,9595 \\
 \sum x \sum z & = & 544,43125 \\
 (\sum x)^2 & = & 18.906,25 \\
 n & = & 10 \\
 \text{zodat} \quad a & = & - 0,01421 \\
 \text{en} \quad b & = & 0,02983
 \end{array}$$

De optische densiteit  $z$  wordt dus bekomen met behulp van de vergelijking

$$z = - 0,01421 + 0,02983 x \quad (16)$$

Enkele referentiepunten van de berekende standaardkurve worden weergegeven in tabel 7, terwijl de berekende kurve voorgesteld wordt door figuur 6.

De gevonden waarde voor de koëfficiënt  $a$  is dus niet gelijk aan de theoretische waarde 0,0000. Van belang is nu om uit te maken of het verschil in waarde tussen het experimentele intercept en het theoretische intercept op grond van de proeffouten aanvaardbaar is. Dit kan onderzocht worden met behulp van een door YUUDEN (187) uitgewerkte techniek.

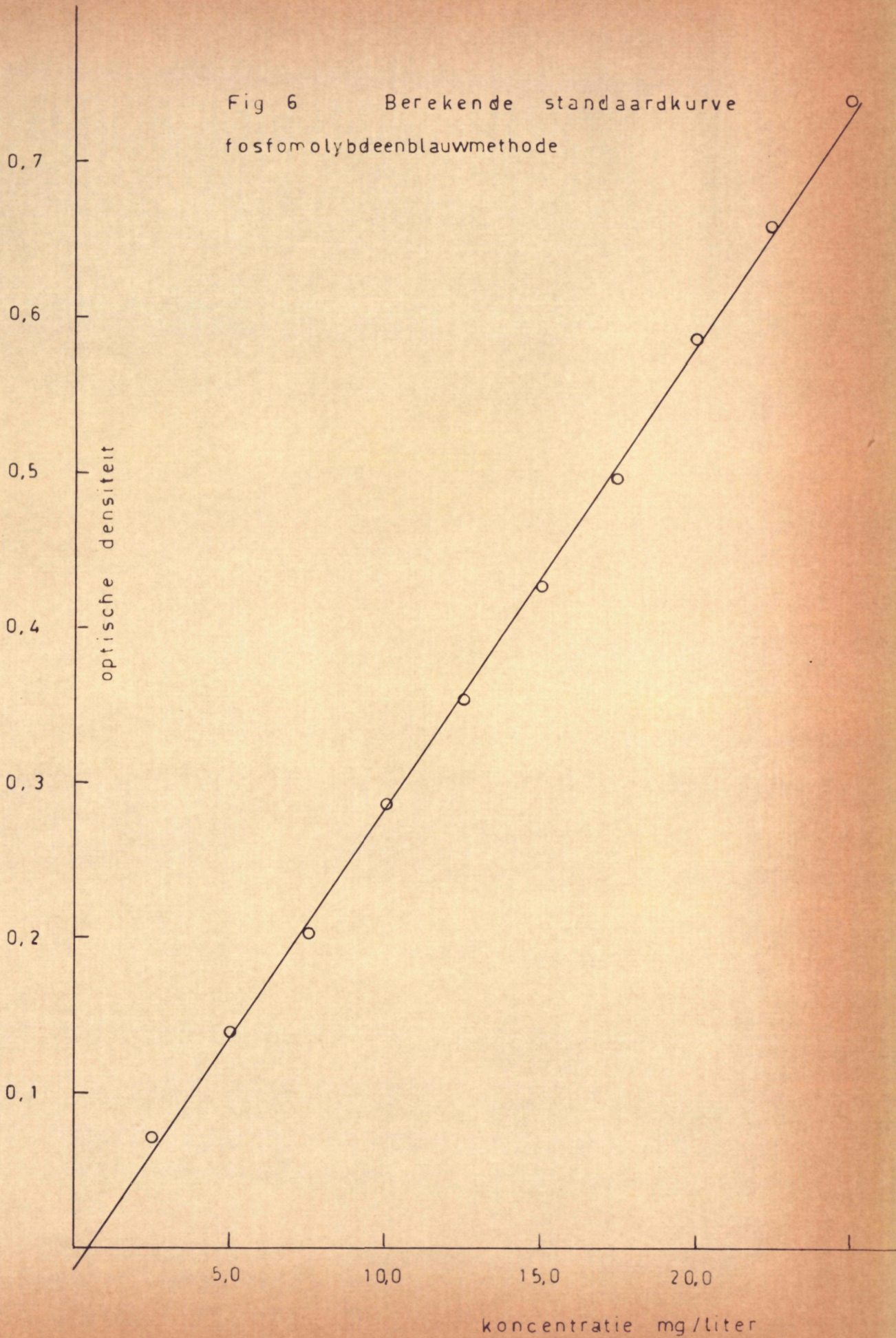
De vergelijking van een rechte doorheen de oorsprong van het assenstelsel is immers gelijk aan :

$$z = bx$$

waarin  $z$  en  $x$  de betekenis hebben van de optische densiteit en van de concentratie aan l-ascorbinezuur, uitgedrukt in mg per liter. De vergelijking van een rechte met een intercept is echter :

$$z = a + bx$$

Fig 6      Berekende standaardkurve  
fosfomolybdeenblauwmethode





In beide gevallen zal de overeenkomst tussen de berekende rechte en de experimentele punten kunnen omschreven worden door de kwadraatsommen van de afwijkingen van de experimentele punten ten opzichte van de rechte, dit in overeenstemming met de methode van de kleinste kwadraten. Verwacht kan worden dat de kwadraatsom van de afwijkingen voor de rechte met een intercept alleszins kleiner is dan de kwadraatsom voor de rechte zonder intercept. Beide kwadraatsommen kunnen dan onderling vergeleken worden met behulp van een variantieanalyse, waaruit dan volgt dat het verschil tussen de kwadraatsommen voor de rechte met een intercept en voor de rechte zonder intercept al dan niet aanvaardbaar is op grond van de proeffouten, met andere woorden al dan niet wezenlijk is.

Voor een rechte zonder intercept wordt de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte weergegeven door de vergelijking :

$$S' = \sum (z - bx)^2 \quad (17)$$

$$S' = \sum \left[ (z - bx)(z - bx) \right] \quad (18)$$

$$S' = \sum (z^2 - 2bxz + b^2x^2) \quad (19)$$

Hieruit wordt dan de partiele afgeleide bepaald naar  $b$  en deze is gelijk aan :

$$2 \sum x (z - bx) \quad (20)$$

zodat de normaalvergelijking gelijk wordt aan

$$\sum x (z - bx) = 0 \quad (21)$$

en 
$$b = \frac{\sum xz}{\sum x^2} \quad (22)$$

Invoeren van de gevonden waarde van  $b$  (22) in de vergelijking (19) en rekening houdend met de voorwaarde weergegeven in de vergelijking (21) geeft, voor de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte zonder intercept de waarde :

$$S' = \sum z^2 - \frac{(\sum xz)^2}{\sum x^2} \quad (23)$$

De kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de berekende rechte met een intercept  $a$  wordt weergegeven door de betrekking :

$$S = \sum (a + bx - z)^2 \quad (24)$$

Na de uitwerking en hergroeperen wordt (24) gelijk aan

$$S = a (an + b \sum x - \sum z) + b(a \sum x + b \sum x^2 - \sum xz) - \sum [z (a + bx - z)] \quad (25)$$

Door het invoeren van de kondities gesteld door de normaalvergelijkingen (5) en (6) worden de twee eerste termen gelijk aan nul, zodat

$$S = - \sum [z (a + bx - z)] \quad (26)$$

$$S = \sum z^2 - a \sum z - b \sum xz \quad (27)$$

In de vergelijking (27) kunnen de waarden  $a$  en  $b$  vervangen worden door hun uitdrukking in  $x$  en  $z$  zoals weergegeven in (7) en (15).

$$S = \sum z^2 - \frac{(\sum z - b \sum x)(\sum z)}{n} - \frac{(\sum xz - \bar{x} \sum z)(\sum xz)}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x} \quad (28)$$

Dit wordt na het uitwerken gelijk aan

$$S = \sum z^2 - \frac{(\sum z)^2}{n} + b\bar{x} \sum z - \frac{(\sum xz - \bar{x} \sum z)(\sum xz)}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x} \quad (29)$$

Het opnieuw vervangen van de waarde b in vergelijking (29) door de uitdrukking in x en z (15) levert dan de betrekking op :

$$S = \sum z^2 - \frac{(\sum z)^2}{n} + \frac{(\sum xz - \bar{x} \sum z)(\bar{x} \sum z) - (\sum xz - \bar{x} \sum z)(\sum xz)}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x} \quad (30)$$

$$\text{of } S = \sum z^2 - \frac{(\sum z)^2}{n} - \frac{(\bar{x} \sum z)^2 - 2\bar{x} \sum xz \sum z + (\sum xz)^2}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x} \quad (31)$$

In deze vergelijking is het deeltal van de laatste term echter een merkwaardig produkt van de vorm  $(a - b)(a - b) = a^2 - 2ab + b^2$ , zodat (31) gelijk is aan :

$$S = \sum z^2 - \frac{(\sum z)^2}{n} - \frac{(x \sum z - \sum xz)^2}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x} \quad (32)$$

Met behulp van de gegevens uit tabel 6 en met de vergelijkingen (23) en (32) wordt het mogelijk om de beide kwadraatsommen te berekenen.

Immers men vindt voor

$\sum z^2$	=	2,0269
$\sum x^2$	=	2.406,25
$(\sum x)^2/n$	=	1,5678
$(\sum zx)^2$	=	4.875,1815
$\sum x$	=	137,5
n	=	10
$\bar{x}$	=	13,75

zodat	$S'$	=	0,0009
en	$S$	=	0,0004

In overeenstemming met hetgeen mag verwacht worden, is in dit geval  $S'$  groter dan  $S$ . Beide gegevens kunnen nu vergeleken worden met behulp van een variantieanalyse. Hierbij dient rekening gehouden te worden met het feit dat de  $n$  experimentele punten in de kwadraatsom  $S'$  aanleiding gegeven hebben tot  $n - 1$  vrijheidsgraden, daar alleen de waarde van de koëfficiënt  $b$  aan de hand van deze gegevens berekend geworden is. Bij de kwadraatsom  $S$  echter zijn voor de  $n$  waarnemingen slechts  $n - 2$  vrijheidsgraden voorhanden, daar uit de experimentele punten de koëfficiënten  $a$  en  $b$  berekend geworden zijn. De variantieanalyse is samengevat in tabel 8 en toont duidelijk aan dat het verschil tussen de experimentele waarde voor het intercept en de theoretische waarde, nul, niet zonder meer aanvaardbaar is op grond van de proeffouten.

Het voorkomen van een intercept kan een gevolg zijn van :

a) het optreden van een konstante fout door een absorptie van het licht door de blanco, door het oplosmiddel of de reaktieven in de proefoplossing ;

b) het niet op een rechte liggen van de experimentele punten.

Bij een nauwkeurig nagaan van de ligging van de experimentele punten ten opzichte van de berekende rechte valt de groepering op van de afwijkingen met dezelfde zin. Beginnende bij een concentratie nul en voortgaande in de zin van de hoogste concentratie wordt vastgesteld

dat :

- punt 1 en 2 : gelegen zijn boven de rechte  
 punt 3 : gelegen is onder de rechte  
 punt 4 : gelegen is op de rechte  
 punt 5, 6 en 7 : gelegen zijn onder de rechte  
 punt 8, 9 en 10 : gelegen zijn boven de rechte.

Tabel 8. - Variantieanalyse voor de kwadraatsommen  $S'$  (zonder) en  $S$  (met een intercept).

H <sub>0</sub> hypothese : experimenteel intercept is niet wezenlijk verschillend van het theoretische intercept.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadraatsommen	Variantie	F(berekend)
Reduktie door intercept	1	0,0005	0,0005	10,0 <sup>32</sup>
Lijn met intercept	8	0,0004	0,00005	
Lijn zonder intercept	9	0,0009		
F theoretisch met 1 en 8 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans 5,32 1 % overschrijdingskans 11,26				

Afgezien van punt 4 wordt de verdeling boven/onder/boven verkregen, verdeling die karakteristiek genoemd mag worden voor een geval waarbij het verband tussen de onafhankelijk veranderlijke en de afhankelijk veranderlijke niet door een lineaire betrekking beschreven wordt

Daar de experimentele waarden, die aangewend zijn bij de berekening van de betrekking, afkomstig zijn van een reeks van 10 waarnemingen, is het volgens YOUDEN (187) mogelijk om de overeenkomst tussen de experimentele gegevens en de berekende rechte statistisch te testen. Enerzijds is de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de best aangepaste rechte reeds bepaald geworden. Anderzijds kan een schatting gebeuren van de nauwkeurigheid van de bepaling van de experimentele punten op grond van de spreidingsbreedte binnen iedere reeks van de waarnemingen. Beide schattingen van de proeffouten kunnen onderling vergeleken worden met de variantieanalyse. De schatting van de variantie met behulp van de spreidingsbreedte wordt uitgevoerd met behulp van de gegevens uit tabel 5. De  $y_i$  waarden dienen daarvoor eerst omgezet te worden tot hun logaritme en het verschil tussen de hoogste en laagste logaritmische waarde stemt overeen met het verschil in optische densiteit. Deze gegevens zijn samengevat in tabel 9. Wanneer  $w$  de spreidingsbreedte voorstelt in de optische densiteit, dan wordt de variantie gelijk aan :

$$D = \frac{\sum w^2}{10n}$$

waarin  $n$  het aantal waarnemingsreeksen voorstelt en  $10$  het aantal waarnemingen per reeks. Het aantal vrijheidsgraden is in dit geval gelijk aan  $n$ . Uit de gegevens van tabel 9 wordt berekend dat  $D = 0,0000135$  en de variantieanalyse is weergegeven in tabel 10. Daar de berekende  $F$  waarde ruimschoots de theoretische waarde met  $1\%$  overschrijdingskans overtreft, wordt de mogelijkheid, dat de afwijkingen tussen de experimentele punten en de berekende rechte aanvaardbaar zijn binnen het kader van de proeffouten, niet weerhouden. Twee mogelijke verklaringen kunnen dan, volgens YOUDEN (187), voor deze situatie gegeven worden.

Tabel 9.- Gegevens voor het berekenen van de variantie, D, op grond van de spreidingsbreedte, w.

$x_i$	$\log y_i$	$\log y_2$	w	$w^2$
2,5	1,9304	1,9269	0,0035	0,00001225
5,0	1,8686	1,8603	0,0083	0,00006889
7,5	1,8028	1,7924	0,0104	0,00010816
10,0	1,7160	1,7076	0,0084	0,00007056
12,5	1,6532	1,6425	0,0107	0,00011449
15,0	1,5792	1,5670	0,0128	0,00016384
17,5	1,5051	1,4983	0,0068	0,00004624
20,0	1,4183	1,4014	0,0169	0,00028561
22,5	1,3464	1,3324	0,0140	0,00019600
25,0	1,2872	1,2504	0,0168	0,00028224

Tabel 10.- Variantieanalyse

H <sub>0</sub> hypothese : de afwijkingen van de experimentele punten ten opzichte van de berekende rechte vallen binnen de grenzen van de proeffouten.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadraat-som	Variantie	F(berekend)
Lijn met intercept	8	0,0004	0,00005	37,03 <sup>**</sup>
Herhalingen	10	0,0000135	0,00000135	
F theoretisch met 8 en 10 vrijheidsgraden en				
5 % overschrijdingskans 3,07				
1 % overschrijdingskans 5,06				

De eerste mogelijkheid voor dergelijke toestand zou in het leven geroepen worden, wanneer de herhalingen binnen de reeksen een vals beeld geven van de nauwkeurigheid. Dit zou het geval kunnen zijn, wanneer uitgegaan wordt van één enkele standaardoplossing voor alle waarnemingen van een gegeven reeks. De gevolgde proefopzet sluit echter een dergelijke te hoge analyzenauwkeurigheid volledig uit.

De tweede verklaring van de vastgestelde situatie is te vinden in het feit dat de beste benadering voor het verband tussen de onafhankelijke en de afhankelijke veranderlijke niet gegeven wordt door een rechte in een lineair assenstelsel.

Wanneer derhalve de methode met het fosfomolybdeenblauw gebruikt wordt voor het doseren van het l-ascorbinezuur en de metingen uitgevoerd worden bij 750 m $\mu$  en met behulp van een fotoelektrische kolorimeter zullen de beste resultaten bekomen worden, wanneer gebruik gemaakt wordt van een experimentele standaardkurve. Deze kurve wordt weergegeven in figuur 7. Voor meerdere informaties ten aanzien van het gebruik van deze techniek bij de aanwending van diverse extractiemiddelen en dergelijke wordt verwezen naar een reeds verschenen mededeling (188).

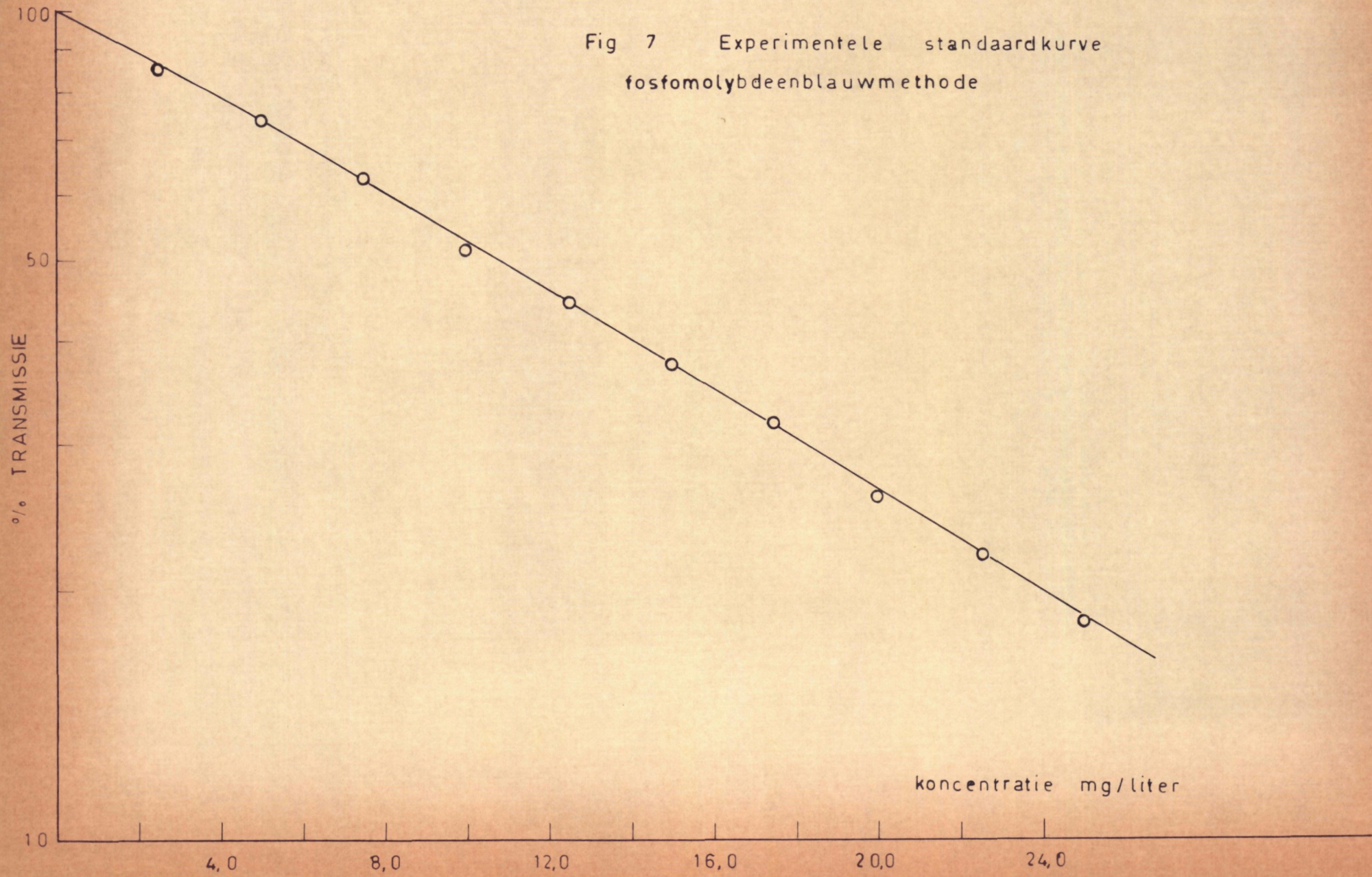
#### 2.4. Koppelingsreacties.

Deze methodes steunen op de vorming van een gekleurde verbinding door de reactie van het reagens met het l-ascorbinezuur of een afbraakprodukt, dat onder gecontroleerde voorwaarden uit het l-ascorbinezuur gevormd wordt.

In het algemeen leidt een dergelijke techniek tot een methode met een veel grotere specificiteit dan mogelijk is bij de redoxmethodes, maar uiteraard vergen de analyses veel meer tijd en



Fig 7 Experimentele standaardkurve  
fosfomolybdeenblauwmethode



zijn de behandelingen van meer complexe aard.

Al naar gelang het gebezigde reaktief kan een onderscheid gemaakt worden tussen de methodes. Enerzijds steunen een grote groep onderzoeken op het gebruik van de koppelingsreactie met het 2,4-dinitrofenylhydrazine en anderzijds worden sedert enkele tijd diazoniumzouten aangewend als reagens.

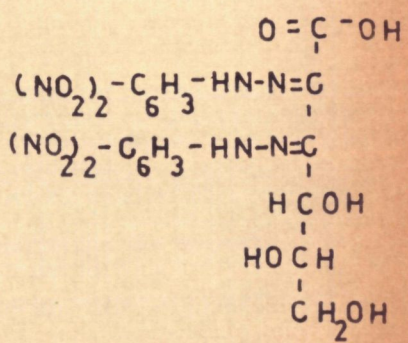
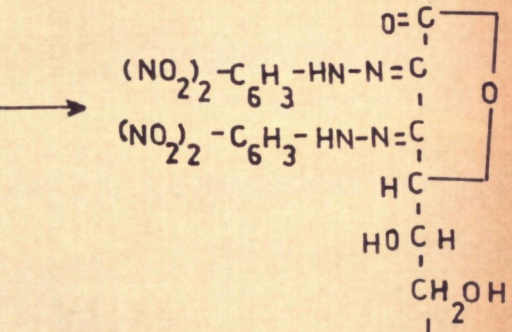
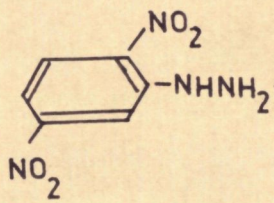
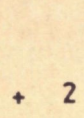
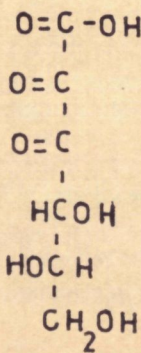
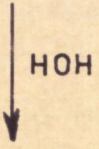
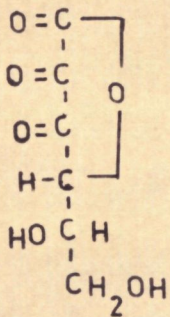
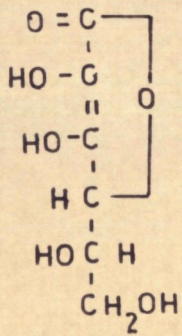
#### 2.4.1. Het 2,4-dinitrofenylhydrazine als reagens.

##### 2.4.1.1. Principe.

Het gebruik van het 2,4-dinitrofenylhydrazine als reaktief voor de kwantitatieve dosering van het l-ascorbinezuur steunt op de onderzoeken van PENNY & ZILVA (189, 190), die als basis fungeerden voor de uitwerking van een doseringsmethode voor het l-ascorbinezuur door ROE en medewerkers (191, 192, 193, 194, 195), methode, die onder diverse modifikaties, veelvuldige toepassing vindt en waarvan de voorkomende reacties in het schema van figuur 8 weergegeven zijn.

Onder zachte kondities wordt het l-ascorbinezuur omgezet tot het dehydro-l-ascorbinezuur, waarbij als oxydans gebruik gemaakt wordt van broomwater (157), droog norit (195) of een noritsuspensie in azijnzuur (196). Zowel het dehydro-l-ascorbinezuur als het 2,3-diketo-l-gulonzuur reageren met het 2,4-dinitrofenylhydrazine onder de vorming van een osazon. Het uitgekristaliseerde osazon wordt geëxtraheerd met behulp van een zwavelzuuroplossing van 65 % (196), een zwavelzuuroplossing van 85 % (160), gekoncentreerd zwavelzuur (45), ijsazijn (197) of ethanol (198). Gedurende het oplossen ondergaat het osazon een moleculaire omschakeling waarbij de vorming van een stabiel rood-bruin gekleurd produkt tot stand komt.

FIG 8 REAKTIESCHEMA VOOR DE DOSERING VAN HET  
L - ASCORBINEZUUR MET HET 2,4 - DINITROFENYLHYDRAZINE



De vereiste lange reaktieduur is een eerste belangrijk nadeel voor het toepassen van deze methode in het onderzoek van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur. De koppelingsreactie tussen het 2,3-diketo-l-gulonzuur en het 2,4-dinitrofenylhydrazine vergt zes uur bij een reactie temperatuur van 37° C. Op dit moment is de reactie tussen het dehydro-l-ascorbinezuur en het reaktief nog maar voor 95 % doorgegaan, maar de reaktieduur kan in de aanwezigheid van l-ascorbinezuur niet verlengd worden, daar een reactie tussen deze **komponent** en het reagens de dosering merkbaar begint te beïnvloeden. Een inkorten van de reaktieduur tot drie uur is mogelijk, in bepaalde gevallen zelfs zonder het aanwenden van de ontworpen korrektieformules. Door het opdrijven van de reaktietemperatuur tot op 57,5° C zijn GESCHWIND & medewerkers (192) er in geslaagd de reaktieduur te beperken tot 45 minuten, terwijl SCHAFFERT & KINGSLEY (200) beweren dat de reaktieduur herleid kan worden tot op 5 tot 10 minuten, wanneer de temperatuur opgedreven wordt tot 100° C. Merkwaardig genoeg zou het 2,3-diketo-l-gulonzuur onder deze omstandigheden niet meer reageren. Dit resultaat is echter nog niet aan een **nader** onderzoek onderworpen geworden.

Een tweede belangrijke nadeel voor het aanwenden van deze techniek in het onderzoek van de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur is het feit dat de afzonderlijke kwantitatieve bepaling van de drie componenten ook drie doseringen vereist, waarbij achtereenvolgens bepaald worden :

1. de som van het l-ascorbinezuur, het dehydro-l-ascorbinezuur en het 2,3-diketo-l-gulonzuur na de behandeling met een oxydans,
2. de concentratie aan 2,3-diketo-l-gulonzuur na de reductie,

3. de som van het dehydro-1-ascorbinezuur en het 2,3-diketo-1-gulonzuur.

Niet zo zeer het feit dat ten minste de dosering (1) en (3) uitgevoerd dienen te worden om de concentratie aan het l-ascorbinezuur vast te stellen is de hoofdoorzaak voor het afwijzen van deze techniek, maar wel de vaststellingen van TOBIAS & HERREID (125) en van DE VLEESCHAUWER & medewerkers (45). Bij de analyse van melk hebben deze onderzoekers vastgesteld, dat de dosering (3) niet slaagde. Een andere bemerking is afkomstig van LEVENSON & medewerkers (201) en betreft de dosering (2). Deze onderzoekers menen dat een 100 % reductie van het aanwezige dehydro-1-ascorbinezuur onder de aangegeven werkvoorwaarden weinig waarschijnlijk is.

Deze vaststellingen in verband met de reaktieduur en in verband met de onzekerheid van tot een juiste dosering van het l-ascorbinezuur te komen, hebben er toe geleid deze methode uit te schakelen voor het onderzoek van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur. Daar deze techniek veruit de meest verspreide kolorimetriscche methode is (202, 203, 204, 205, 206) wordt hier alleen de standaardkurve weergegeven, zodat de andere kolorimetriscche technieken eventueel met deze werkwijze kunnen vergeleken worden vanuit het standpunt van de gevoeligheid.

#### 2.4.1.2. Reagentia.

Trichloorazijnzuuroplossing van 4 % :

40 g trichloorazijnzuur p.a. worden opgelost en aangelengd met gedistilleerd water tot 1.000 ml.

Norit :

vereist is een ijzervrij preparaat.

Thioureum p.a.

Zwavelzuuroplossing ongeveer 9 N :

250 ml gekoncentreerd zwavelzuur p.a. worden opgelost in ongeveer 500 ml water en na afkoeling aangelengd tot 1.000 ml met water.

2,4-dinitrofenylhydrazine reagens :

1.000 mg van het reaktief worden opgelost in zwavelzuur van 9 N en aangelengd met dit reaktief tot 50,0 ml.

Stockoplossing l-ascorbinezuur :

150,0 mg van het voorafgaandelijk gedroogd kristallijn l-ascorbinezuur p.a. worden afgewogen, opgelost in en aangelengd tot 500,0 ml met gedistilleerd water.

Verdunde stockoplossing en testoplossingen :

Uit de stockoplossing worden 100 ml afgepipeteerd in een maatkolf van 1.000 ml en aangelengd tot de merkstreep met water. De concentratie van deze oplossing bedraagt 30,0 mg l-ascorbinezuur per liter en uitgaande van deze oplossing worden verder proefoplossingen met 6,0 ; 12,0 ; 18,0 en 24,0 mg l-ascorbinezuur per liter klaargemaakt en onderzocht.

#### 2.4.1.3. Modus operandi.

Aan 20,0 ml testoplossing worden 20,0 ml van de 4 % tri-chloorazijnzuuroplossing toegevoegd en vervolgens 2 g norit. Het geheel wordt goed geschud en na 10 minuten rusten wordt de oplossing gefiltreerd doorheen een ploofilter. Het filtraat wordt opgevangen in een erlenmeyer, waarin voorafgaandelijk ongeveer 0,2 g thioureum worden gebracht. Van het bekomen filtraat worden 5,0 ml afgepipe-

teerd en in een geschikte recipient gemengd met 1,0 ml van het 2,4-dinitrofenylhydrazinereactief. Het geheel wordt gedurende 3 uur bewaard in een waterbad op 37° C en vervolgens wordt de recipient afgekoeld in een ijsbad. Terwijl de proef gekoeld wordt, laten druppelsgewijze 10,0 ml gekoncentreerd zwavelzuur toevloeien uit een buret. De proef wordt daarop gedurende 30 minuten bewaard bij kamertemperatuur en vervolgens uitgemeten ten opzichte van een specifieke blanco met behulp van de Pulfrich-Wepho fotoelektrische kolorimeter voorzien van een filter S 53 en 20,0 mm kuvetten. De blanco is bekomen geworden door de analyse toe te passen op gedistilleerd water.

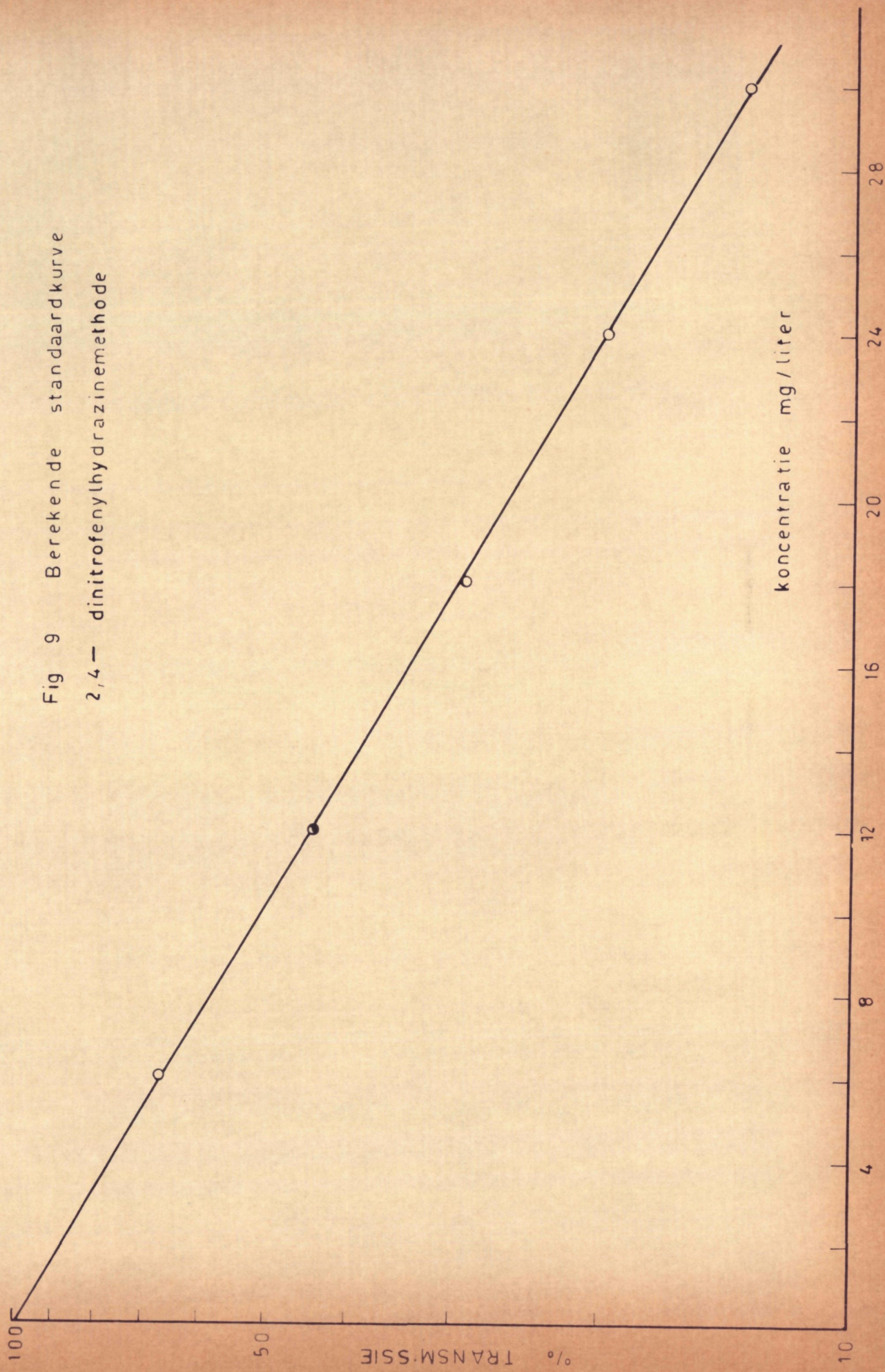
#### 2.4.1.4. Standaardkurve.

De bekomen resultaten zijn weergegeven in tabel 11. Hieruit is met behulp van de methode van de kleinste kwadraten de best aangepaste rechte berekend geworden. Enkele referentiepunten zijn weergegeven in tabel 12 en de berekende standaardkurve en de experimentele punten worden voorgesteld in figuur 9.

Tabel 11.- Berekende standaardkurve voor de l-ascorbinezuurdosering met de 2,4-dinitrofenylhydrazinemethode, uitgemeten op de Pulfrich-Wepho.

$x$ mg/liter	$\bar{y}_i$ % transmissie	$z_i (= \log y_i)$	$x_i z_i$	$z_i^2$
6.0	66,9	1,8254	10,9524	3,332085
12.0	44,1	1,6444	19,7328	2,704051
18.0	29,1	1,4699	26,3502	2,143003
24.0	19,8	1,2967	31,1208	1,681401
30.0	13,5	1,1303	33,9090	1,277578

Fig 9 Berekende standaardkurve  
2,4- dinitrofenylhydrazinemethode





$\sum x$	=	90,0
$\sum xz$	=	122,0652
$\sum x^2$	=	1.980,0
$\sum z$	=	7,3607
$\sum x \sum z$	=	662,4630
$(\sum x)^2$	=	8.100,0
n	=	5

zodat	a	=	1,9924
en	b	=	- 0,0289

De absorptie in % transmissie wordt dan ook uitgedrukt door de vergelijking :

$$\log \% \text{ transmissie} = 1,9924 - 0,0289 x$$

Tabel 12.- Referentie punten voor de berekende rechte voor de 2,4-dinitrofenylhydrazinemethode

x in mg/liter	y in % transmissie
0,0	98,3
10,0	50,5
20,0	26,0

#### 2.4.2. Diazoniumzouten als reagens.

##### 2.4.2.1. Principe van de methode.

In 1953 hebben SCHMALL & medewerkers (207,208) voor het eerst gebruik gemaakt van een nieuw type reagens voor de dosering

van het l-ascorbinezuur. Er is vastgesteld geworden dat het gediazoteerde 4-methoxy-2-nitro-aniline met het l-ascorbinezuur reageert en dat het eindprodukt in alkalisch midden een kolorimetrische dosering mogelijk maakt. Het gebruik van dit reaktief is uitvoerig bestudeerd geworden door CROSSLAND (209) en deze onderzoeker is tot de vaststelling gekomen, dat de gevoeligheid van de voorgestelde methode vaak te laag uitvalt voor de analyse van natuurlijke produkten. Ook in melk is de concentratie aan l-ascorbinezuur te gering om een dosering met behulp van een klein volume door te voeren, zodat een modifikatie ontwikkeld geworden is. Tot nu toe is alleen een storing bij deze techniek vastgesteld geworden door flavonen (210).

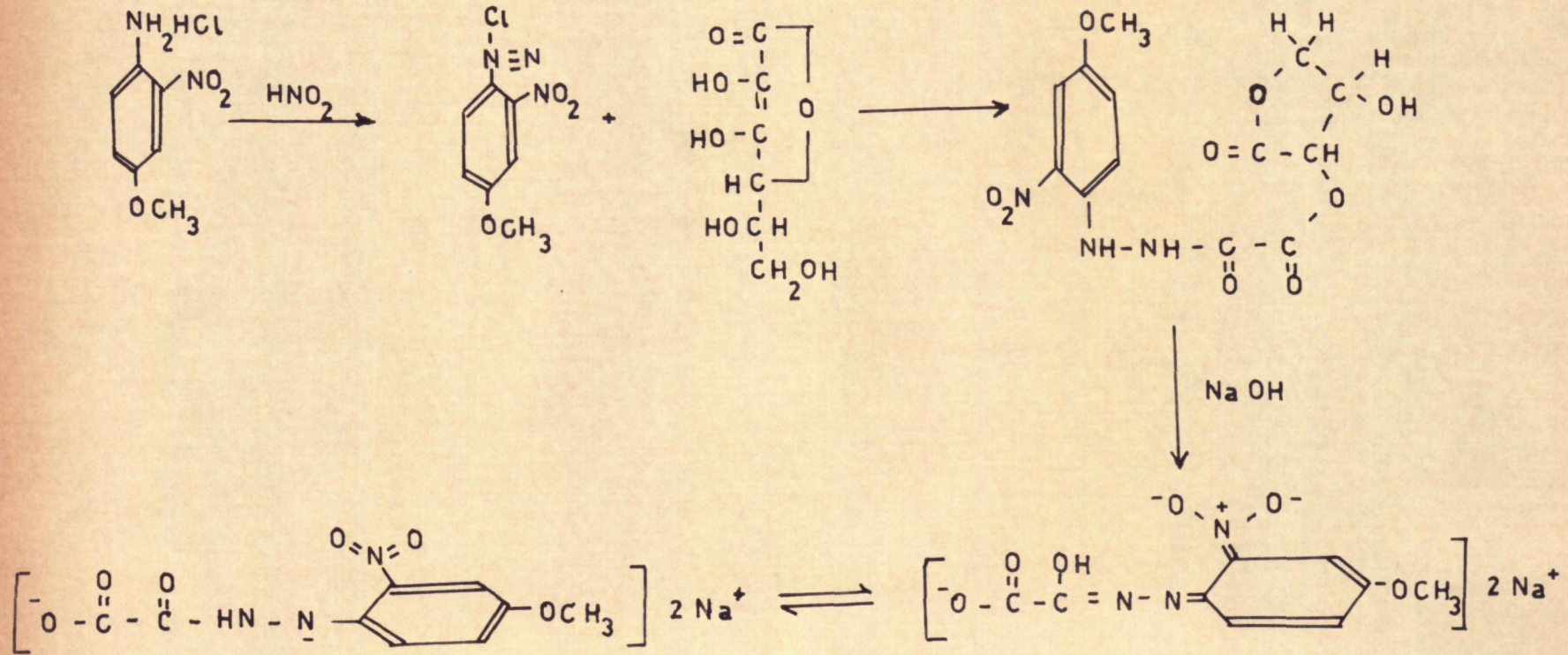
Ook andere genitreeerde verbindingen zijn onderzocht geworden op hun eventueel gebruik als reagens voor de dosering van het l-ascorbinezuur. HIROYASU & medewerkers (211) en MOOR (212, 213) hebben het nitro-aniline onderzocht en TSUNEMATSU & medewerkers (214) het 2,4-dinitrobenzoezuur. Achtereenvolgens worden thans de resultaten behandeld die in de loop van dit onderzoek zijn bekomen geworden met behulp van het reaktief van SCHMALL en met behulp van het reagens beschreven door MOOR.

#### 2.4.2.2. De 4-methoxy-2-nitroanlinemethode.

Daar de onderzoekingen met dit reaktief terzelfdertijd doorgevoerd worden zijn als deze met het 2-nitroaniline, en daar vrij vlug aan het licht kwam, dat het laatst genoemde reagens tot heel wat interessantere gegevens leidde, zijn deze experimenten niet tot het einde toe doorgevoerd geworden. Het is derhalve niet uitgesloten, dat de voorgestelde modifikatie niet volledig onderzocht worden is op haar mogelijkheden. Het reaktieschema wordt weergegeven in figuur 10.

FIG 10 REAKTIESCHEMA VOOR DE DOSERING VAN HET L-ASCORBINEZUUR

MET DIAZONIUMZOUTEN



## 2.4.2.2.1. Reagentia.

## Aminoreagens :

500,0 mg 4-methoxy-2-nitroaniline worden opgelost in 125,0 ml ijsazijn p.a. en worden aangelengd tot 250,0 ml met een zwavelzuuroplossing van 10 %.

## Nitrietreagens :

200 mg kaliumnitriet p.a. worden opgelost in en aangelengd met gedistilleerd water tot 100,0 ml.

## IJsazijn p.a.

## Zwavelzuuroplossing 10 %:

100 g zwavelzuur p.a. worden opgelost in ongeveer 500 ml gedistilleerd water en, na afkoelen tot op kamertemperatuur, verder aangelengd met water tot 1.000 ml.

## Ethanol p.a.

## Natriumhydroxydeoplossing :

100 g natriumhydroxyde p.a. worden opgelost in nagenoeg 500 ml gedistilleerd water en na het afkoelen van de oplossing tot op kamertemperatuur verder aangelengd met water tot 1.000 ml.

## Gekombineerd reaktief :

In een maatkolfje van 100 ml worden 1,25 ml van het aminoreagens gebracht en het kolfje wordt in een ijsbad geplaatst. Daarna worden 1,25 ml nitrietoplossing druppelsgewijze toegevoegd. Er ontstaat een oranje-rode kleur en de oplossing wordt geschud tot deze kleur overgegaan is in een lichtgele tint. Daarop wordt de oplossing

aangelengd met ethanol. Deze oplossing van het reaktief dient in het ijsbad bewaard te worden en de stabiliteit is zeer gering, zodat deze oplossing slechts klaar gemaakt wordt op het moment dat het reagens direkt gebruikt kan worden.

Stock- en testoplossingen van het l-ascorbinezuur :

Uitgaande van een voorafgaandelijk gedroogd kristallijn l-ascorbinezuurpreparaat p.a. worden deze oplossingen gemaakt met behulp van gedistilleerd water.

#### 2.4.2.2.2. Modus operandi.

Van de te onderzoeken waterige oplossing worden 5,0 ml afgepipeteerd in een grote proefbuis die voorzien is van een ingeslepen stop. Hieraan worden 15,0 ml van het gekombineerd reaktief toegevoegd en het geheel wordt gedurende 30 minuten bewaard in een ijsbad. Van deze koude oplossing worden 10,0 ml overgebracht in een tweede proefbuis, eveneens voorzien van een ingeslepen stop, en er worden 5,0 ml van de natriumhydroxydeoplossing toegevoegd. Het geheel wordt krachtig geschud en gedurende 15 minuten bewaard bij 0° C. Daarna wordt de oplossing op kamertemperatuur gebracht door het onderdompelen in een waterbad, de gekleurde oplossing wordt overgebracht in een kuvet met een lichtpad van 50,0 mm en de oplossing wordt uitgemeten ten opzichte van een specifieke blanco in een Beckman DU spectrofotometer bij 570 m $\mu$ . De blanco wordt bekomen door de analyse toe te passen op water.

#### 2.4.2.2.3. Voorlopige standaardkurve.

De bekomen resultaten zijn vervat in tabel 13. Met behulp van deze gegevens kan berekend worden dat :

	$(\sum x_i)^2$	=	14.113,44
	$\bar{x}_i$	=	14,85
	$\sum z_i$	=	11,4154
	$\sum z_i^2$	=	16,5093
	n	=	8
	$\sum x_i \sum z_i$	=	163,743
zodat	a	=	1,9972
en	b	=	- 0,0381

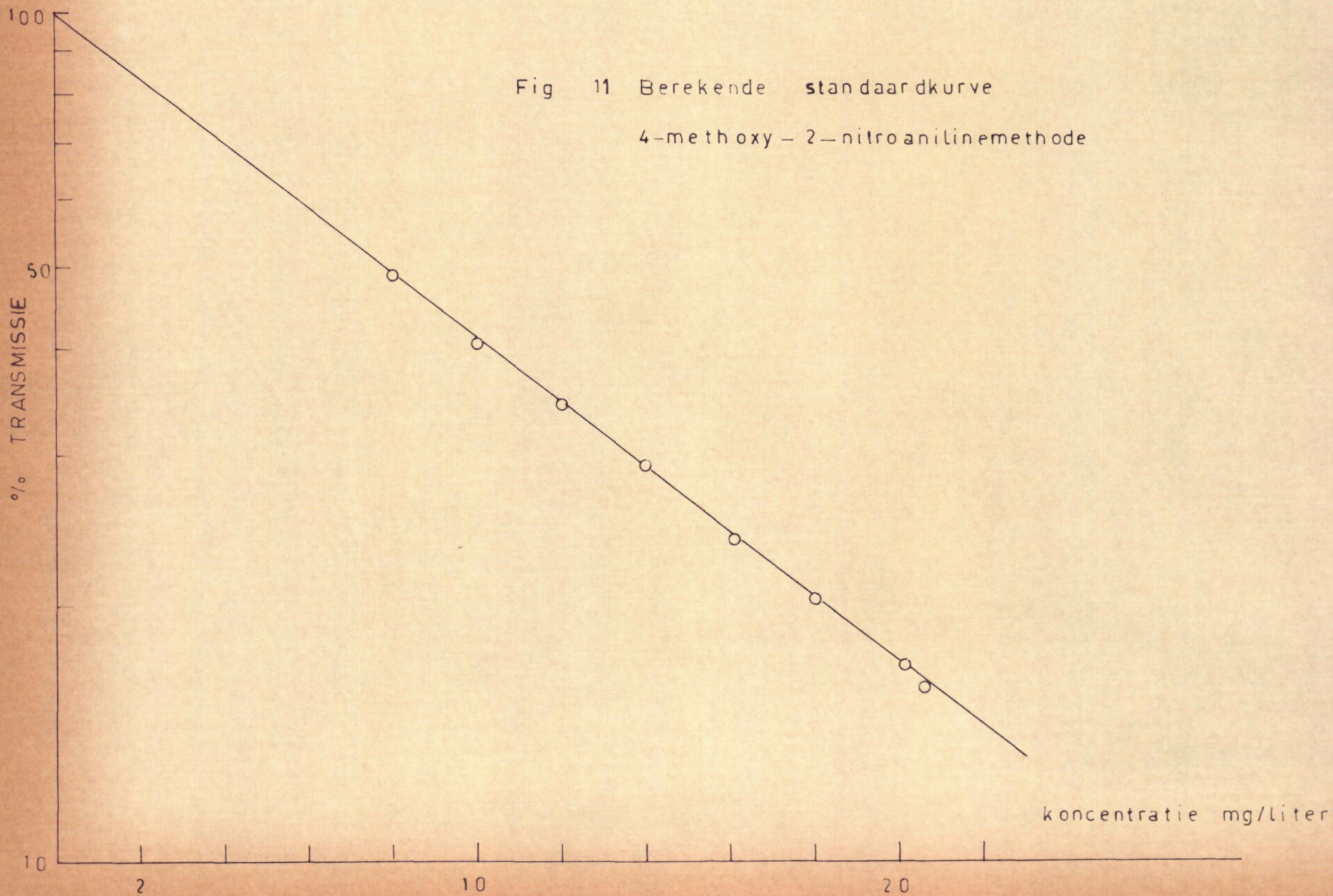
Het % transmissie kan derhalve berekend worden met behulp van de vergelijking :

$$\log y_i = 1,9972 - 0,0381 x_i$$

Enkele referentiepunten zijn weergegeven in tabel 14 en de berekende rechte wordt samen met de gemiddelde experimentele waarden voorgesteld in figuur 11.

Met deze techniek zijn echter bepaalde moeilijkheden onder-  
vonden geworden. Vaak treedt in de gekleurde oplossingen een troebel  
op, zodat niet ieder experiment tot een resultaat leidt. Een soepel  
werkschema lijkt al evenmin gemakkelijk te verwezenlijken, zodat in  
het kader van het geplande onderzoek deze techniek verlaten worden  
is ten voordele van de methode met het 2-nitroaniline. Wel kan aan-  
gestipt worden, dat de gevolgde werkwijze een belangrijke **verhoging**  
van de gevoeligheid voor gevolg had. Volgens de vroegere onder-  
zoekingen met behulp van het 4-methoxy-2-nitroaniline kan de analyse  
slechts doorgevoerd worden wanneer tussen 500 en 2.000 mikrogrammen

Fig 11 Berekende standaardkurve  
4-methoxy - 2-nitroanilinemethode



Tabel 13. - Gegevens voor het opstellen van de standaardkurve voor de dosering van het 1-ascorbinezuur met behulp van gediazoteerd 4-methoxy-2-nitroaniline, Beckman DU spektrofotometer uitgerust met 50,0 mm kuvetten, golflengte 570 m $\mu$ .

$x_i$ mg/liter	$\bar{y}$ % transmissie	$z_i$ (= $\log \bar{y}_i$ )
8,0	48,8	1,6884
10,0	40,6	1,6085
12,0	34,4	1,5366
14,0	29,2	1,3766
16,1	23,8	1,3766
18,0	20,2	1,3054
20,1	17,0	1,2904
20,6	16,0	1,2041

Tabel 14. - Berekende referentiepunten voor de standaardkurve voor het 4-methoxy-2-nitroanilinereaktief.

$x_i$ (mg/liter)	$y_i$ (% transmissie)
0,0	99,4
10,0	41,3
20,0	17,2



l-ascorbinezuur voorhanden zijn. In de hier beschreven modifikatie dienen maximaal slechts 100 mikrogrammen aanwezig te zijn.

#### 2.4.2.3. De 2-nitroanilinemethode.

Volgens de originele voorschriften uitgevoerd zou deze methode in snelheid in belangrijke mate te kort schieten, daar niet minder dan drie opeenvolgende zuiveringsextrakties voorzien zijn. Er is echter uitgemaakt geworden, dat deze extrakties zowel voor het onderzoek van waterige oplossingen als voor het onderzoek van melk achterwege mogen gelaten worden (215). Hierdoor wordt de analyseduur in belangrijke mate ingekort en kan een soepel werkschema ontwikkeld worden voor de analyse van bestraalde waterige oplossingen.

##### 2.4.2.3.1. Reagentia.

Metafosfoorzuur :  
20 % gewicht/volume

Metafosfoorzuur :  
1 % gewicht/volume

Natriumnitrietoplossing :  
0,08 % gewicht/volume

Natriumhydroxydeoplossing :  
2 % gewicht/volume

o-Nitro-anilineoplossing  
400,0 mg van het preparaat worden afgewogen en opgelost in 20,0 ml ijsazijn. Het geheel wordt aangelengd tot 250,0 ml met

een chloorwaterstofzuuroplossing van ongeveer 3 N.

n-Butanol p.a.

Ethanol p.a.

IJsazijn p.a.

Alkoholmengsel :

één volume n-butanol wordt gemengd met één volume ethanol.

Chloorwaterstofzuuroplossing :

een oplossing die ongeveer 3 N is wordt klaar gemaakt door 258 ml chloorwaterstofzuur p.a. met een densiteit van 1,19 op te lossen in en aan te lengen met gedistilleerd water tot 1.000,0 ml.

Diazoreagens :

één ml van de 2-nitro-anilineoplossing wordt gemengd met één ml van de natriumnitrietoplossing en met twee ml van het alcoholmengsel. Deze oplossing is niet stabiel en moet direkt verder verwerkt worden.

Stockoplossing van het l-ascorbinezuur :

200,0 mg van een gedroogd, kristallijn preparaat p.a. worden afgewogen, opgelost in en aangelengd met metafosfoorzuur 1 % tot 1.000,0 ml.

2.4.2.3.2. Modus operandi.

Van een geschikte verdunning, opgemaakt uit de stockoplossing met behulp van de metafosfoorzuuroplossing van 1 %, worden

30,0 ml (15,0) afgepipeteerd in een maatkolfje van 50,0 ml (25,0), waaraan 5,0 ml metafosfoorzuuroplossing van 20,0 % worden toegevoegd en er wordt aangelengd met water tot de merkstreep. Na goed mengen worden 20,0 ml overgebracht in een grote proefbuis voorzien van een glazen stop en er wordt 1,0 ml van het vers bereide diazoreagens toegevoegd. Er wordt gedurende 5 minuten krachtig geschud en de ontstane emulsie wordt gebroken door de proefbuis gedurende 5 minuten te centrifugeren in een Gerbercentrifuge met een diameter van 60 cm en een draaisnelheid van 1.100 t/min. Van de heldere alkohollaag worden 15,0 ml overgebracht in een tweede proefbuis. Hieraan worden 5,0 ml van denatriumhydroxydeoplossing toegevoegd, er wordt krachtig geschud gedurende 5 minuten en na het uitklaren van beide lagen, wat door de band zonder moeilijkheden verloopt, wordt de waterige laag overgebracht in een geschikte kolorimeterkuvet. Bij deze onderzoeken is gebruik gemaakt geworden van een Beckman DU spektrofotometer uitgerust met 10,0 mm kuvetten en de oplossingen zijn uitgemeten geworden ten opzichte van water.

Aan te stippen valt, dat, ook bij deze techniek de gekleurde oplossingen soms troebel worden, dit onder de invloed van de warmte van de handen of door een langdurig verblijf in de meetkamer van de spektrofotometer. Aan dit euvel wordt echter gemakkelijk verholpen door de kuvetten gedurende een korte tijd af te koelen in koud leidingwater.

De cijfers binnen de haakjes geven de werkvoorwaarden weer, die van toepassing waren bij het onderzoek van bestraalde oplossingen.

#### 2.4.2.3.3. De absorptiecurve.

Een oplossing met een concentratie van ongeveer 20,0 mg l-ascorbinezuur per liter is bij deze onderzoeken aangewend ge-

worden. De resultaten zijn weergegeven in tabel 15 en worden grafisch voorgesteld in figuur 12.

#### 2.4.2.3.3. Standaardkurve.

Hierbij worden oplossingen onderzocht in het concentratie-interval 20,0 tot 2,0 mg l-ascorbinezuur per liter. De bekomen gegevens zijn vervat in tabel 16 en laten toe te berekenen dat :

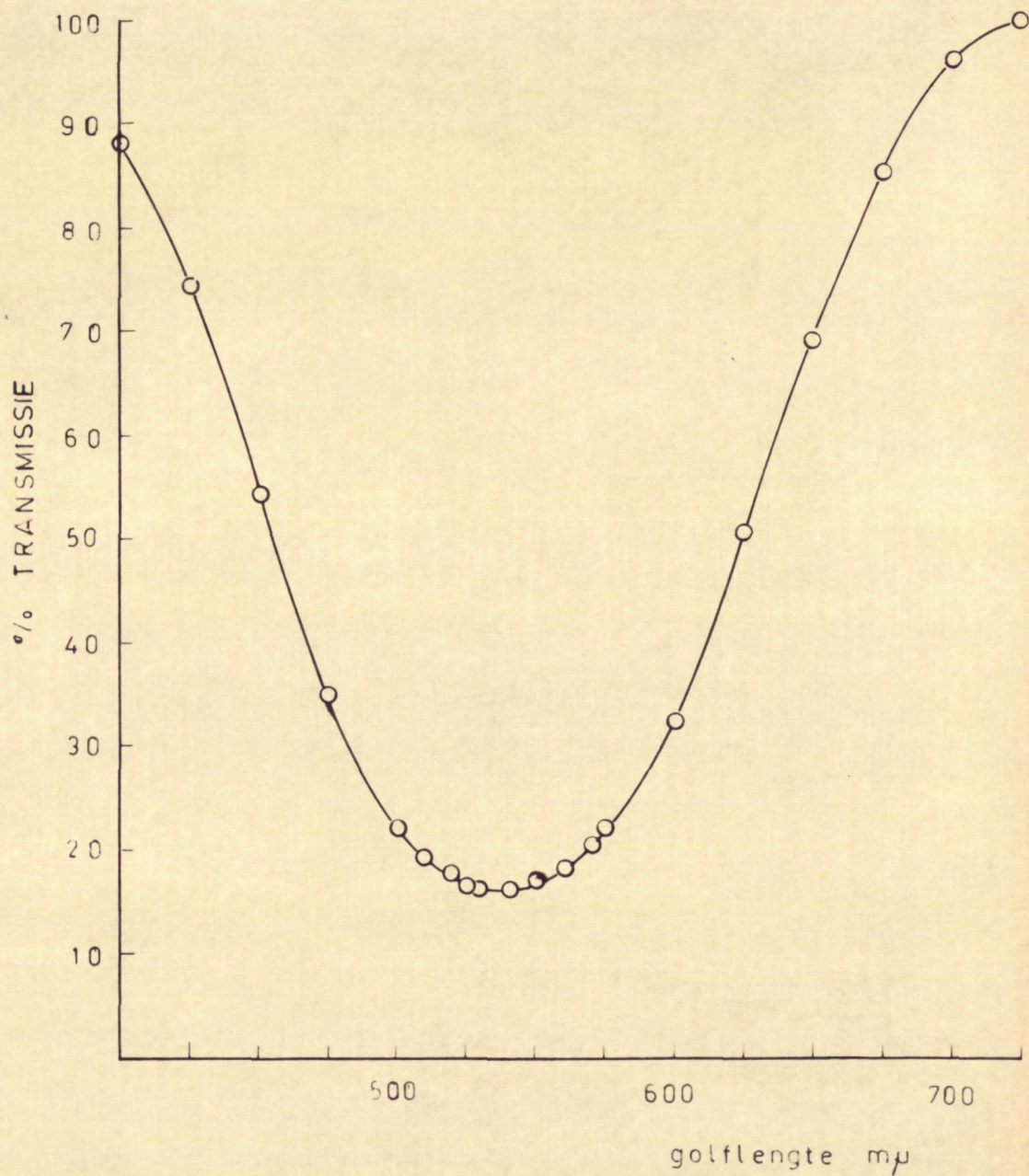
	$\sum x_i$	=	110,0
	$\sum x_i^2$	=	1.540,0
	$\sum x_i z_i$	=	156,5868
	$(\sum x_i)^2$	=	12.100,00
	$\bar{x}$	=	11,0
	$\sum x_i \sum z_i$	=	1.702,4040
	$\sum z_i$	=	15,4764
	n	=	10
zodat	a	=	2,00370
en	b	=	- 0,04146

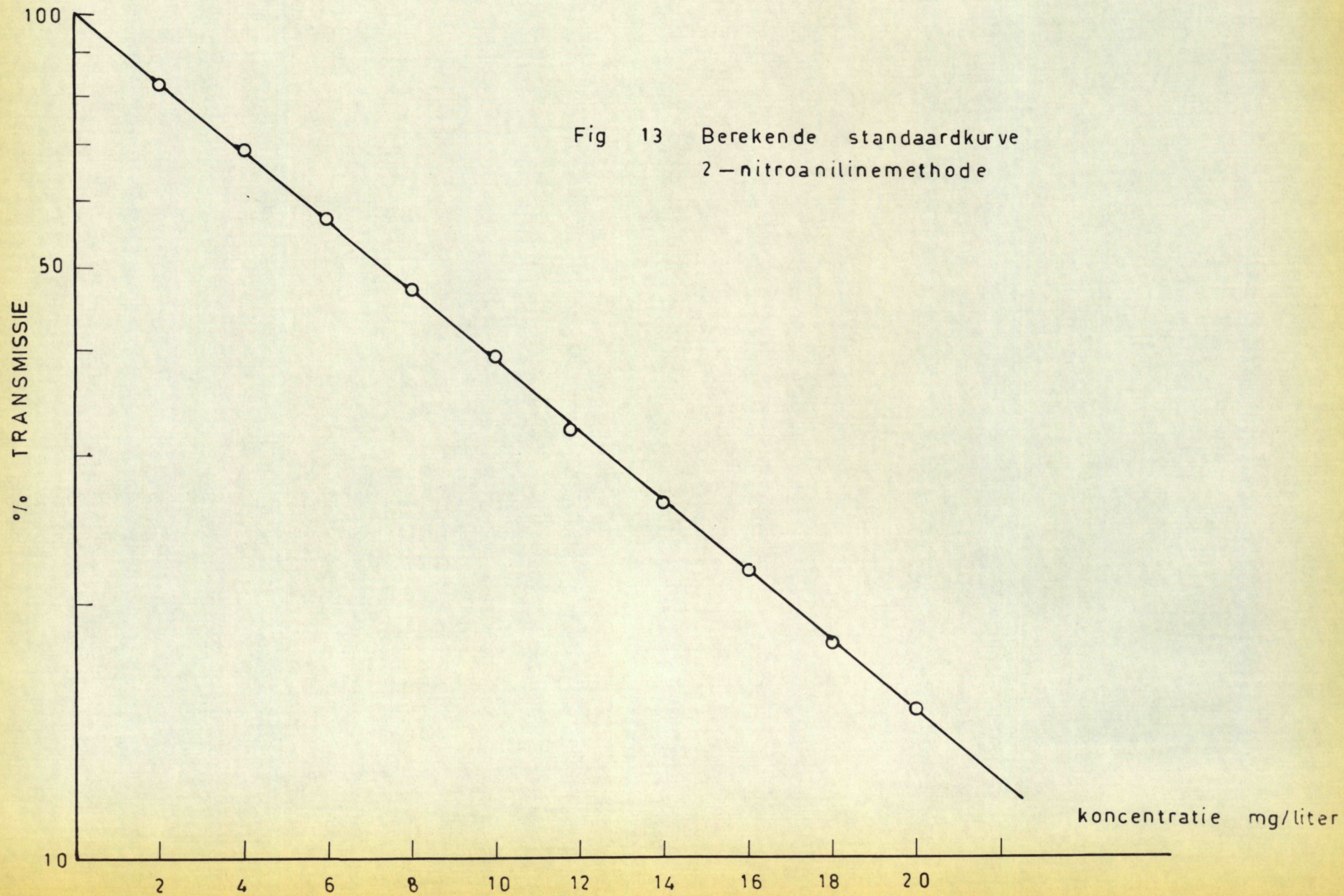
Het % transmissie kan dus berekend worden uit de vergelijking

$$\log y_i = 2,00370 - 0,04146 x_i$$

Enkele referentiepunten voor de berekende standaardkurve worden weergegeven in tabel 17, terwijl in figuur 13 de berekende rechte samen met de experimentele punten wordt voorgesteld.

Fig 12 Absorptiecurve voor het reactieproduct  
met 2-nitroaniline





Tabel 15. - Absorptiecurve voor de gekleurde component bij het gebruik van het 2-nitroaniline.

Golflengte in m $\mu$	% Transmissie	Golflengte in m $\mu$	% Transmissie
400	88,0		
425	74,4		
450	54,1		
475	34,9	510	19,4
500	22,3	520	17,7
525	16,8	530	16,7
550	17,0	540	16,5
575	21,8	550	17,2
600	32,5	560	18,2
625	50,8	570	20,5
650	69,3		
675	85,7		
700	96,4		
725	100,3		

Tabel 16. - Samenvatting van de gegevens voor het bepalen van de standaardkurve voor het doseren van het l-ascorbinezuur met het 2-nitroaniline reagens - Beckman DU - 10 mm kuvetten - 540 m $\mu$  .

$x_i$ mg/liter	$\bar{y}_i$ % transmissie	$z_i (= \log \bar{y}_i)$	$x_i z_i$	n	s (standaardafwijking enkele bepaling)	$s/\sqrt{n}$ (standaardaf- wijking gemiddelde)
20,0	15,0	1,1761	23,5220	6	0,32	0,13
18,0	18,0	1,2553	22,5954	6	0,30	0,12
16,0	21,9	1,3404	21,4464	6	0,42	0,17
14,0	26,4	1,4216	19,9024	6	0,54	0,22
12,0	32,2	1,5079	18,0948	6	0,66	0,26
10,0	39,2	1,5933	15,9330	6	0,67	0,27
8,0	47,1	1,6730	13,3840	6	0,60	0,24
6,0	56,8	1,7543	10,5258	6	0,68	0,27
4,0	68,7	1,8370	7,3480	6	0,68	0,27
2,0	82,7	1,9175	3,8350	6	0,33	0,13



Tabel 17.- Berekende referentiepunten voor de best aangepaste rechte doorheen de experimentele punten voor de 2-nitroaniline-methode.

$x_i$ in mg/liter	$y_i$ in % transmissie
0,0	100,9
10,0	38,8
20,0	14,9

Er wordt echter verwacht dat het intercept in een lineair assenstelsel de waarde 0,0000 heeft, daar waar uit de vergelijking van de best aangepaste rechte volgt, dat het experimentele intercept gelijk is aan  $-0,0037$ . Door enerzijds de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte met een intercept 0,0000 te bepalen,  $S'$ , en anderzijds de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte met een intercept van  $-0,0037$  te bepalen,  $S$ , kan met behulp van een variantieanalyse uitgemaakt worden of het experimentele intercept op grond van de proeffouten kan aanvaard worden. Met behulp van de reeds behandelde formules wordt de waarde berekend voor :

$$S' = 0,00005$$

en voor  $S = 0,00004$

Beide kwadraatsommen werden vergeleken in de variantieanalyse samengevat in tabel 18.

Tabel 18.- Variantieanalyse.

H <sub>0</sub> hypothese : geen wezenlijk verschil tussen het theoretisch intercept 0,0000 en het experimentele intercept - 0,0037				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadrat-som	Variantie	F(berekend)
Reduktie door intercept	1	0,00001	0,000010	2,0
Lijn met intercept	8	0,00004	0,000005	
Lijn zonder intercept	9	0,00005		
F theoretisch met 1 en 8 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans : 5,32				

Op grond van de uitgevoerde experimenten is er derhalve geen reden om een werkelijk bestaand verschil tussen het theoretische intercept en de experimentele waarde te veronderstellen.

#### 2.4.2.34. De stabiliteit van de kleur.

Door een bepaalde tijd te laten verlopen na het toevoegen van het diazoreagens, na de extractie met het n-butanol of na de kleurvorming met het toegevoegde natriumhydroxyde, en dan pas de analyse af te werken, is nagegaan geworden in hoeverre de analysere-sultaten beïnvloed kunnen worden door een onderbreking in het werk. De bekomen resultaten zijn samengevat in tabel 19.

Het onderzoek van deze gegevens brengt aan het licht dat er een groot verschil bestaat voor wat betreft een onderbreking na

Tabel 19.- Invloed van een onderbreking van de analyses op de belomen resultaten bij de 2-nitroanilinemethode.

Onderbroken voor t minuten	Na toevoeging van het diazoreagens			Na de extractie met het n-butanol			Na de kleurvorming met het natriumhydroxyde		
	% l-ascorbinezuur teruggevonden								
	I	II	Gemid.	I	II	Gemid.	I	II	Gemid.
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30	100,0	99,0	99,5	99,5	100,0	99,8	99,5	100,5	100,0
60	99,0	97,5	98,3	96,6	99,0	97,8	99,5	100,5	100,0
90	96,6	97,0	96,8	92,6	94,9	93,8	101,0	100,5	100,8
120									
150	96,6	98,0	97,3	92,6	93,4	93,0	99,0	102,0	100,5
180	94,1	95,4	94,8	90,6	91,4	91,0	100,0	99,5	99,8

het toevoegen van het diazoreagens of na het extraheren met het n-butanol enerzijds en een onderbreking van de werkzaamheden na de kleurvorming anderzijds.

Voor een concentratie van 20,0 mg l-ascorbinezuur per liter volgt uit tabel 16 een standaardafwijking op de gemiddelde waarneming van 0,13 % transmissie zodat het 95 % betrouwbaarheidsinterval op de aflezing gelijk wordt aan :

$$15,0 \pm 2,57 \times 0,13 = 15,0 \pm 0,3 \text{ \% transmissie}$$

In % l-ascorbinezuur omgerekend komt dit overeen met een interval begrepen tussen 98,7 % en 100,9 %. De gemiddelde waarnemingen die bekomen zijn na een onderbreking variërend tussen 0 en 180 minuten vallen binnen deze betrouwbaarheidsgrenzen voor zover de onderbreking gebeurde na de kleurontwikkeling. Dit betekent dat alle waarnemingen van een belichtingsexperiment kunnen uitgemeten worden na het beëindigen van de proef op voorwaarde dat de analyses zelf afgewerkt worden zonder onderbreking.

## 2.5. Besluiten.

Op grond van de uitgevoerde experimenten komen, wegens de eenvoudigheid van de techniek, de snelheid van de uitvoering of de mogelijkheid voor het opstellen van een soepel werkschema, slechts drie van de onderzochte methoden in aanmerking voor de studie van de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur. Deze drie technieken zijn de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie, de fosfomolybdeenblauwmethode en de o-nitroanilinemethode. Aangenomen wordt dat er goede redenen zijn om voorop te stellen, dat de beide kolori-

metrische methoden niet gestoord zullen worden door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur.

### 3. De fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur.

#### 3.1. De belichtingsinstallatie en -methode.

Bij de uitvoering van deze experimenten is gebruik gemaakt geworden van twee belichtingsinstallaties. Bij een van deze apparaten gebeurt de belichting langs onder. Deze installatie wordt verder besproken onder de aanduiding "B I". Bij de andere uitrusting wordt de belichting doorgevoerd op één van de zijvlakken. Deze inrichting wordt in de tekst vermeld als de "B II" installatie.

##### 3.1.1. De B I installatie.

Deze inrichting is opgesteld in een donkere kamer, die voorzien is van een regelbare temperatuursinstallatie. Gedurende de gehele proefduur is het mogelijk de temperatuur van de proefoplossingen tussen 19 en 22° C te houden door een geschikte instelling van de kamertemperatuur.

De installatie bestaat uit een dubbel statief, waarop langs onder de gebruikte lamp vastgeklemd wordt. Daarboven bevindt zich een verplaatsbaar, ringvormig steunvlak, waarop rechtopstaande klemvlakjes aangebracht zijn. Deze plaatjes voorkomen een accidenteel verschuiven of afstoten van de belichtingskuvet, maar laten door hun plaatsing tevens toe de voeler van de gebruikte belichtingsmeter steed in dezelfde zin te plaatsen ten opzichte van de lamp. De voeler van

de luxmeter en de belichtingskuvet hebben dezelfde diameter. Na het afregelen van de afstand tussen de lichtbron en het belichtingsvlak, wordt de voeler van de belichtingsmeter vervangen door de kuvet. Een kristallisatieschaal met een diameter van 15 cm wordt daarvoor aangevend. Na het monteren van een thermometer en een elektrische roerder wordt de lamp gedoofd en wordt de proefoplossing klaar gemaakt.

Nadat van de oplossing een monster genomen is voor de controle op het ingewogen gewicht aan l-ascorbinezuur en voor de bepaling van de pH, wordt de oplossing overgebracht in de belichtings-schaal en wordt de proef gestart. Al naar gelang de gebruikte analyse-techniek wordt om de 5 of om de 10 minuten een monster genomen voor de dosering van de resterende hoeveelheid van het l-ascorbinezuur en wordt de temperatuur van de oplossing genoteerd.

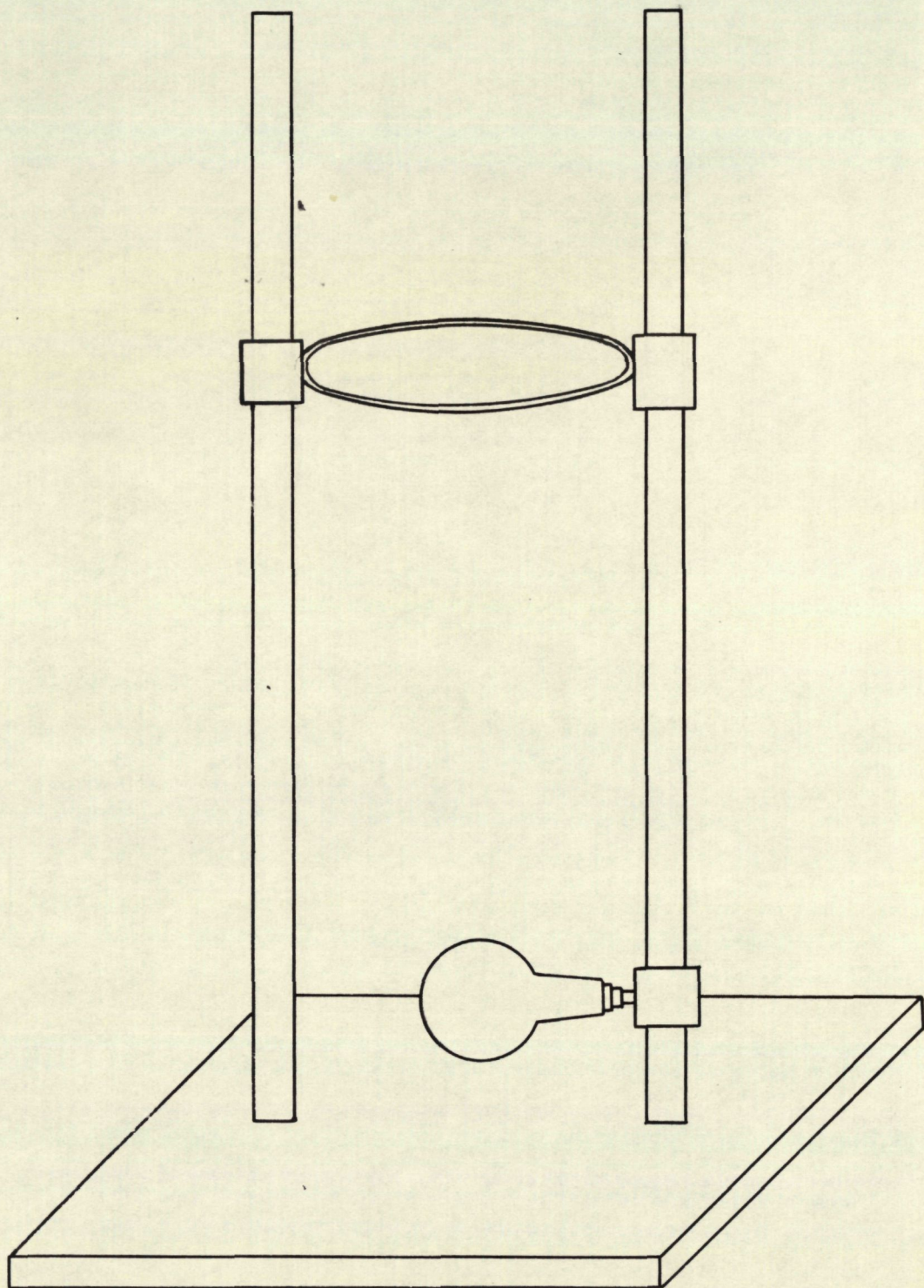
Deze belichtingsinstallatie wordt schematisch weergegeven in figuur 14. Ze is niet ideaal maar ze biedt volgende grote voordelen :

- gedurende de gehele **belichtingsduur** blijft de afstand tussen de lichtbron en het belichte oppervlak konstant en daar de belichtingssterkte omgekeerd evenredig is met het kwadraat van deze afstand, hebben geringe wijzigingen van deze afstand een grote invloed op de belichtingsintensiteit ;

- de belichtingsintensiteit op het te belichten vlak kan zeer nauwkeurig ingesteld worden.

Deze techniek bezit volgende belangrijke nadelen :

Fig 14      Schematische voorstelling  
belichtingsinstallatie B I



- door het tussenschakelen van een glazen wand treedt een verlies op door reflectie, verlies dat ongeveer op 4 % mag geraamd worden ;

- door het tussenschakelen van een glazen wand treedt een onbekend, maar voor een gegeven kuvet konstant, verlies op door de absorptie ;

- gedurende de proef verandert de laagdikte van de bestraalde oplossing.

De eerste twee nadelen kunnen ondervangen worden door gebruik te maken van één en dezelfde kuvet voor alle proeven. Hierdoor worden de bekomen resultaten onderling wel vergelijkbaar. Het laatst genoemde nadeel kan niet ondervangen worden, maar de gevolgen kunnen beperkt worden. Over het algemeen wordt een fout van 10 % (140) op de bepaling van een reaktiesnelheidskonstante aanzien als accepteerbaar. De veranderingen in de laagdikte dienen dus beperkt te worden tot een waarde, waarbij de bekomen resultaten geen grotere fout aantonen. Voor de analyse met behulp van de fosfomolybdeenblauwmethode of met de titrimetrische techniek worden dan ook slechts maximaal 10 waarnemingen verricht, wat overeenstemt met een belichtingsduur van 50 minuten. Wanneer de o-nitroanilinemethode toegepast wordt, kunnen in deze periode slechts 5 waarnemingen verricht worden, waardoor de maximale hoeveelheid aan verbruikte proefoplossing ongeveer  $\frac{2}{3}$  bedraagt van de hoeveelheid die nodig is bij de andere analysetechnieken.

Aanvankelijk is deze belichtingsinstallatie gebruikt geworden met twee verschillende lichtbronnen, namelijk een argaphoto lamp van 500 Watt zonder inwendige spiegel en een projektielamp E 375



eveneens van 500 Watt. Beide lichtbronnen worden door Philips vervaardigd. De E 375 heeft de best reproduceerbare resultaten opgeleverd, maar tengevolge van de zeer korte levensduur is van het gebruik van deze lichtbron afgezien geworden.

### 3.1.2. De B II installatie.

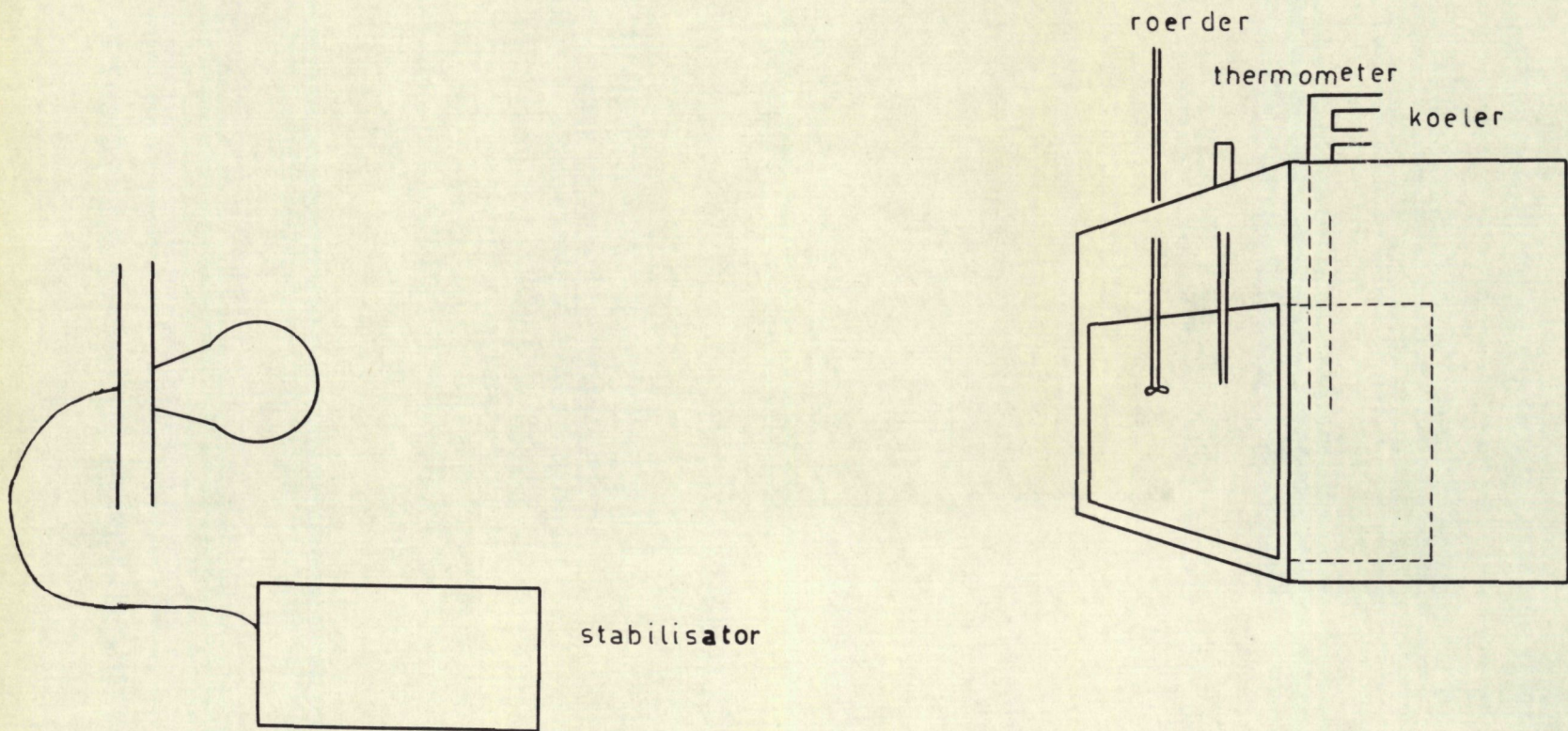
Deze inrichting wordt schematisch weergegeven in figuur 15. De verticale opstelling is hierin vervangen worden door een horizontale werkwijze. De belichtingskuvet is uit optisch glas vervaardigd en heeft als binnenafmetingen 200 x 170 x 100 mm, zodat de breedte 20 cm en de laagdikte 10 cm bedraagt. Deze kuvet laat toe tot 3 liter belichtingsvloei-stof per experiment aan te wenden.

De kuvet wordt in een bakje geplaatst waarvan de binnenzijden overtrokken zijn met zwarte vilt. De voorzijde kan afgesloten worden en in het afneembaar deksel zijn afsluitbare openingen voorzien voor het ingieten van de oplossing in de kuvet, voor het in de oplossing brengen van een roerstaaf, van een weerstandsthermometer, van een koude vinger en voor het afpipeteren van de monsters.

Nadat de voorzijde en het deksel verwijderd zijn, wordt de kuvet in de belichtingskamer gebracht en in de kuvet wordt de voeler van de lichtmeter geplaatst. De voeler wordt voorzichtig opgespannen tegen de voorzijde van de kuvet, het bovendeksel wordt teruggeplaatst en de afstand tussen de lichtbron en het belichtingsoppervlak wordt geregeld door het verschuiven van de beweegbaar opgestelde lichtbron. Wanneer de belichtingsintensiteit ingesteld is, wordt de voeler van de belichtingsmeter weggenomen, de roerder, koeler en weerstandsthermometer worden gemonteerd en de belichtingskamer wordt afgesloten totdat de proefoplossing in de kuvet overgebracht is.

Fig 15

Schematische voorstelling belichtingsinstallatie B II



Behoudens de mogelijkheid dat deze inrichting direct kan opgesteld worden in het laboratorium, ligt het voornaamste voordeel in het feit dat voor een vermindering van het volume aan proefoplossing een rechtevenredige vermindering van het belichte oppervlak tot stand komt, zodat het afnemen van de monsters theoretisch geen invloed heeft op de bekomen resultaten.

Als lichtbron is bij deze installatie uitsluitend gebruik gemaakt **geworden** van een argaphotolamp van 500 watt. Deze lampen zijn echter wel voorzien van een inwendige spiegel en zijn aangesloten geworden op het net via een stabilisator van 1.000 watt.

### 3.1.3. De proefoplossing.

De te belichten oplossing wordt klaargemaakt in een donkere kamer bij sterk gedempt kunstlicht. De gebruikte maatkolven zijn vervaardigd uit bruin glas. Voor de experimenten met de B I inrichting worden 1.000 ml oplossing gemaakt, voor de proeven met de B II inrichting worden 2.000 ml oplossing bereid. Daartoe worden in de gepaste maatkolf allereerst de nodige hoeveelheden van de bufferbestanddelen overgebracht. Op één enkele uitzondering na, is hierbij steeds gebruik gemaakt geworden van de Clark & Lubs' buffers, waarvan de samenstelling genoegzaam bekend is uit de literatuur (185). Aan de oplossing wordt vervolgens de nodige hoeveelheid van de riboflavine-stockoplossing toegevoegd. Daarop wordt water bijgevoegd totdat ongeveer 90 % van het eindvolume bereikt is. Dan pas wordt de voorafgaandelijk zorgvuldig afgewogen hoeveelheid l-ascorbinezuur kwantitatief overgespoeld in de maatkolf en er wordt aangelengd met water tot de merkstreep. Gedurende 5 minuten wordt de oplossing geschud. Vervolgens wordt een eerste monster genomen voor de controle op het ingewogen gewicht en voor de controle van de pH. De rest van de op-

lossing wordt dan in de kuvet gebracht en de belichtingsproef wordt gestart.

Het gebruikte l-ascorbinezuur is een voorafgaandelijk gedroogd kristallijn p.a. preparaat.

De stockoplossing van de fotosensibilisator kan opgemaakt worden volgens de voorschriften van de A.V.C. (157), maar kan evengoed klaar gemaakt worden zonder het stabiliserende ijsazijn. Beide oplossingen gedragen zich op dezelfde wijze bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur. Bij bewaring op 5° C waarborgt de stabiliteit van de oplossing zonder ijsazijn een onverminderde activiteit van de fotosensibilisator gedurende ten minste twee weken. Het gebruikte riboflavine is het preparaat voor biochemisch onderzoek van de firma Merck, preparaat dat voorafgaandelijk gedroogd wordt.

### 3.2. De dosering van het l-ascorbinezuur gedurende de fotochemische destructie.

Aan de hand van de literatuurgegevens betreffende de 2,6-dichlorofenol-indofenol methode en ten aanzien van de kinetiek van de oxydatieve omzetting tot het dehydro-l-ascorbinezuur, is vooropgesteld geworden, dat de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie gestoord wordt door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur. Verder is op grond van de eigenschappen van de reagentia, die bij de fosfomolybdeenblauw en de o-nitroanilinemethode aangewend worden, verondersteld geworden dat de kolorimetrise technieken niet aan een dergelijke storing onderhevig zijn. Hieruit volgt, dat de resultaten die bekomen worden met de titrimetrische techniek verschillend zouden moeten zijn van deze die bekomen worden met de kolorimetrise methodes.

Oplossingen die 20,0 mg l-ascorbinezuur en 2,0 mg riboflavine per liter bevatten, zijn klaargemaakt geworden in een fosfaatbuffer bij pH 6,7 - 6,8. De belichting is uitgevoerd geworden in de B I installatie voorzien van een argaphotolamp en bij een intensiteit van 5.000 lx. De analyses zijn uitgevoerd geworden met de drie verschillende technieken en de gemiddelde resultaten worden samengevat in tabel 20.

Aan de hand van deze gegevens is het duidelijk, dat er tussen de twee kolorimetrische methoden een goede overeenkomst bestaat, maar dat deze resultaten niet overeenstemmen met de titrimetrische. De overeenkomst tussen de methodes twee aan twee genomen kan overigens beter omschreven worden met behulp van geschikte statistische methodes. Zo er geen verschil bestaat tussen de beide onderzochte analysetechnieken, dan mag men in een lineair assenstelsel een reeks punten verwachten die op een rechte lijn liggen wanneer de analyse resultaten van de ene methode in ordinaat van de andere methode in abcis uitgezet worden. De bekomen rechte lijn wordt gekarakteriseerd door een theoretische gradient  $b$ , die gelijk is aan 1,000, en een theoretisch intercept  $a$ , met de waarde 0,000.

Worden de resultaten van de fosfomolybdeenblauwmethode de  $x_i$  waarden genoemd en de resultaten van de diazomethode de  $y_i$  waarden, dan kan voor de overeenstemmende waarnemingen uit tabel 20 berekend worden dat :

$$\begin{aligned} \sum y_i &= 254,2 \\ \sum y_i^2 &= 16.522,74 \\ \sum x_i \sum y_i &= 65.609,02 \\ \sum x_i y_i &= 16.634,90 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \sum x_i &= 258,1 \\
 \sum x_i^2 &= 16.753,85 \\
 (\sum x_i)^2 &= 66.615,61 \\
 \bar{x} &= 43,02 \\
 \bar{y} &= 42,37 \\
 n &= 6
 \end{aligned}$$

Tabel 20.- Resultaten bekomen met drie verschillende analysetechnieken bij de dosering van het l-ascorbinezuur in bestraalde oplossingen - pH 6,7 - 6,8 - B I - 5.000 Lx - argaphotolamp.

Belichtings- duur in minuten	Gemiddeld % l-ascorbinezuur teruggevonden		
	Titrimetrisch n = 4	Fosfomolybdeen n = 5	Diazomethode n = 3
0	100,0	100,0	100,0
5	88,1	79,1	-
10	75,2	61,8	62,0
15	64,8	54,4	-
20	54,5	43,0	40,7
25	45,2	34,7	-
30	38,1	26,8	26,0
35	30,3	21,5	-
40	25,9	16,1	16,0
45	21,7	13,3	-
50	17,5	10,4	9,5

n = aantal reeksen waarop het gemiddelde bepaald werd

Met behulp van deze resultaten kan nu, volgens de reeds aangegeven methode van de kleinste kwadraten, de gradient  $b$  en het intercept  $a$  bepaald worden voor de best aangepaste rechte. Men bekomt de waarden :

$$\begin{array}{rcl} b & = & 1,0086 \\ a & = & - 1,0 \end{array}$$

De berekende rechte wordt samen met de experimentele punten voorgesteld in figuur 16.

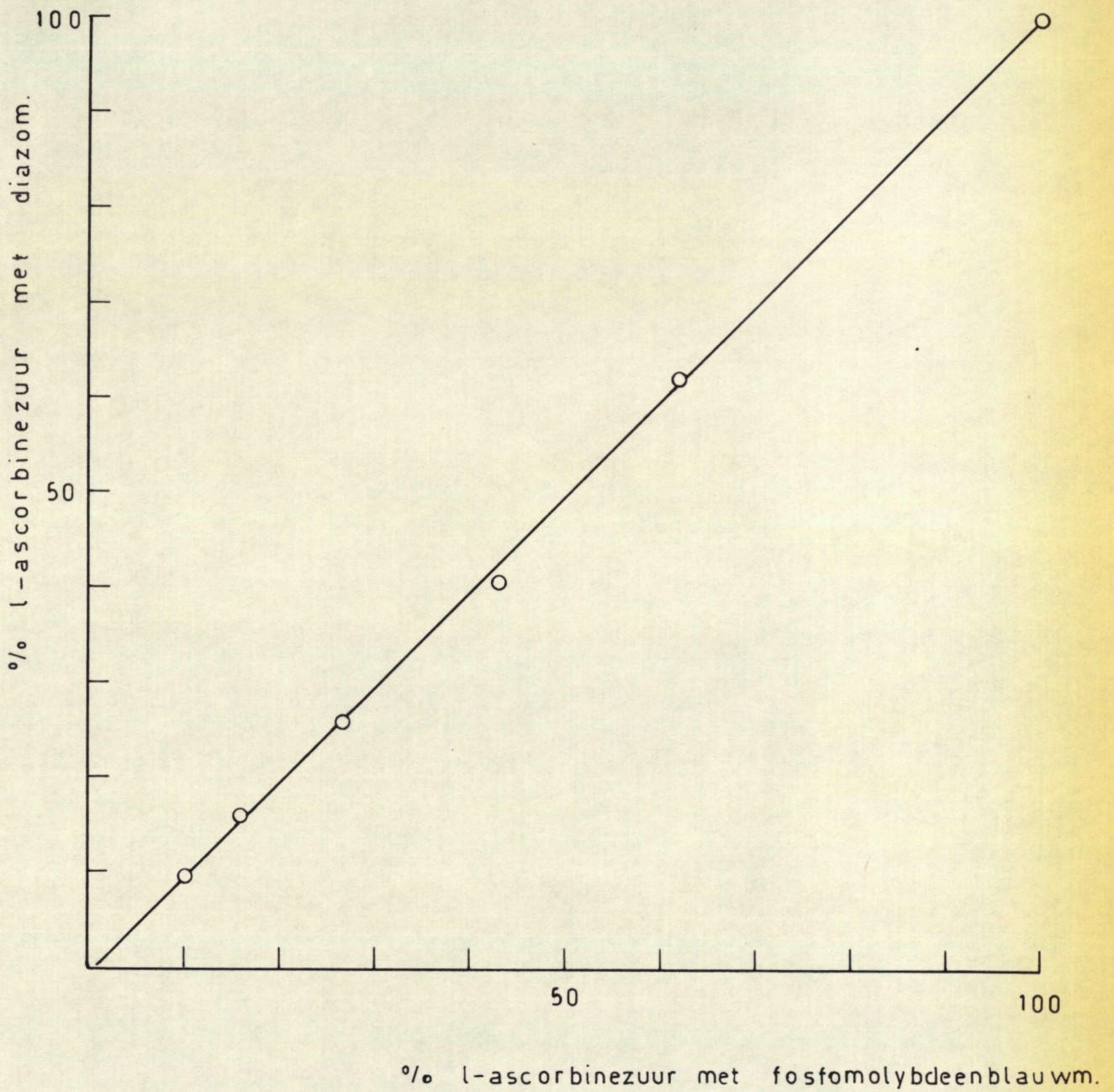
De beide berekende koëfficiënten wijken echter af van de theoretisch vooropgestelde waarden, zodat de afwijkingen dienen geïnterpreteerd te worden in het licht van de proeffouten.

De afwijking van de experimenteel gevonden waarde voor het intercept  $a$  ten opzichte van de theoretische waarde kan getest worden door een variantieanalyse toe te passen op  $S'$ , de som van de kwadraten van de afwijkingen tussen de experimentele punten en een rechte door de oorsprong, en  $S$ , de som van de kwadraten van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte met het intercept  $a$ . De berekeningstechniek voor het bepalen van de beide kwadraatsommen is reeds uitvoerig toegelicht geworden in hoofdstuk 2, zodat hierop niet nader moet worden ingegaan. Men bekomt dan de waarde voor :

$$\begin{array}{rcl} S' & = & 5,94 \\ S & = & 4,66 \end{array}$$

Beide kwadraatsommen worden betrokken in de variantieanalyse die samengevat is in tabel 21.

Fig 16      Overeenstemming van de  
kolorimetrische methodes bij het onderzoek  
van belichte oplossingen.





Tabel 21.- Variantieanalyse.

H <sub>0</sub> hypothese : geen wezenlijk verschil tussen de theoretische waarde van het intercept, 0,00, en de experimentele waarde - 1,00.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadraat-som	Variantie	F(Berekend)
Reduktie intercept	1	1,28	1,28	1,10
Lijn met intercept	4	4,66	1,165	
Lijn zonder intercept	5	5,94		
F (theoretisch) met 1 en 4 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans : 7,71.				

Op grond van de uitgevoerde variantieanalyse is er derhalve geen reden om te veronderstellen dat het experimentele intercept niet aanvaardbaar is binnen de grenzen van de begane proef-fouten.

Het testen van het verschil tussen de experimentele waarde voor de gradient  $b$  en de theoretische waarde 1,00 kan gebeuren met behulp van de Student test (187). Uit de betrekking  $S = (n - 2)s^2$  volgt dat :

$$s^2 = 4,66/4 = 1,165$$

$$s_b = \sqrt{1,165 / \left[ 16.753,85 - (258,1)^2 / 6 \right]} = 0,0144$$

$$t = 0,0086 / 0,0144 = 0,598$$

De theoretische waarde voor  $t$  met 4 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans bedraagt 2,78, zodat op grond van de uitgevoerde experimenten geen wezenlijk verschil kan aangetoond worden tussen de theoretische en de experimentele waarde van de gradient.

Aan de hand van deze onderzoeken mag dan ook vooropgezet worden, dat de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur door de twee kolorimetrische methodes op dezelfde wijze wordt weergegeven.

De vergelijking tussen de resultaten bekomen met een kolorimetrische en de titrimetrische methode kan op dezelfde wijze gebeuren. De resultaten die weergegeven zijn in tabel 20 worden grafisch voorgesteld in figuur 17. Het is duidelijk, dat tussen de resultaten die bekomen worden met de twee aangewende methoden geen eenvoudig lineair verband bestaat. Er zijn dan ook een reeks aanvullende proeven uitgevoerd geworden onder dezelfde voorwaarden als deze waarbij de eerste reeks resultaten bekomen werden, maar waarbij de B I installatie uitgerust geworden is met een andere lichtbron, namelijk de E 375. De bekomen gegevens zijn samengevat in tabel 22, terwijl de experimentele punten en de daaruit berekende rechte grafisch voorgesteld worden door figuur 18. De vergelijking van de experimentele lijn die doorheen de punten getrokken wordt in figuur 17 en figuur 18 toont aan, dat in beide reeksen proeven het lineaire verband tussen de bekomen resultaten blijkbaar niet bestaat.

Met behulp van de gegevens uit tabel 22, maar het kan evengoed met de resultaten vermeld in tabel 20, kan terug het inter-

Fig 17 Verband tussen de titrimetrische en de kolorimetrische analyse van belichte oplossingen.

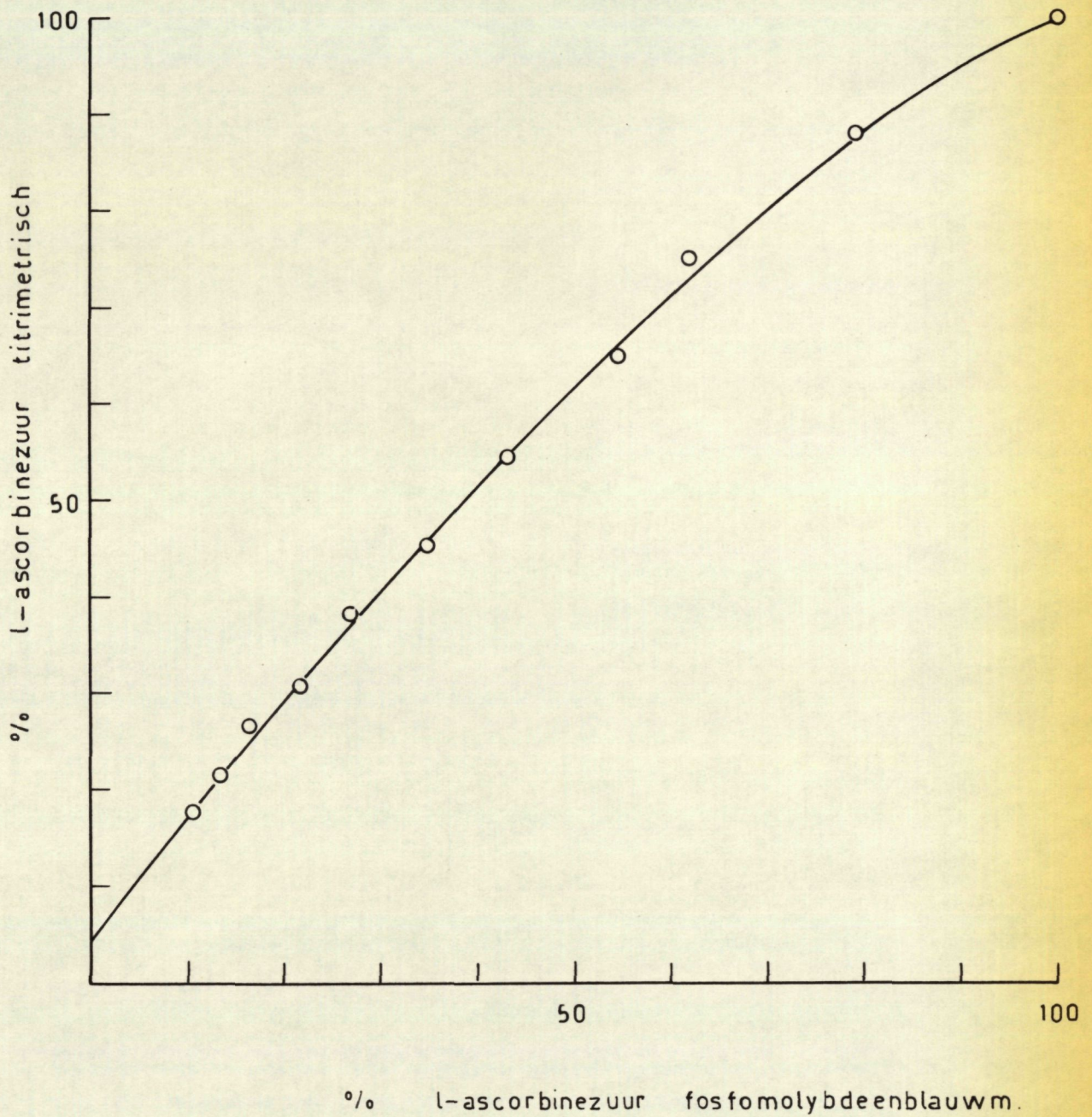
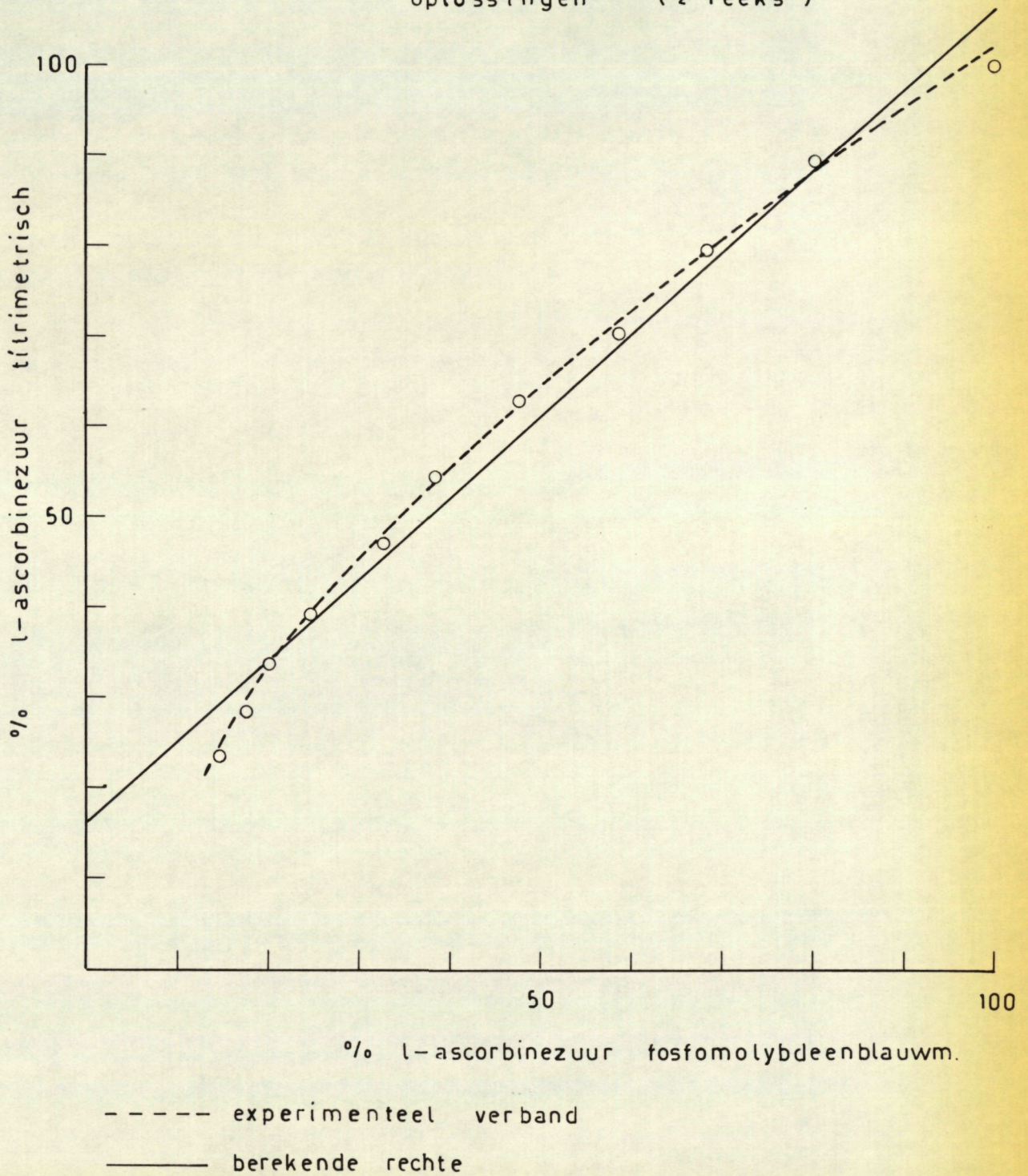


Fig 18 Verband tussen de titrimetrische en de kolorimetrische analyse van belichte oplossingen (2 reeks)



cept a en de gradient b berekend worden voor de best aangepaste rechte, die, in het lineaire assenstelsel, het verband tussen de resultaten van de twee onderzochte methoden uitdrukt. Men bekomt dan voor :

Tabel 22.- Resultaten bekomen met een kolorimetrische en de titrimetrische methode bij de dosering van het l-ascorbinezuur in bestraalde oplossingen - aanvullende reeks waarnemingen  
B I - 5.000 Lx - E 375 - pH 6,7 - 6,8.

Belichtings- duur in minuten	Gemiddeld % l-ascorbinezuur teruggevonden	
	Titrimetrisch n = 6	Fosfomolybdeenblauwn. n = 5
0	100,0	100,0
5	89,4	80,3
10	79,7	68,4
15	70,3	58,6
20	62,9	47,5
25	54,5	38,3
30	47,2	32,5
35	39,4	24,5
40	33,5	20,0
45	28,3	17,5
50	23,5	14,6

n = aantal waarnemingen waaruit het gemiddelde bepaald werd.

$\sum y_i$	=	628,7
$\sum y_i^2$	=	42.468,79
$\sum x_i y_i$	=	35.832,63
$\sum x_i \sum y_i$	=	315.753,14
$\sum x_i$	=	502,2
$\sum x_i$	=	30.859,66
$(\sum x_i)^2$	=	252.204,84
$\bar{x}$	=	45,65
$\bar{y}$	=	57,20
$n$	=	11

Met behulp van deze gegevens kan dan berekend worden dat :

$a$	=	16,2
$b$	=	0,89885
$S'$	=	861,73
$S$	=	124,00

De berekende rechte wordt weergegeven in figuur 18. Het is reeds aan de hand van deze grafische voorstelling zonder meer duidelijk dat het verband tussen de experimentele punten niet weergegeven wordt door een rechte, en indien dergelijk verband wel verondersteld wordt, dan volgt uit de variantieanalyse dat deze rechte niet beantwoordt aan de opgelegde normen in zake het intercept. De variantieanalyse is samengevat in tabel 23.

Wanneer rekening gehouden wordt met de hierna volgende argumenten, dan ligt het besluit voor de hand, dat van de drie weehouden analysetechnieken slechts de twee kolorimetrische methoden

Tabel 23.- Variantieanalyse.

H <sub>0</sub> hypothese : geen wezenlijk verschil tussen het theoretische intercept, 0,00, en het experimentele intercept, 16,2.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadraatsom	Variantie	F(berekend)
Reduktie intercept	1	737,73	737,73	53,53
Lijn met intercept	9	124,00	13,78	
Lijn zonder intercept	10	861,73		
F (theoretisch) met 1 en 9 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans : 5,12 1 % overschrijdingskans : 10,56				

geschikt zijn voor het kwantitatief bestuderen van de fotochemische omzetting van het l-ascorbinezuur tot het dehydro-l-ascorbinezuur. In het voordeel van een dergelijk standpunt pleiten :

1. de literatuurgegevens betreffende de talrijke storende bestanddelen bij het gebruik van de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie,
2. de literatuurgegevens die aantonen dat bij het gebruik van de titrimetrische techniek, de reactie niet beschreven wordt door een eenvoudige wet,
3. de literatuurgegevens betreffende de specificiteit van de kolorimetrische methodes,

4. de goede overeenstemming tussen de twee, in principe sterk verschillende, kolorimetrische methodes bij de analyse van de belichte oplossingen,

5. het feit dat de resultaten bekomen met de kolorimetrische methoden wel een eenvoudig verband leggen tussen de afbraak en de reaktieduur, zoals duidelijk aangetoond wordt in de volgende paragraaf.

Deze resultaten maakten reeds het voorwerp uit van een mededeling (216).

3.3. De fotogesensibiliseerde oxydatie van het l-ascorbinezuur volgt een wet van de eerste orde.

Bij een reactie die verloopt volgens een wet van de eerste orde, wordt het verband tussen de concentratie van de afgebroken stof en de reaktieduur door een vergelijking van de vorm

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x) \quad (1)$$

beschreven. Hierin stelt  $a$  de aanvangskoncentratie voor van de bestudeerde stof,  $(a - x)$  de momentele concentratie na een reaktietijd  $t$  en  $k$  is de proportionaliteitsfaktor of de reaktiesnelheidskonstante. De vergelijking kan uiteraard ook geschreven worden als :

$$\frac{dx}{y} = kdt \quad (2)$$

waarbij  $y = (a - x)$ . Door het integreren wordt de vergelijking (2) dan gelijk aan :

$$\ln y = kt + C \quad (3)$$



Voor  $t = 0$  wordt  $y = a$  zodat  $C$  gelijk is aan  $\ln a$  en de vergelijking (3) geschreven kan worden als :

$$\log y = 0,4343 kt + \log a \quad (4)$$

of

$$\log y = bt + \log a \quad (5)$$

De vergelijking (5) is analoog aan de vergelijking van de wet van Lambert-Beer en de berekening van de gradient  $b$  kan volgens de methodes aangewend in het voorgaande hoofdstuk gebeuren. De techniek kan echter vereenvoudigd worden door de concentratie van de bestudeerde verbinding op een relatieve wijze voor te stellen. Wanneer hierbij de aanvangskoncentratie gelijk gesteld wordt aan 1,00, dan wordt  $\log a$  gelijk aan 0,0000, zodat de vergelijking (5) vereenvoudigd kan worden tot

$$\log y = bt \quad (6)$$

Door gebruik te maken van het principe van de kleinste kwadraten kan de beste waarde voor de gradient  $b$  uit een reeks waarnemingen berekend worden. De som van de kwadraten van de afwijkingen kan inderdaad geschreven worden als :

$$\sum (y'_i - bt_i)^2$$

waarbij  $y'_i = \log y_i$ . De partiele afgeleide naar  $b$  wordt

$$2 \sum t_i (bt_i - y'_i)$$

en door  $\sum t_i (bt_i - y'_i) = 0$  te stellen kan de waarde voor  $b$  bepaald worden als :

$$b = - \frac{\sum t_i y_i'}{t_i^2}$$

waaruit dan de waarde voor de reaktiesnelheidskonstante kan berekend worden, namelijk :

$$k = b/0,4343$$

Uit deze berekening volgt dat tussen de momentele concentratie aan l-ascorbinezuur en de reaktieduur een semi-logaritmisch verband bestaat. Wanneer derhalve de experimentele gegevens op een dergelijke wijze voorgesteld kunnen worden, dat de bekomen resterende concentraties na diverse reaktietijden door een rechte lijn op semi-logaritmisch papier verbonden worden, dan mag aangenomen worden dat de onderzochte reactie een wet van de eerste orde volgt.

Ten einde dit te controleren worden de resultaten van een aantal proefbelichtingen in de figuren 19, 20, 21, 22, 23 en 24 weergegeven. In al deze gevallen zijn de analyseresultaten bekomen geworden met behulp van de fosfomolybdeenblauwmethode. Onder een set "standaardvoorwaarden" voor wat betreft de belichtingssterkte, de pH, de belichtingsinstallatie, de lichtbron en de concentratie aan fotosensibilisator, volgt uit figuur 19 dat het verband tussen de experimenteel terug gevonden concentraties en de reaktieduur door een semi-logaritmische betrekking goed wordt weergegeven. Door het vervangen van de lichtbron wordt weliswaar de grootte van de richtingscoëfficiënt van de recht beïnvloed, maar de experimentele resultaten blijven, zoals uit figuur 20 af te leiden is, een semi-logaritmisch verband vertonen. Uit figuur 21 volgt dat het veranderen van de pH tot hetzelfde resultaat leidt en dat geldt ook voor een verandering

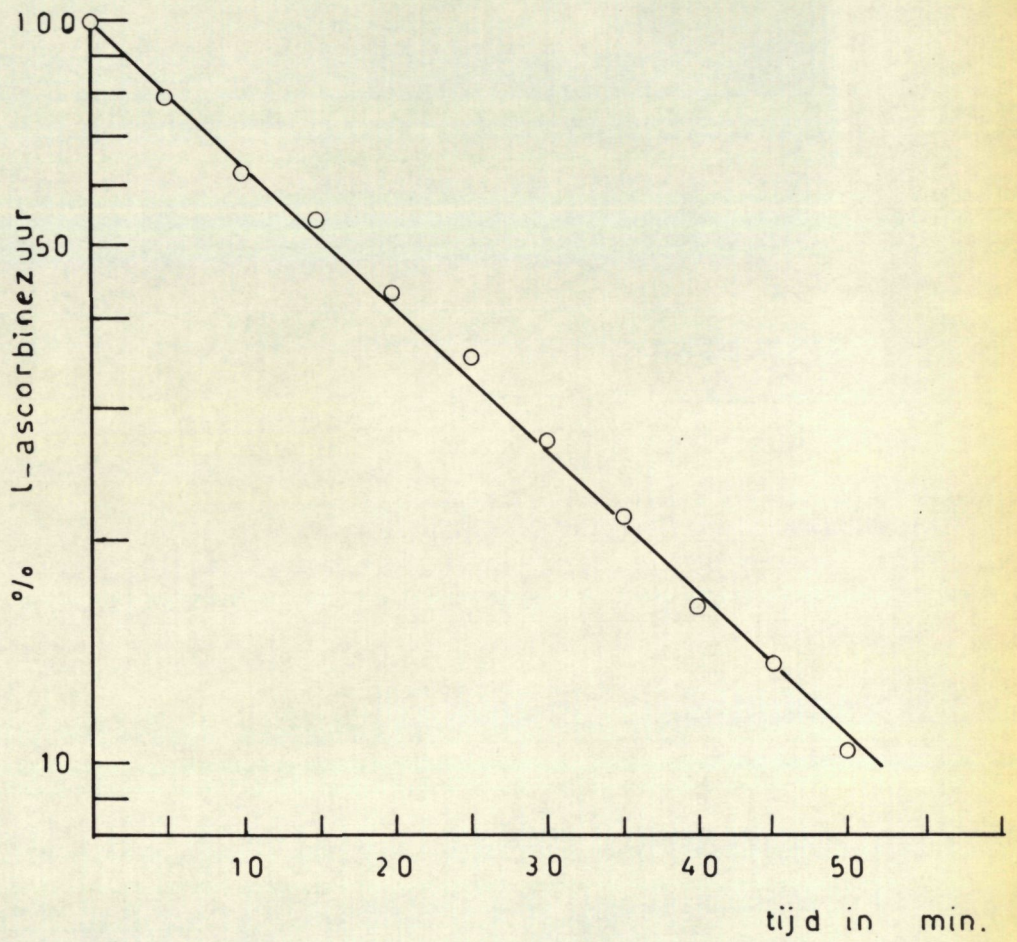


Fig 19 Experimenteel verband reaktieduur - concentratie l-ascorbinezuur, pH 6,7-6,8 , 5000 lx , 2,0 mg B<sub>2</sub> /liter , B I.

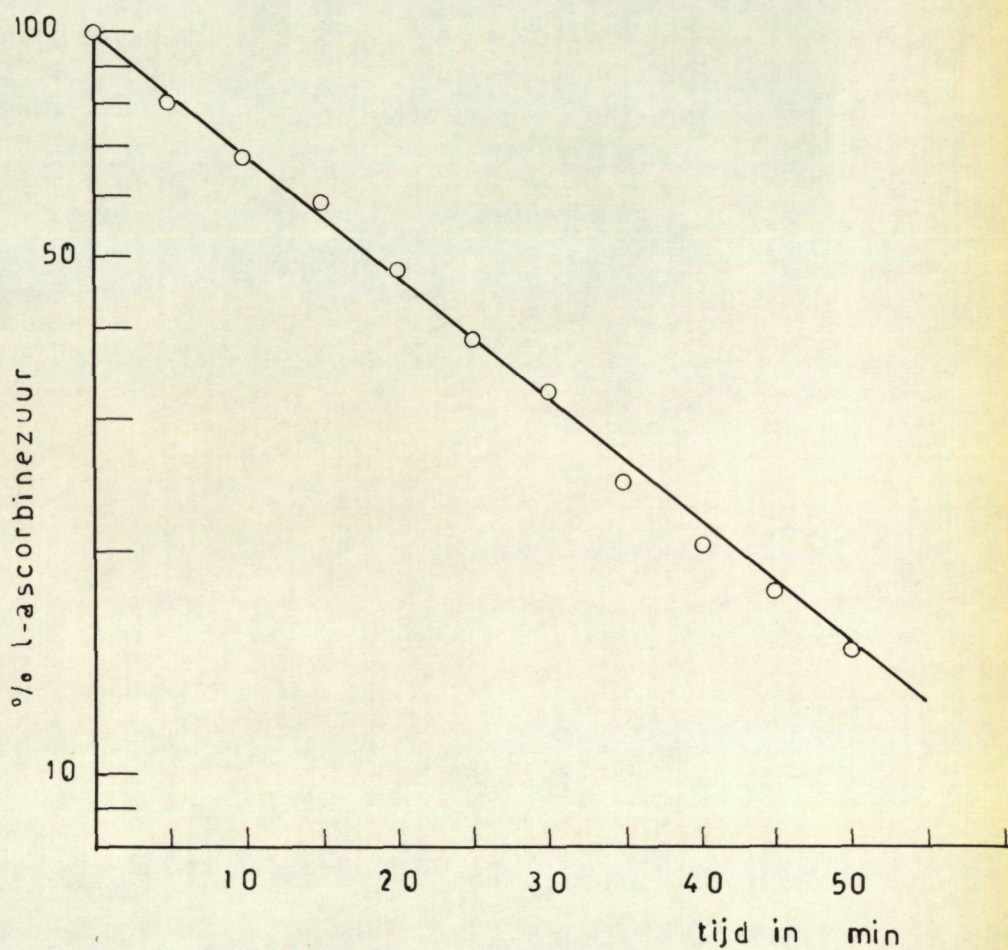


Fig 20 Experimenteel verband  
reaktieduur - concentratie l-ascorbinezuur, pH  
6,7-6,8, 5000 lx, 2,0 mg B<sub>2</sub> / liter, BI (E375)

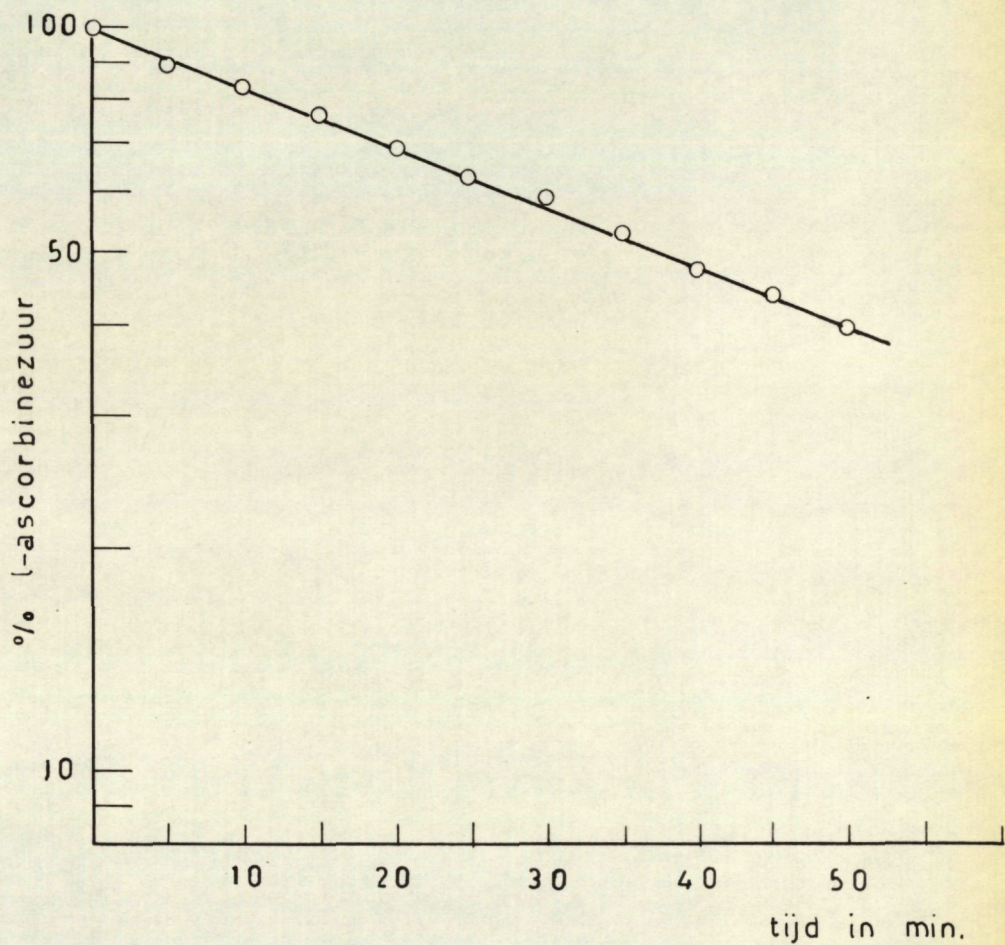


Fig 21 Experimenteel verband  
reaktieduur — concentratie l-ascorbinezuur,  
pH 4,1-4,2 , 5000 lx , 2,0 mg B<sub>2</sub> /liter,  
B I

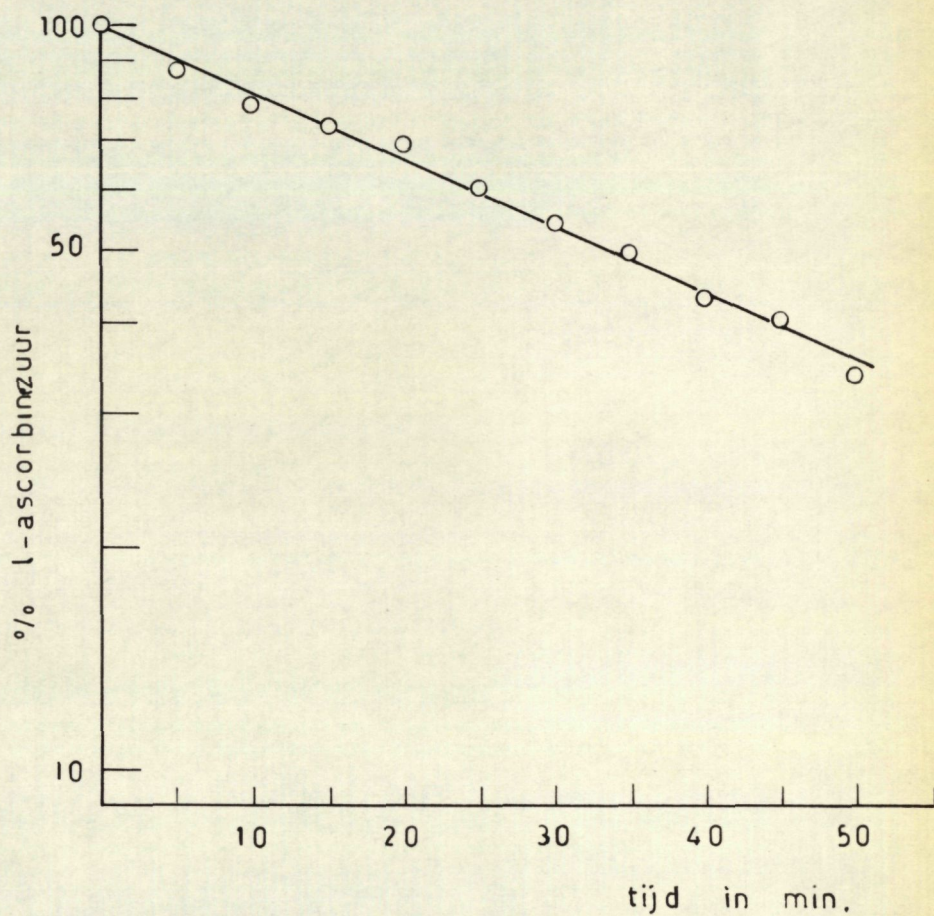


Fig 22 Experimenteel verband  
reaktieduur — konzentratie l-ascorbinezuur,  
pH 6,7—6,8, 5.000 lx, 1,0 mg B<sub>2</sub> /liter, B1

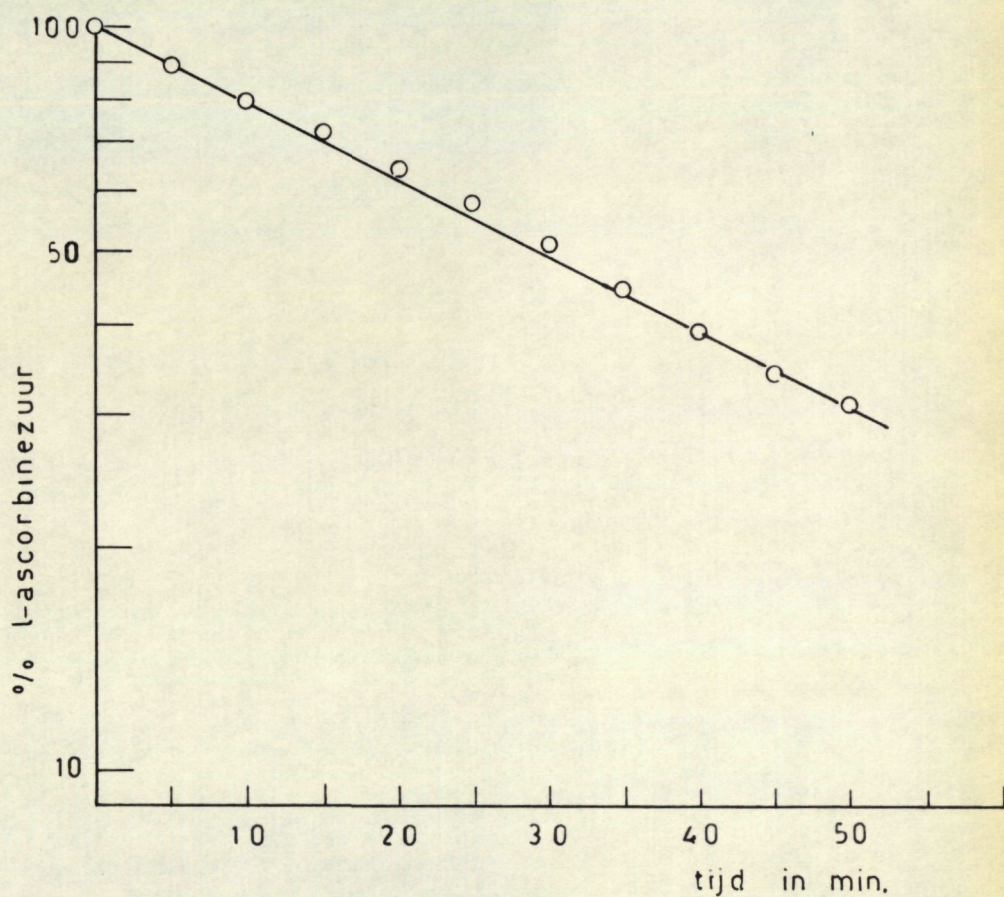


Fig 23 Experimenteel verband  
reaktieduur — konzentratie l-ascorbinezuur,  
pH 6,7 - 6,8, 5.000 lx, 2,0 mg B<sub>2</sub> /liter, B II

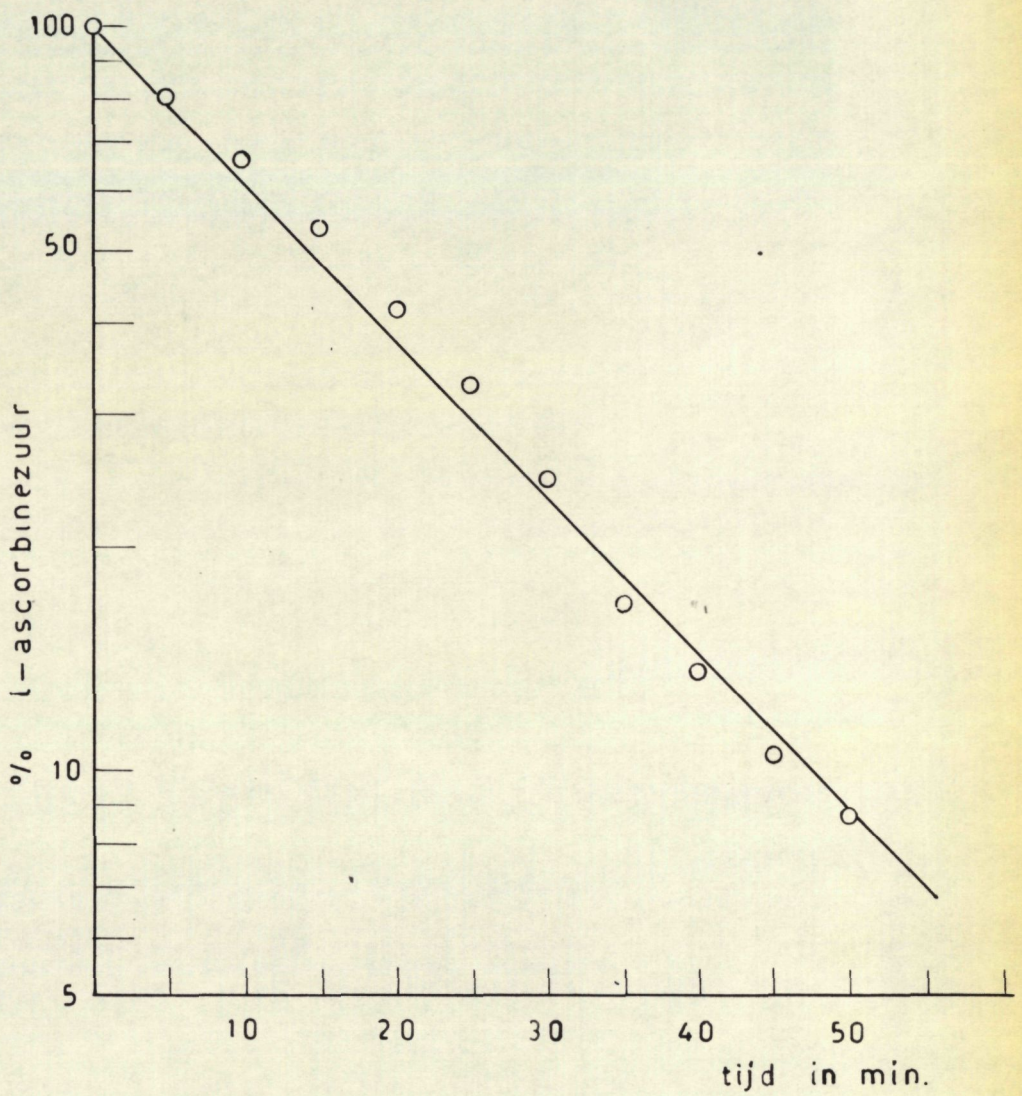


Fig 24 Experimenteel verband  
reaktieduur - concentratie l-ascorbinezuur,  
pH 6,7 - 6,8, 10,000 lx ; 2,0 mg B<sub>2</sub> /liter, BII



in de concentratie van de fotosensibilisator (figuur 22), voor de verandering van de belichtingsinstallatie (figuur 23) en voor de verandering van de belichtingsintensiteit (figuur 24).

Aan de hand van deze gegevens lijkt het verantwoord om de fotogesensibiliseerde omzetting van het l-ascorbinezuur tot het dehydro-l-ascorbinezuur als een reactie van de eerste orde te aanzien. Men vergelijkte daarmede figuur 4, waarin de resultaten weergegeven worden, die bekomen zijn met de titrimetrische analyse.

#### 3.4. Invloed van de gebruikte bufferbestanddelen.

Bij de studie van de fosfomolybdeenblauwmethode, meer bepaald bij het nagaan van de invloed van de pH van de testoplossing op de kleurvorming, zijn bepaalde moeilijkheden gerezen in verband met de stabiliteit van het l-ascorbinezuur. Bij het gebruik van de Clark & Lubs' buffers bleek het noodzakelijk om de oplossingen met een pH waarde hoger dan 5,0 te stabiliseren met behulp van complexerende verbindingen. Daar een ganse reeks van de uit te voeren experimenten bij dergelijke pH waarden zullen doorgaan, dient nagegaan te worden in welke mate rekening gehouden moet worden met deze nevenreactie.

Oplossingen met een concentratie van 20,0 mg l-ascorbinezuur per liter worden daartoe klaargemaakt bij de verschillende pH waarden en dit op de reeds beschreven wijze. De oplossingen worden overgebracht in bruine glazen flessen. De recipienten worden met meerdere lagen bruin inpakpapier omwikkeld. Na het opvullen van de flessen worden ze overgebracht in een donkere kamer, waarvan de temperatuur op 20° C geregeld is. Om de 15 minuten wordt een monster genomen en wordt de resterende concentratie aan het l-ascorbinezuur

bepaald met de fosfomolybdeenblauwmethode. De bekomen resultaten zijn weergegeven in tabel 24.

Tabel 24.- Destrukctie van het l-ascorbinezuur in gebufferde oplossingen bij een temperatuur van 20° C en beschermd tegen de invloed van het licht. Gemiddeld % l-ascorbinezuur terug gevonden bij n reeksen waarnemingen na t minuten bewaren.

pH	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
n	2	2	2	4	5	4	5
t	2	2	2	4	5	4	5
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
15	98,6	99,9	98,9	99,9	100,1	98,2	94,5
30	98,8	99,4	100,0	100,9	99,4	97,5	92,1
45	98,5	100,2	98,6	100,1	99,8	96,3	91,5
60	99,0	99,8	99,1	99,9	99,0	95,3	91,6
75	98,9	98,9	99,7	100,3	99,2	94,2	89,5
90	99,8	99,8	98,5	99,5	99,1	94,0	86,4
105	99,6	99,0	98,9	99,5	99,1	92,1	84,7
120	98,8	99,8	98,7	100,2	98,5	91,9	83,6

Deze waarnemingen bevestigen het feit dat een destabilisatie van het l-ascorbinezuur tot stand komt bij pH waarden hoger dan 5,0, en dat deze des te groter wordt naarmate de pH waarde hoger is. In tabel 25 wordt, voor de gegevens bekomen bij de analyse van oplossingen met pH 7,0, de reaktiesnelheidskonstante bepaald voor de nevenreactie. Daar een oplossing met pH 6,7 - 6,8 zowat als een standaardoplossing mag aanzien worden voor de beoogde studie van de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, worden de nodige gegevens voor

Tabel 25. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante voor de oxydatieve afbraak van het l-ascorbinezuur bij pH 7,0.

t	a - x	log (a - x)/a	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 45.900$
15	94,5	- 0,0246	
30	92,1	- 0,0357	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 31,6995
45	91,5	- 0,0386	
60	91,6	- 0,0381	k = 0,0016 min <sup>-1</sup>
75	89,5	- 0,0482	
90	86,4	- 0,0635	
105	84,7	- 0,0721	
120	83,6	- 0,0778	

Tabel 26. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur bij pH 6,7 - 6,8, 2,0 mg riboflavine per liter, 5.000 lx, BI, n = 5.

t	a - x	log (a - x)/a	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$
5	79,1	- 0,1018	
10	61,8	- 0,2090	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 186,2130
15	54,4	- 0,2644	
20	43,0	- 0,3655	k = 0,0446 min <sup>-1</sup>
25	34,7	- 0,4597	
30	26,8	- 0,5719	
35	21,5	- 0,6676	
40	16,1	- 0,7932	
45	13,3	- 0,8761	
50	10,4	- 0,9830	

het bepalen van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak bij een belichtingsintensiteit van 5.000 lx en een sensibilisator concentratie van 2,0 mg per liter samengevat in tabel 26.

Door de vergelijking van de reaktiesnelheidskonstante van de gekombineerde aktie van het licht en de sporen niet verwijderbare metaalionen met de reaktiesnelheidskonstante voor de afbraakreactie veroorzaakt door de sporen niet verwijderbare metaalionen, blijkt de eerst genoemde reaktiesnelheidskonstante nagenoeg 30 maal groter te zijn dan de tweede. Op grond van deze vaststelling lijkt het niet nodig een korrektie in te voeren. Volledig hiermede in overeenstemming zijn de resultaten, die weergegeven worden in tabel 27. Deze gegevens zijn bekomen geworden bij de fotogesensibiliseerde destructie van het l-ascorbinezuur bij pH 6,7 - 6,8, maar de fosfaatbuffer is hierbij vervangen geworden door een maleaatbuffer.

Tabel 27.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur bij pH 6,7 - 6,8, maleaatbuffer, B I, 5.000 lx, 2,0 mg riboflavine per liter,  $n = 2$ , diazomethode.

t	a - x	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$ $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ $= - 102,6900$ $k = 0,0453 \text{ min}^{-1}$
10	63,3	- 0,1986	
20	43,8	- 0,3585	
30	29,8	- 0,5258	
40	19,5	- 0,7100	
50	10,3	- 0,9872	

### 3.5. Invloed van de belichtingsinstallatie.

De afbraaksnelheid van het l-ascorbinezuur zal uiteraard afhangen van het aantal absorbeerbare fotonen dat het belichte oppervlak treft en in de vloeistof doordringt. Wanneer de beschikbare hoeveelheid lichtenergie limiterend is, zal de afbraaksnelheid omgekeerd evenredig variëren met de belichtingsdensiteit, dit is met het aantal absorbeerbare fotonen dat per eenheid van tijd in een eenheid van volume doordringt. In figuur 25 wordt het berekende verloop weergegeven voor de afbraak in de B I en de B II installatie onder dezelfde voorwaarden van belichtingsbron, belichtingsintensiteit, concentratie aan fotosensibilisator, pH waarde van de vloeistof en buffersamenstelling. Alleen de geometrische configuratie van de belichtingcellen is verschillend.

Uit het berekend verloop van de afbraaksnelheid zoals die weergegeven wordt in figuur 25 volgt, dat de reactiesnelheid groter is bij de grootste belichtingsdensiteit. Immers voor de B I inrichting worden nagenoeg 950 ml vloeistof aangewend in een kuvet, die een oppervlakte heeft van  $176,6 \text{ cm}^2$ . Hieruit volgt een belichtingsdensiteit van  $0,1855 \times$  fotonen. Voor de B II installatie worden 2.000 ml proefoplossing belicht doorheen een oppervlakte van  $200,0 \text{ cm}^2$ , zodat de belichtingsdensiteit gelijk wordt aan  $0,100 \times$  fotonen. De verhouding tussen deze beide waarden,  $1,86$ , weerspiegelt zeer goed de verhouding tussen de reactiesnelheidskonstanten zoals ze in latere paragrafen berekend worden, namelijk  $0,0451/0,0237 = 1,90$ .

Deze vaststelling houdt dus in dat alle absorbeerbare fotonen achterblijven in de bestraalde oplossingen, zoniet zou een invloed merkbaar zijn van de laagdikte. Met het feit dat de hoeveelheid bruikbare lichtenergie limiterend is bij de aangewende proef-

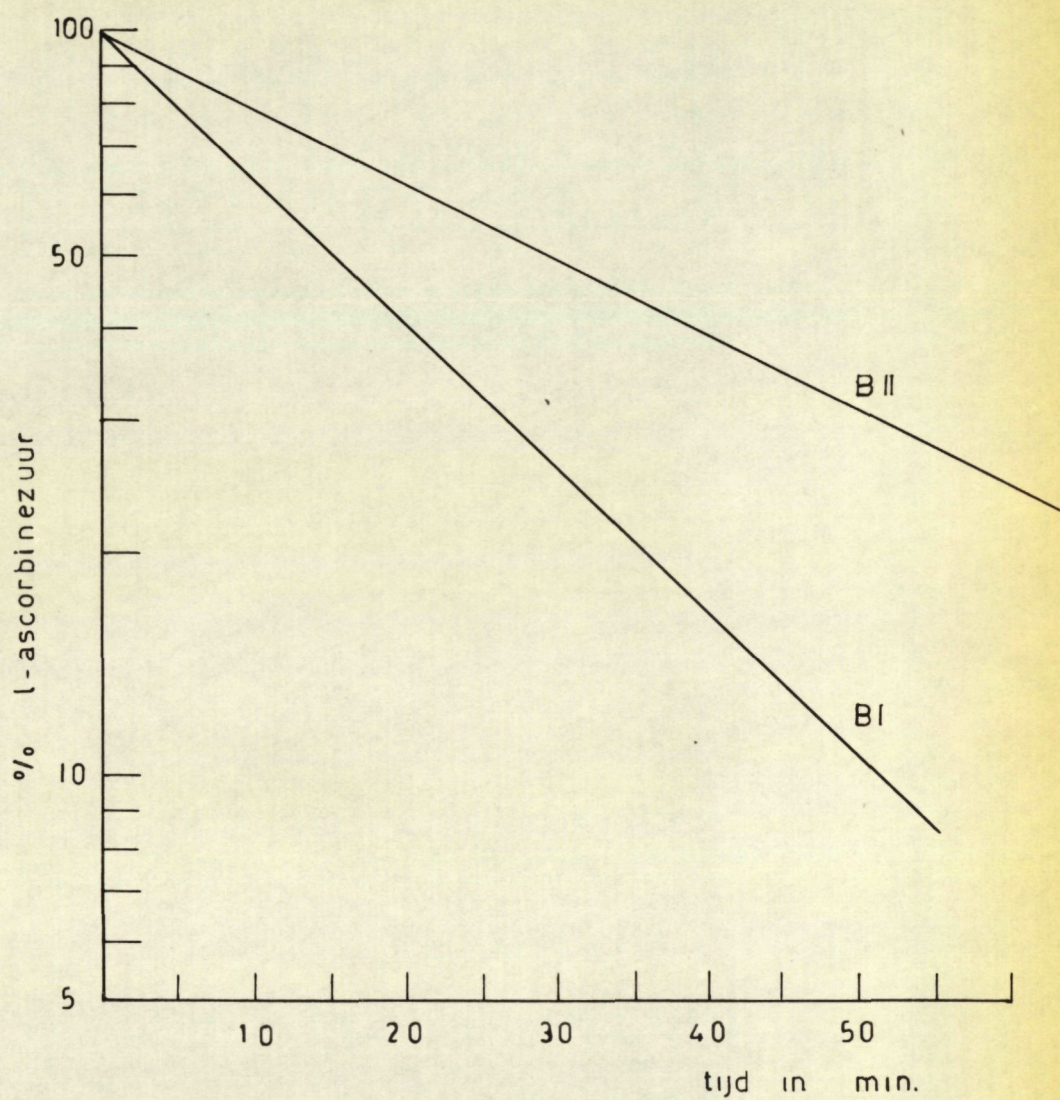


Fig 25 Berekend verloop van de  
 concentratie aan l-ascorbinezuur bij de fo-  
 tochemische destructie in de B I & B II,  
 2,0 mg B<sub>2</sub> / liter, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8

techniek zal bij de interpretatie van de bekomen kinetische gegevens uiteraard rekening dienen gehouden te worden.

### 3.6. Invloed van de pH op de reaktiesnelheid.

#### 3.6.1. Resultaten.

Met behulp van de B I installatie zijn proefoplossingen met 20,0 mg l-ascorbinezuur en 2,0 mg riboflavine per liter belicht geworden met een intensiteit van 5.000 lx. De oplossingen zijn op-gemaakt geworden met Clark & Lubs' buffers, met uitzondering van deze met een pH waarde van 4,1 - 4,2. In dit laatste geval bleek de toevoeging van de bufferbestanddelen overbodig, indien gebruik gemaakt wordt van de met ijsazijn gestabiliseerde sensibilisatoroplossing. De bekomen resultaten voor de verschillende pH waarden worden weergegeven in de hierna volgende tabellen 28 tot en met 39 terwijl een overzichtelijke samenvatting van alle resultaten gegeven wordt in tabel 40.

Tabel 28.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de foto-chemische destructie van het l-ascorbinezuur - pH 7,2 - fosfomolybdeenblauwmethode - n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$ $\sum [\log(a-x)/a] t =$ $- 171,0670$ $K_1 = 0,0409 \text{ min}^{-1}$
5	83,3	- 0,0794	
10	68,0	- 0,1675	
15	55,8	- 0,2534	
20	44,0	- 0,3526	
25	36,5	- 0,4377	
30	28,3	- 0,5462	
35	22,5	- 0,6470	
40	20,0	- 0,6990	
45	16,0	- 0,7959	
50	13,0	- 0,8861	

Tabel 29. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur - pH 6,7 - 6,8, diazomethode, n = 3.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$ $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ $= - 110,3850$ $k = 0,0462 \text{ min}^{-1}$
10	62,0	- 0,2076	
20	40,7	- 0,3904	
30	26,0	- 0,5850	
40	16,0	- 0,7959	
50	9,5	- 1,0223	

Tabel 30. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur - pH 5,6, fosfomolybdeenblauwmethode, n = 2.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$ $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ $= - 187,2455$ $k = 0,0448 \text{ min}^{-1}$
5	79,8	- 0,0980	
10	64,5	- 0,1904	
15	52,0	- 0,2840	
20	39,5	- 0,4034	
25	31,0	- 0,5086	
30	26,0	- 0,5850	
35	19,5	- 0,7100	
40	15,8	- 0,8013	
45	14,3	- 0,8447	
50	11,3	- 0,9469	



Tabel 31. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur - pH 5,4, diazomethode, n = 2.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$
10	41,5	- 0,3820	
20	36,3	- 0,4401	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 91,7190
30	30,3	- 0,5186	
40	22,0	- 0,6576	$k = 0,0384 \text{ min}^{-1}$
50	18,0	- 0,7447	

Tabel 32. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur - pH 5,0, diazomethode, n = 2.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$
10	59,0	- 0,2291	
20	44,3	- 0,3536	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 78,2350
30	37,3	- 0,4283	
40	26,3	- 0,5482	$k = 0,0328 \text{ min}^{-1}$
50	20,8	- 0,6819	

Tabel 33. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 4,6, diazomethode, n = 2.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$
10	67,5	- 0,1707	
20	54,0	- 0,2676	$\sum \left[ \log(a - x)/a \right] t$ = - 62,5870 k = 0,0262 min <sup>-1</sup>
30	46,3	- 0,3344	
40	35,0	- 0,4559	
50	28,5	- 0,5452	

Tabel 34. - Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 4,1 - 4,2, fosfomolybdeenblauw-methode, n = 4.

t	(a - x)	$\log(a - x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$
5	89,3	- 0,0491	
10	82,5	- 0,0835	$\sum \left[ \log(a - x)/a \right] t$ = - 77,9235 k = 0,0186 min <sup>-1</sup>
15	76,0	- 0,1192	
20	68,9	- 0,1618	
25	63,0	- 0,2007	
30	58,6	- 0,2321	
35	52,8	- 0,2774	
40	46,8	- 0,3298	
45	43,5	- 0,3615	
50	38,6	- 0,4134	

Tabel 35.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 3,5, fosfomolybdeenblauwmethode, n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	95,3	- 0,0209	
10	88,5	- 0,0531	$\sum t^2 = 9.625$
15	83,0	- 0,0768	
20	76,3	- 0,1175	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	72,0	- 0,1427	= - 58,0880
30	66,5	- 0,1772	
35	61,8	- 0,2090	$k = 0,0138 \text{ min}^{-1}$
40	57,5	- 0,2403	
45	52,0	- 0,2840	
50	49,3	- 0,3072	

Tabel 36.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 3,0, diazomethode, n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
10	91,0	- 0,0410	$\sum t^2 = 5.500$
20	85,8	- 0,0665	
30	82,5	- 0,0835	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
40	76,0	- 0,1192	= - 16,4480
50	71,0	- 0,1487	$k = 0,0069 \text{ min}^{-1}$

Tabel 37.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 2,5, diazomethode, n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$
10	94,0	- 0,0269	
20	91,8	- 0,0372	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 8,4060 k = 0,0035 min <sup>-1</sup>
30	89,0	- 0,0506	
40	87,0	- 0,0605	
50	85,5	- 0,0691	

Tabel 38.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 2,0, diazomethode, n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$
10	99,5	- 0,0022	
20	96,8	- 0,0141	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 3,2380 k = 0,0014 min <sup>-1</sup>
30	95,8	- 0,0186	
40	94,1	- 0,0264	
50	94,1	- 0,0264	

Tabel 39.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 1,2, diazomethode, n = 2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 5.500$  $\sum [\log(a-x)/a] t$ $= - 1,1590$ $k = 0,0005 \text{ min}^{-1}$
10	99,8	- 0,0009	
20	99,3	- 0,0031	
30	99,0	- 0,0044	
40	98,3	- 0,0074	
50	97,0	- 0,0132	

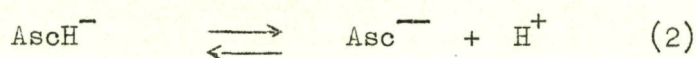
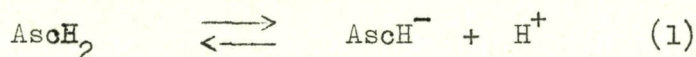
Tabel 40.- Samenvattende gegevens betreffende de invloed van de pH van de oplossing op de reaktiesnelheidskonstante van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur.

pH	$k \text{ min}^{-1}$	$k \text{ min}^{-1}$ (relatief)
1,2	0,0005	1,08
2,0	0,0014	3,03
2,5	0,0035	7,58
3,0	0,0069	14,94
3,5	0,0138	29,87
4,1 - 4,2	0,0186	40,26
4,6	0,0262	56,71
5,0	0,0328	71,00
5,4	0,0384	83,12
5,6	0,0448	96,97
6,7 - 6,8	0,0462	100,00
7,2	0,0409	88,53

## 3.6.2. Bespreking.

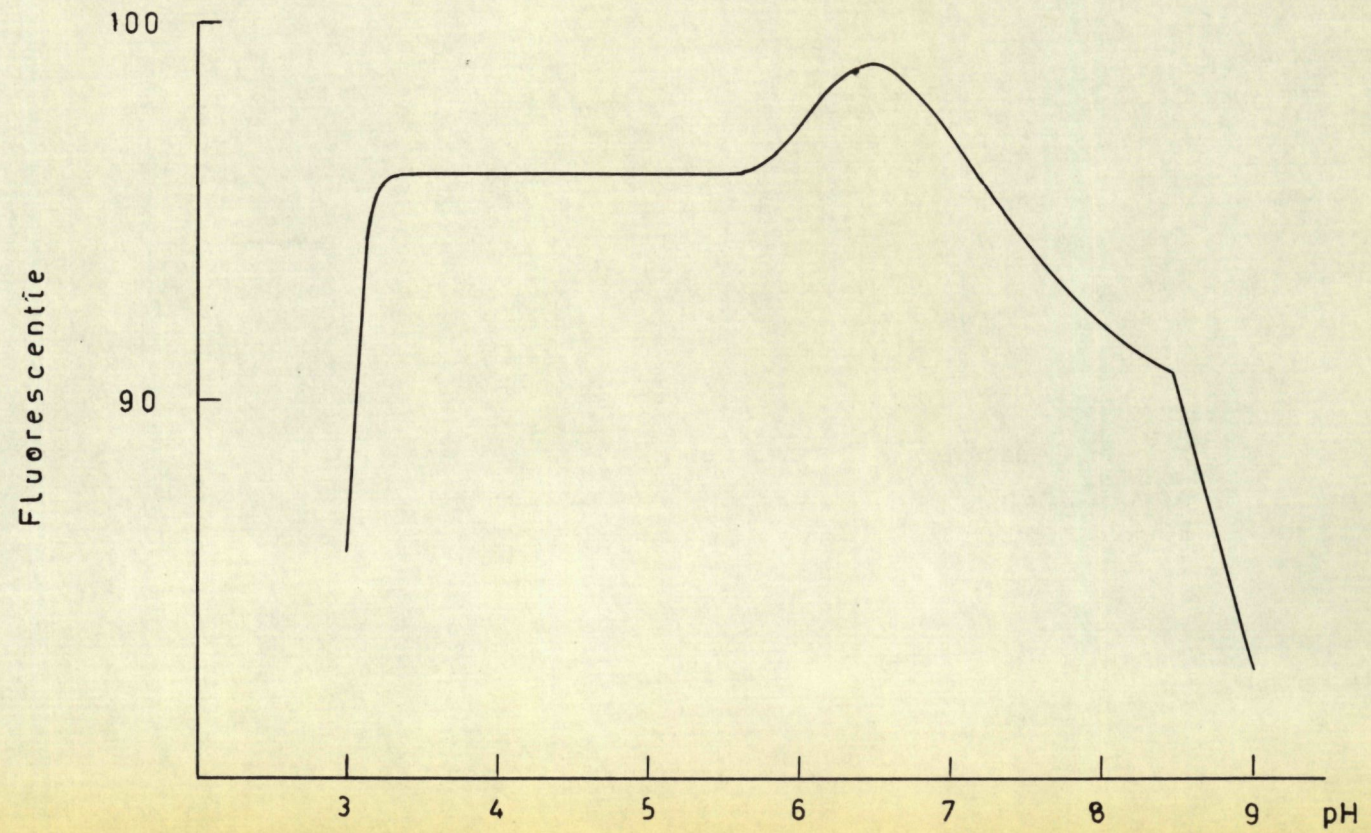
Bij de interpretatie van deze gegevens dient rekening gehouden te worden met twee feiten. In de eerste plaats is de oxydatie te beschouwen als een sekundair fotochemisch verschijnsel. De mate waarin dit fenomeen doorgaat kan afhankelijk zijn van de pH en zal naar alle waarschijnlijkheid een grote analogie vertonen ten opzichte van de mate waarin andere sekundaire fotochemische verschijnselen beïnvloed worden door deze faktor. De fluorescentie van de riboflavinemolekule in functie van de pH is uitvoerig bestudeerd geworden en zou volgens GSTIRNER (158) verlopen zoals weergegeven is in figuur 26. Bij lage pH waarden blijkt dit sekundaire fotochemische verschijnsel nagenoeg niet op te treden. Bij toenemende pH waarden neemt de destabilisatie van de riboflavine weinig toe, totdat de pH waarde 3,0 overschreden wordt. Op dit ogenblik neemt de fluorescentie nagenoeg sprongsgewijze toe tot een drempelwaarde, zodat de intensiteit van de fluorescentie tussen pH 3,5 en pH 7,0 nagenoeg onafhankelijk is van de pH waarde van de oplossing.

Een tweede aspekt waarmede rekening dient gehouden te worden, is het gedrag van de oendiolgroep in de l-ascorbinezuur molekule. Bij het oplossen van deze verbinding, ondergaan de twee OH groepen een dissociatie zodat volgende evenwichten zich instellen :



Deze dissociaties worden gekarakteriseerd door een  $pK_1$  waarde van 4,1 en een  $pK_2$  waarde van 11,8 (217). In het onderzochte pH interval speelt de tweede dissociatietrap nagenoeg geen rol. Voor de eerste dissociatie kan de verhouding tussen de éénmaal gedissocieerde en de

Fig 26 Invloed pH op de fluorescentie (GSTIRNER 158)



niet gedissocieerde vorm bepaald worden met behulp van de betrekking :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{(\text{AscH}^-)}{(\text{AscH}_2)}$$

Deze gegevens zijn vervat in tabel 41.

Wanneer nu rekening gehouden wordt enerzijds met de evolutie van de verhouding tussen de concentratie van de éénmaal gedissocieerde molekulen en de concentratie van de niet gedissocieerde vorm en anderzijds met de vrijwel konstante waarde voor het doorgaan van het sekundaire fotochemische verschijnsel van de fluorescentie in het pH gebied 3,5 tot 7,0, dan treedt het verwachte parallelisme tussen de beide fotochemische verschijnselen blijkbaar niet op. De bekomen resultaten tonen echter een treffende analogie tussen de concentratie aan het mono-ascorbaation en de reaktiesnelheidskonstante voor de gesensibiliseerde l-ascorbinezuurafbraak. De mate van de evolutie van de reaktiesnelheidskonstante en van de variatie van de concentratie aan het éénmaal gedissocieerde l-ascorbinezuur in functie van de pH wordt geïllustreerd door figuur 27. De belangrijke invloed van de dissociatie van het l-ascorbinezuur op de reaktiesnelheidskonstante komt hierbij zonder meer naar voor. Deze resultaten werden reeds vroeger gepubliceerd (218) en de fotochemische omzetting van het l-ascorbinezuur is dus blijkbaar analoog aan de oxydatieve omzetting onder de invloed van zware metaalionen (141).

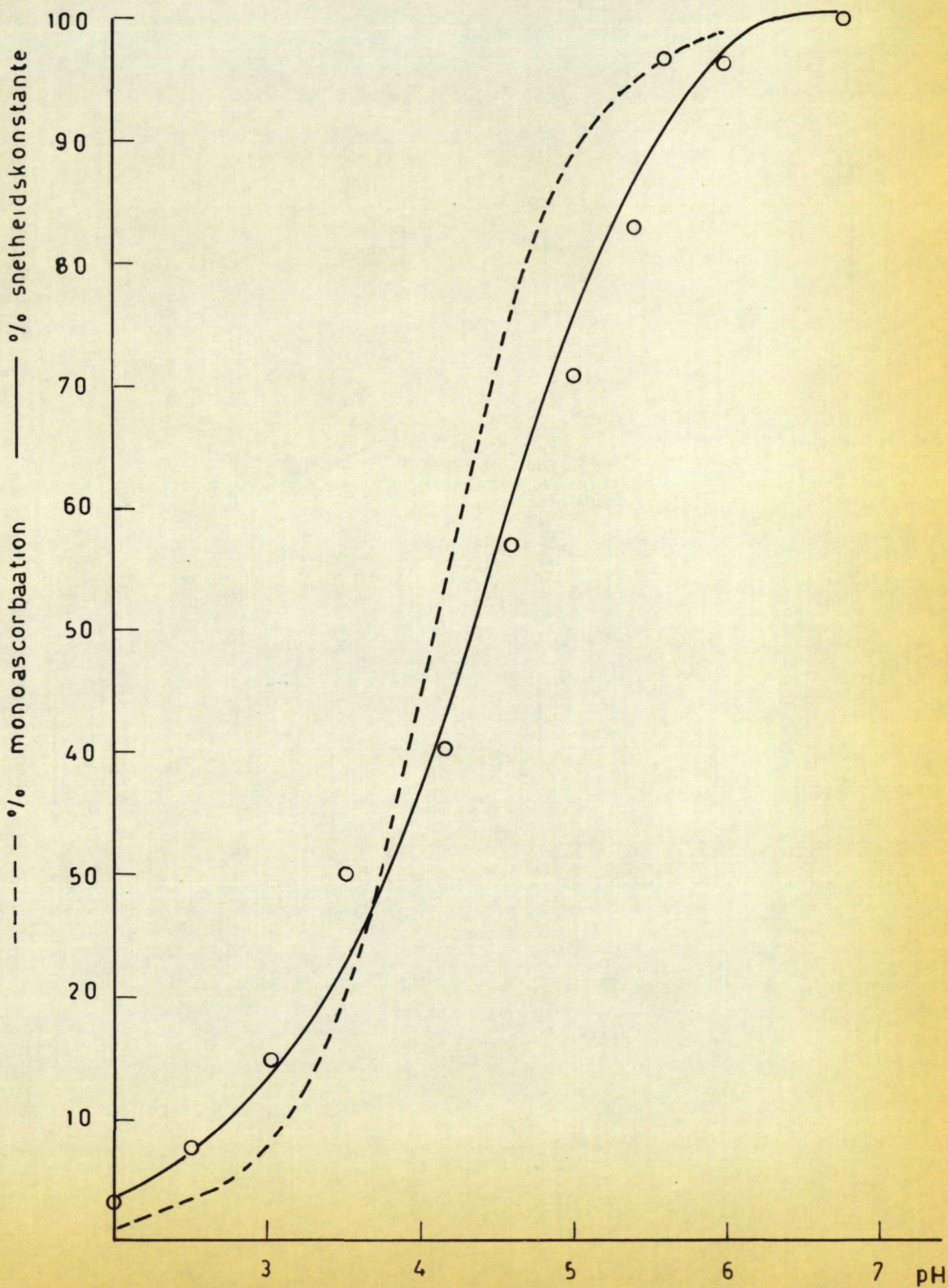
### 3.7. Invloed van de belichtingsintensiteit op de reaktiesnelheidskonstante.

#### 3.7.1. Resultaten.

Op grond van de algemene wetten van de fotochemie kan



Fig 27 Invloed van de pH op de  
dissociatie van het l ascorbinezuur en op de  
reaktiesnelheidskonstante



Tabel 41.- Invloed van de pH op de verhouding in de concentratie van het éénmaal gedissocieerde l-ascorbinezuur tot de concentratie van de niet gedissocieerde molekule.

pH	$(\text{AscH}^-)/(\text{AscH}_2)$	% $\text{AscH}^-$
2,0	0,008	0,8
2,5	0,025	2,4
3,0	0,080	7,4
3,4	0,199	16,6
3,6	0,316	24,0
3,8	0,501	33,3
4,0	0,794	44,3
4,2	1,26	55,7
4,4	2,00	66,7
4,6	3,16	75,9
4,8	5,02	83,4
5,0	7,95	88,8
5,2	12,6	92,6
5,4	20,0	95,2
5,6	31,6	96,9
5,8	50,2	98,0
6,0	73,5	98,7

vooropgezet worden, dat bij een verdubbelen van de belichtingsintensiteit de hoeveelheid opgenomen energie verdubbeld wordt en tengevolge hiervan de reaktiesnelheid van het fotochemisch gebeuren eveneens tweemaal zo groot zal zijn. Teneinde het bestaan van een dergelijk lineair verband tussen de reaktiesnelheid en de belichtingsintensiteit op te sporen, zijn experimenten uitgevoerd geworden met de B I installatie uitgerust met de E 375 en de argaphotolamp. De twee reeksen proeven leiden tot dezelfde konklusie, zodat hier alleen de reeks met de meeste waarnemingen behandeld wordt. De oplossingen bevatten 20,0 mg l-ascorbinezuur en 2,0 mg riboflavine per liter en zijn ingesteld geworden op pH 6,7 - 6,8 met behulp van Clark & Lubs' buffers. De resultaten en de daaruit berekende reaktiesnelheidskonstanten zijn weergegeven in de tabellen 42, 43, 44, 45 en 46. Deze gegevens zijn bekomen geworden met de E 375 als lichtbron.

Tabel 42.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 6,7 - 6,8, 3.000 lx, n = 4, BI, E 375, fosfomolybdeenblauw-methode.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$  $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t = -106,3805$  $k = 0,0254 \text{ min}^{-1}$
5	85,8	- 0,0665	
10	75,8	- 0,1203	
15	68,4	- 0,1649	
20	60,4	- 0,2190	
25	53,0	- 0,2757	
30	48,0	- 0,3188	
35	40,9	- 0,4283	
40	37,3	- 0,4283	
45	31,3	- 0,5045	
50	27,4	- 0,5622	

Tabel 43.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 6,7 - 6,8, 5.000 lx, n = 5, B I, E 375, fosfomolybdeenblauwmethode.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 9.625$ $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t = -162,3190$ $k = 0,0388 \text{ min}^{-1}$
5	80,3	- 0,0953	
10	68,4	- 0,1649	
15	58,6	- 0,2321	
20	47,5	- 0,3233	
25	38,3	- 0,4168	
30	32,5	- 0,4881	
35	24,5	- 0,6108	
40	20,0	- 0,6990	
45	17,5	- 0,7570	
50	14,6	- 0,8356	

Tabel 44.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 6,7 - 6,8, 7.500 lx, n = 4, B I, E 375, fosfomolybdeenblauwmethode.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 3.500$ $\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t = -96,0455$ $k = 0,0632 \text{ min}^{-1}$
5	73,1	- 0,1361	
10	52,2	- 0,2823	
15	37,5	- 0,4260	
20	25,4	- 0,5952	
25	17,6	- 0,7545	
30	16,0	- 0,7959	
35	12,5	- 0,9031	

Tabel 45.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 6,7 - 6,8, 10.000 lx, n = 4, fosfomolybdeenblauwmethode, B I, E 375.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 2.275$
5	64,2	- 0,1925	
10	43,1	- 0,3655	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 80,9500
15	28,0	- 0,5528	
20	16,9	- 0,7721	
25	13,1	- 0,8827	
30	9,6	- 0,0177	$k = 0,0819 \text{ min}^{-1}$

Tabel 46.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur, pH 6,7 - 6,8, 12.500 lx, n = 4, B I, E 375, fosfomolybdeenblauwmethode.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	$\sum t^2 = 1.375$
5	60,6	- 0,2175	
10	35,7	- 0,4473	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$ = - 57,2475
15	19,5	- 0,7100	
20	14,5	- 0,8386	
25	10,7	- 0,9706	
			$k = 0,0959 \text{ min}^{-1}$

## 3.7.2. Bespreking.

Wanneer een lineair verband bestaat tussen de reaktiesnelheidskonstante en de opgenomen hoeveelheid lichtenergie, dan zal dit verband beschreven worden door een vergelijking van de vorm :

$$y = a + bx$$

Hierin stelt  $y$  de reaktiesnelheidskonstante voor en, als maatstaf voor de lichtenergie, stelt  $x$  de belichtingsintensiteit voor. Met behulp van de reeds beschreven techniek van de kleinste kwadraten kan dan achtereenvolgens de waarde van het intercept  $a$  en de waarde van de richtingscoëfficiënt  $b$  bepaald worden. Bij het uitvoeren van de berekeningen worden de lichtsterkten eerst door duizend gedeeld. Men bekomt dan :

$\sum y^2$	=	0,02204526
$(\sum y)^2$	=	0,01214704
$(\sum y)^2/n$	=	0,00249408
$\sum x \sum y$	=	11,5976
$(\sum x)^2$	=	1.444,0
$\sum x \sum y/n$	=	2,31952
$(\sum x)^2/n$	=	288,8
$\bar{y}$	=	0,06102
$\bar{x}$	=	7,6000
$n \sum xy$	=	13,8100
$n \sum x^2$	=	1.732,5
$n$	=	5

waaruit volgt dat :

$$a = 0,002728$$

hetzij 0,00273

en

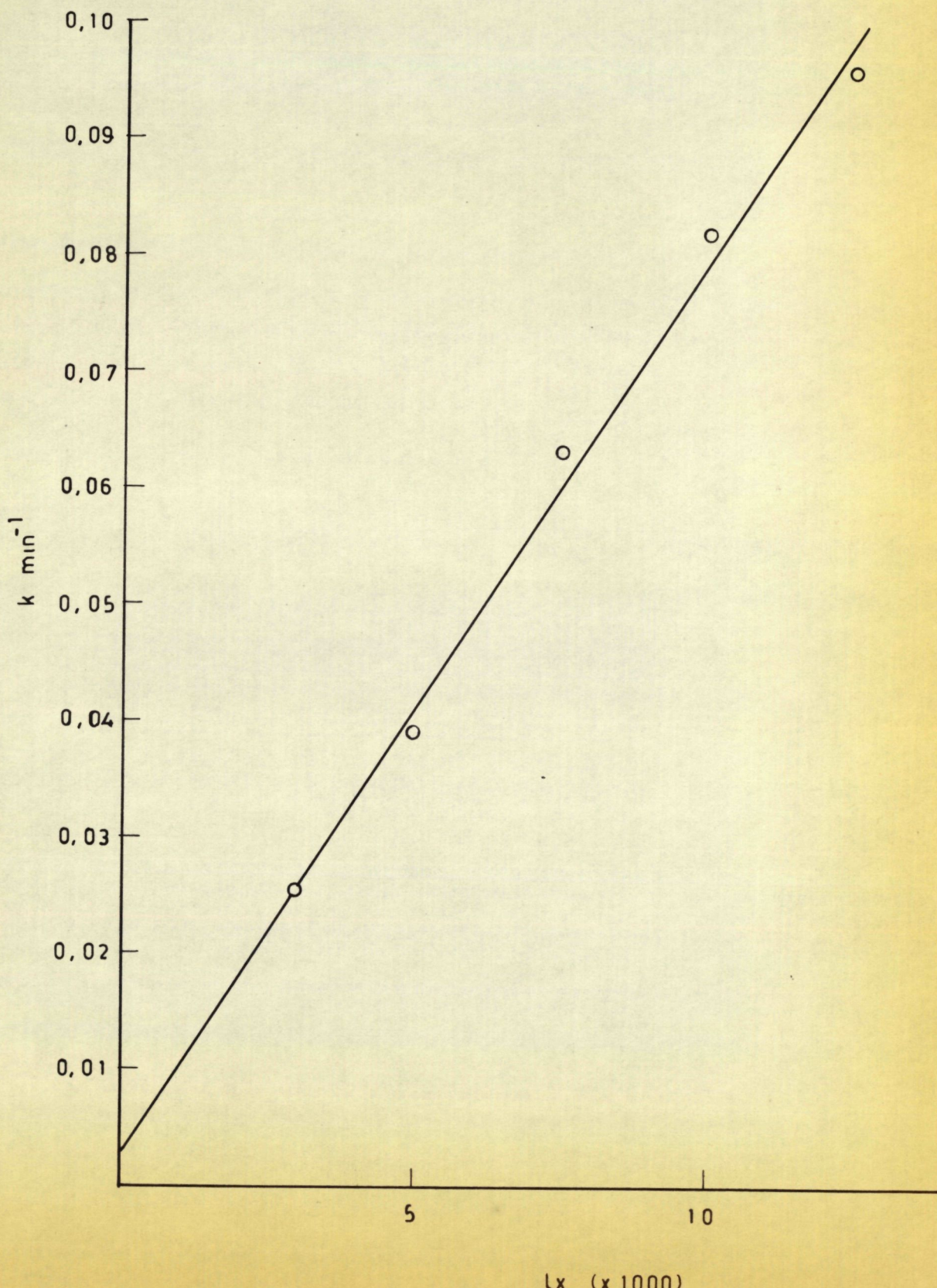
$$b = 0,00767$$

De berekende kurve en de experimentele punten worden weergegeven in figuur 28. Daar het intercept  $a$  niet gelijk is aan nul, zoals theoretisch mag vooropgesteld worden, kan door gebruik te maken van de  $t$  test nagegaan worden of de afwijking ten opzichte van de theoretische waarde accepteerbaar is op grond van de proeffouten. Met behulp van de berekende gegevens bepaald men dat :

$$\begin{aligned} (n-2)s^2 &= 0,016049326 \\ s^2 &= 0,005349775 \\ s &= 0,0732 \\ s_a &= 0,0802272 \\ t &= 0,00273/0,08 = 0,03 \end{aligned}$$

Daar de theoretische waarde van  $t$  met 3 vrijheidsgraden en 95 % betrouwbaarheid gelijk is aan 3,18, is de gevonden afwijking aanvaardbaar op grond van de proeffouten. In het licht van deze vaststelling kan verwezen worden naar de experimenten die uitgevoerd geworden zijn met de niet belichte oplossingen. Op grond van de gedane waarnemingen was beslist geworden geen korrektie toe te passen voor de storing, die veroorzaakt wordt door de niet verwijderbare zware metaalionen uit de fosfaten. De thans behandelde proeven tonen aan dat zelfs afwijkingen die bijna tweemaal zo groot zijn, als deze die toegeschreven kunnen worden aan de inwerking van deze metaalionen, nog binnen de proeffouten vallen. Zoals vooropgesteld geworden is, bestaat er tussen de reaktiesnelheidskonstante en de belichtingssterkte een lineair verband, dit althans in het onderzochte interval. De uitbreiding naar hogere belichtingsintensiteiten kon niet verder doorgevoerd worden, daar enerzijds de reaktie-

Fig 28 Verband tussen de reaktiesnelheidskonstante en de belichtingssterkte





snelheidskonstante bij 12.500 lx reeds zo groot is, dat het aantal waarnemingen per proef beperkt wordt en anderzijds omwille van de verhoging van de temperatuur, die met behulp van de instelbare kamertemperatuur niet meer te ondervangen is.

3.8. Invloed van de concentratie aan fotosensibilisator op de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische oxydatie van het l-ascorbinezuur.

Vier reeksen proeven zijn uitgevoerd geworden, zodat het mogelijk is om de invloed van de concentratie aan fotosensibilisator bij verschillende pH waarden van de proefoplossing, bij gebruik van de twee belichtingsinstallaties en bij verschillende belichtingsintensiteiten na te gaan. Alle concentratiebepalingen zijn gebeurd met behulp van de fosfomolybdeenblauwmethode, en de aanvangskoncentratie van het l-ascorbinezuur bedroeg voor alle experimenten 20,0 mg per liter. De temperatuur van de oplossingen bleef voor alle proeven begrepen tussen 19 en 22° C.

3.8.1. Invloed van de concentratie aan riboflavine op de reaktiesnelheidskonstante bij pH 6,7 - 6,8.

De oplossingen zijn op de normale manier bereid geworden met behulp van Clark & Lubs' buffers en zijn aan een belichting onderworpen geworden van 5.000 lx in de B I installatie die voorzien was van een argaphotolamp. De bekomen resultaten zijn samengevat in de tabellen 47 tot en met 52.

Tabel 47.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 0,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B I, 5.000 lx.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	89,3	- 0,0491	
10	85,3	- 0,0691	$\sum t^2 = 9.625$
15	80,3	- 0,0937	
20	74,8	- 0,1261	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	70,1	- 0,1543	= - 57,0950
30	67,0	- 0,1739	
35	60,8	- 0,2161	$k = 0,0137 \text{ min}^{-1}$
40	59,0	- 0,2291	
45	54,3	- 0,2652	
50	51,3	- 0,2899	

Tabel 48.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	87,3	- 0,0590	
10	77,8	- 0,1090	$\sum t^2 = 9.625$
15	73,8	- 0,1319	
20	69,3	- 0,1593	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	60,5	- 0,2182	= - 87,1300
30	54,0	- 0,2676	
35	49,5	- 0,3054	$k = 0,0208 \text{ min}^{-1}$
40	42,3	- 0,3737	
45	40,0	- 0,3979	
50	33,8	- 0,4711	

Tabel 49.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B I, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	84,1	- 0,0752	
10	75,0	- 0,1249	$\sum t^2 = 9.625$
15	65,3	- 0,1851	
20	56,1	- 0,2510	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	50,8	- 0,2941	$= - 119,8385$
30	44,0	- 0,3565	
35	38,0	- 0,4202	$k = 0,0287 \text{ min}^{-1}$
40	30,6	- 0,5143	
45	26,8	- 0,5719	
50	23,6	- 0,6271	

Tabel 50.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,5 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	85,0	- 0,0706	
10	73,5	- 0,1337	$\sum t^2 = 9.625$
15	61,8	- 0,2090	
20	52,8	- 0,2774	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	42,0	- 0,3768	$= - 150,9505$
30	34,5	- 0,4622	
35	28,8	- 0,5406	$k = 0,0361 \text{ min}^{-1}$
40	24,0	- 0,6198	
45	19,8	- 0,7033	
50	14,5	- 0,8386	

Tabel 51.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	84,5	- 0,0731	
10	68,5	- 0,1643	$\sum t^2 = 9.625$
15	56,0	- 0,2518	
20	46,8	- 0,3298	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	36,8	- 0,4342	= - 174,1770
30	29,0	- 0,5376	
35	23,8	- 0,6234	$k = 0,0417 \text{ min}^{-1}$
40	19,0	- 0,7212	
45	16,0	- 0,7959	
50	10,8	- 0,9666	

Tabel 52.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 4,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	82,5	- 0,0835	
10	65,8	- 0,1818	$\sum t^2 = 9.625$
15	52,8	- 0,2774	
20	42,8	- 0,3697	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	31,8	- 0,4976	= - 187,7285
30	26,8	- 0,5718	
35	19,5	- 0,7100	
40	15,8	- 0,8013	$k = 0,0449 \text{ min}^{-1}$
45	13,5	- 0,8696	
50	10,8	- 0,9666	

3.8.2. Invloed van de concentratie aan riboflavine op de reactiesnelheidskonstante bij pH 4,1 - 4,2.

De oplossingen zijn klaar gemaakt geworden met behulp van gedistilleerd water. Na het toevoegen van de nodige hoeveelheid fotosensibilisator, opgemaakt volgens de A.V.C. voorschriften en het oplossen van 20,0 mg l-ascorbinezuur vertoont de oplossing een pH waarde van 4,1 - 4,2. De belichtingen zijn doorgevoerd geworden met behulp van de B I installatie die voorzien was van een argaphotolamp. De ingestelde belichtingsintensiteit bedroeg 5.000 lx en de fosfomolybdeenblauwmethode is aangewend geworden voor de analyses. De bekomen resultaten zijn samengevat in de tabellen 53 tot en met 58.

Tabel 53.- Bepaling van de reactiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 0,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	97,0	- 0,0133	
10	91,0	- 0,0410	$\sum t^2 = 9.625$
15	89,0	- 0,0508	
20	86,0	- 0,0656	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
25	82,8	- 0,0821	= - 30,3995
30	81,0	- 0,0917	
35	78,8	- 0,1035	$k = 0,0073 \text{ min}^{-1}$
40	75,5	- 0,1222	
45	71,8	- 0,1440	
50	69,0	- 0,1611	

Tabel 54.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	92,5	- 0,0338	
10	86,0	- 0,0656	
15	81,0	- 0,0917	$\sum t^2 = 9.625$
20	77,8	- 0,1089	
25	73,8	- 0,1319	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	69,0	- 0,1611	= - 49,9805
35	67,5	- 0,1706	
40	63,5	- 0,1973	$k = 0,0120 \text{ min}^{-1}$
45	58,3	- 0,2343	
50	54,8	- 0,2613	

Tabel 55.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,5 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	91,0	- 0,0410	
10	83,8	- 0,0766	
15	80,3	- 0,0952	$\sum t^2 = 9.625$
20	74,3	- 0,1291	
25	69,5	- 0,1581	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	65,8	- 0,1818	= - 62,292
35	60,0	- 0,2219	
40	55,5	- 0,2558	$k = 0,0149 \text{ min}^{-1}$
45	51,3	- 0,2898	
50	46,0	- 0,3373	

Tabel 56.- Bepaling van de reactiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,0 mg riboflavine/liter, n = 4, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	89,3	- 0,0491	
10	82,5	- 0,0835	
15	76,0	- 0,1192	$\sum t^2 = 9,625$
20	68,9	- 0,1618	
25	63,0	- 0,2007	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	58,6	- 0,2321	= - 77,9235
35	52,8	- 0,2774	
40	46,8	- 0,3298	$k = 0,0186 \text{ min}^{-1}$
45	43,5	- 0,3615	
50	38,6	- 0,4134	

Tabel 57.- Bepaling van de reactiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	87,8	- 0,0565	
10	80,8	- 0,0927	
15	72,3	- 0,1408	$\sum t^2 = 9,625$
20	67,0	- 0,1741	
25	57,8	- 0,2381	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	52,5	- 0,2799	= - 92,7510
35	47,5	- 0,3233	
40	40,3	- 0,3946	$k = 0,0222 \text{ min}^{-1}$
45	37,3	- 0,4283	
50	31,3	- 0,5045	

Tabel 58.- Bepaling van de reactiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 4,0 mg riboflavine/liter, n = 2, B I, 5.000 lx, pH 4,1 - 4,2.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	89,5	- 0,0481	
10	78,3	- 0,1062	
15	71,8	- 0,1440	$\sum t^2 = 9.625$
25	63,8	- 0,1951	
25	59,3	- 0,2269	$\sum \left[ \frac{\log(a-x)}{a} \right] t$
30	51,8	- 0,2858	= - 92,9220
35	45,0	- 0,3467	
40	40,8	- 0,3893	$k = 0,0222 \text{ min}^{-1}$
45	36,8	- 0,4341	
50	33,0	- 0,4814	

3.8.3. Invloed van de concentratie aan riboflavine op de reactiesnelheidskonstante bij pH 6,7 - 6,8 en een belichtingsintensiteit van 10.000 lx.

De oplossingen zijn belicht geworden in de B II inrichting uitgerust met een argaphotolamp, die voorzien was van een inwendige spiegel. De oplossingen zijn klaargemaakt geworden met behulp van de Clark & Lubs' buffers, de aanvangskoncentratie van het l-ascorbinezuur bedroeg 20,0 mg per liter en de oplossingen werden onderzocht met behulp van de fosfomolybdeenblauwmethode. De bekomen resultaten zijn samengevat in de tabellen 59 tot en met 65.



Tabel 59.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 0,5 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	91,5	- 0,0386	
10	86,8	- 0,0615	
15	81,7	- 0,0878	$\sum t^2 = 9.625$
20	76,3	- 0,1175	
25	69,8	- 0,1618	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	63,4	- 0,1979	= - 63,1670
35	59,5	- 0,2255	
40	54,5	- 0,2636	$k = 0,0151 \text{ min}^{-1}$
45	49,4	- 0,3063	
50	46,8	- 0,3298	

Tabel 60.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,0 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	88,2	- 0,0545	
10	76,3	- 0,1175	
15	68,5	- 0,1643	$\sum t^2 = 9.625$
20	60,4	- 0,2190	
25	52,9	- 0,2765	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	46,1	- 0,3363	= - 113,6735
35	39,9	- 0,3990	
40	34,1	- 0,4672	$k = 0,0272 \text{ min}^{-1}$
45	28,6	- 0,5436	
50	23,7	- 0,6253	

Tabel 61.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,5 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	83,3	- 0,0794	
10	71,9	- 0,1433	
15	59,3	- 0,2269	$\sum t^2 = 9.625$
20	50,3	- 0,2984	
25	40,7	- 0,3904	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	33,9	- 0,4698	= - 161,3625
35	26,6	- 0,5751	
40	21,2	- 0,6737	$k = 0,0386 \text{ min}^{-1}$
45	16,6	- 0,7799	
50	13,1	- 0,8827	

Tabel 62.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,0 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	81,1	- 0,0910	
10	66,4	- 0,1778	
15	54,2	- 0,2660	$\sum t^2 = 9.625$
20	41,8	- 0,3788	
25	32,9	- 0,4828	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	24,5	- 0,6108	= - 203,7635
35	16,7	- 0,7773	
40	13,3	- 0,8761	$k = 0,0488 \text{ min}^{-1}$
45	10,5	- 0,9788	
50	8,6	- 1,0655	

Tabel 63.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,5 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	78,0	- 0,1079	
10	62,8	- 0,2020	
15	49,7	- 0,3036	$\sum t^2 = 9.625$
20	37,6	- 0,4248	
25	27,6	- 0,5591	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	19,9	- 0,7011	= - 226,9730
35	14,7	- 0,8327	
40	11,1	- 0,9547	$k = 0,0543 \text{ min}^{-1}$
45	8,3	- 1,0809	
50	6,2	- 1,2076	

Tabel 64.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,0 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	75,2	- 0,1238	
10	61,2	- 0,2132	
15	48,0	- 0,3188	$\sum t^2 = 9.625$
20	35,7	- 0,4473	
25	26,7	- 0,5735	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	19,4	- 0,7122	= - 231,0115
35	14,4	- 0,8416	
40	10,8	- 0,9666	$k = 0,0553 \text{ min}^{-1}$
45	8,2	- 1,0862	
50	5,8	- 1,2366	

Tabel 65.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,5 mg riboflavine/liter, n = 5, B II, 10.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	77,7	- 0,1096	
10	61,1	- 0,2140	
15	48,1	- 0,3179	$\sum t^2 = 9.625$
20	34,4	- 0,4634	
25	24,6	- 0,6091	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	17,8	- 0,7496	= - 246,0470
35	13,0	- 0,8861	
40	9,4	- 1,0269	$k = 0,0589 \text{ min}^{-1}$
45	6,6	- 1,1805	
50	4,7	- 1,3279	

3.8.4. Invloed van de concentratie aan riboflavine op de reaktiesnelheidskonstante bij pH 6,7 - 6,8 bij een belichtingsintensiteit van 5.000 lx in de B II installatie.

De oplossingen zijn klaargemaakt geworden op de gewone manier en zijn belicht geworden in de B II inrichting. Als lichtbron werd gebruik gemaakt van een argaphotolamp voorzien van een inwendige spiegel. De oplossingen zijn onderzocht geworden op hun gehalte aan l-ascorbinezuur met behulp van de fosfomolybdeenblauw-methode en de bekomen resultaten zijn samengevat in de tabellen 66 tot en met 72.

Tabel 66.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 0,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	92,7	- 0,0329	
10	90,3	- 0,0443	
15	87,1	- 0,0605	$\sum t^2 = 9.625$
20	83,0	- 0,0808	
25	78,9	- 0,1029	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	75,7	- 0,1209	= - 37,9845
35	72,8	- 0,1379	
40	69,5	- 0,1580	$k = 0,0091 \text{ min}^{-1}$
45	66,7	- 0,1759	
50	64,3	- 0,1918	

Tabel 67.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,0 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	93,1	- 0,0311	
10	86,0	- 0,0655	
15	81,1	- 0,0910	$\sum t^2 = 9.625$
20	76,5	- 0,1163	
25	69,3	- 0,1593	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	63,5	- 0,1972	= - 66,4600
35	57,4	- 0,2411	
40	52,5	- 0,2798	$k = 0,0159 \text{ min}^{-1}$
45	48,6	- 0,3134	
50	43,0	- 0,3665	

Tabel 68.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 1,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	89,4	- 0,0487	
10	82,3	- 0,0846	
15	75,1	- 0,1244	$\sum t^2 = 9.625$
20	69,1	- 0,1605	
25	60,9	- 0,2154	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	56,2	- 0,2503	= - 83,5300
35	49,2	- 0,3045	
40	45,2	- 0,3449	$k = 0,0200 \text{ min}^{-1}$
45	40,4	- 0,3936	
50	35,8	- 0,4461	

Tabel 69.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,0 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	87,7	- 0,0570	
10	77,5	- 0,1107	
15	70,5	- 0,1518	$\sum t^2 = 9.625$
20	63,5	- 0,1972	
25	55,8	- 0,2534	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	51,4	- 0,2890	= - 99,5660
35	44,9	- 0,3478	
40	39,3	- 0,4056	$k = 0,0238 \text{ min}^{-1}$
45	33,9	- 0,4698	
50	28,3	- 0,5482	

Tabel 70.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 2,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	89,8	- 0,0467	
10	78,8	- 0,1035	
15	72,5	- 0,1397	$\sum t^2 = 9.625$
20	63,1	- 0,2000	
25	54,2	- 0,2660	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	49,7	- 0,3036	= - 106,6075
35	42,4	- 0,3726	
40	36,1	- 0,4425	$k = 0,0255 \text{ min}^{-1}$
45	31,4	- 0,5031	
50	25,0	- 0,6021	

Tabel 71.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,0 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	$\log(a-x)/a$	
0	100,0	0,0000	
5	88,3	- 0,0540	
10	78,6	- 0,1046	
15	68,6	- 0,1637	$\sum t^2 = 9.625$
20	61,3	- 0,2125	
25	52,7	- 0,2782	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	46,0	- 0,3372	= - 113,4245
35	40,2	- 0,3958	
40	34,2	- 0,4660	$k = 0,0271 \text{ min}^{-1}$
45	28,3	- 0,5482	
50	23,8	- 0,6234	

Tabel 72.- Bepaling van de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische afbraak van het l-ascorbinezuur, 3,5 mg riboflavine/liter, n = 3, B II, 5.000 lx, pH 6,7 - 6,8.

t	(a-x)	log(a-x)/a	
0	100,0	0,0000	
5	91,7	- 0,0376	
10	82,3	- 0,0846	
15	71,9	- 0,1433	$\sum t^2 = 9.625$
20	62,5	- 0,2041	
25	53,5	- 0,2716	$\sum \left[ \log(a-x)/a \right] t$
30	44,1	- 0,3556	= - 118,9190
35	37,5	- 0,4260	
40	31,8	- 0,4976	$k = 0,0285 \text{ min}^{-1}$
45	25,9	- 0,5867	
50	21,9	- 0,6596	

### 3.8.5. Bespreking.

Teneinde een vergelijking mogelijk te maken tussen de vier reeksen experimenten worden de resultaten op een zelfde basis uitgedrukt. Daarvoor worden de gevonden experimentele waarden voor de reaktiesnelheidskonstante bij 3,5 mg riboflavine per liter gelijk gesteld aan 100,0 voor de twee laatste proeven. Bij de twee eerste reeksen wordt de waarde bij 3,5 mg riboflavine bekomen door een grafische interpolatie en deze waarde wordt eveneens gelijk gesteld aan 100,0. De aldus berekende resultaten zijn samengevat in tabel 73.



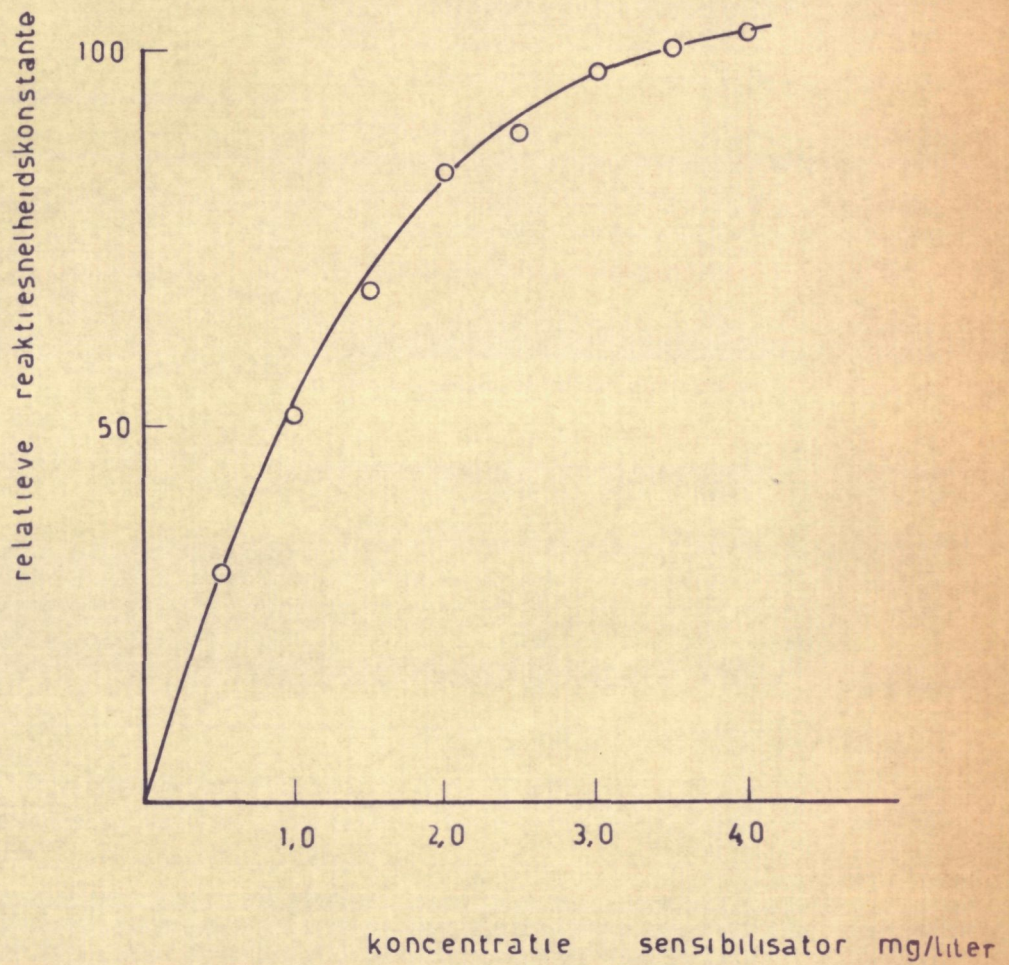
Tabel 73.- Relatieve reaktiesnelheidskonstanten onder diverse belichtingsvoorwaarden gevonden en hun verband met de evolutie van de concentratie van de sensibilisator.

Riboflavine mg/liter	Reeks I	Reeks II	Reeks III	Reeks IV	Gemiddelde
0,5	31,9	32,9	25,6	31,9	30,6
1,0	48,4	54,1	46,1	55,8	51,1
1,5	66,7	67,1	65,5	70,2	67,4
2,0	-	83,8	82,3	83,5	83,4
2,5	84,0	-	92,2	89,5	88,6
3,0	97,0	100,0	93,9	95,1	96,5
3,5	(100,0)	(100,0)	100,0	100,0	100,0
4,0	104,4	100,0	-	-	102,2

Wanneer rekening gehouden wordt met de grote **ac**cepteerbare proeffouten, dan lijkt het verantwoord om bij de vier reeksen een gelijkwaardig verloop te aanvaarden voor wat betreft het verband tussen de evolutie van de reaktiesnelheidskonstante in functie van de concentratie aan riboflavine ongeacht de aangewende proefomstandigheden. De gemiddelde waarde zal derhalve de meest betrouwbare schatting zijn van de te verwachten relatieve reaktiesnelheidskonstante in verband met de concentratie van de sensibilisator, wat ook de belichtingsintensiteit, de pH of de belichtingsinstallatie is.

In figuur 29 zijn de bekomen gegevens grafisch weergegeven in een lineair assenstelsel. Bij de lage concentraties aan riboflavine wordt een lineair verband benaderd tussen de evolutie in de concentratie van de fotosensibilisator en de evolutie van de relatieve reaktiesnelheidskonstante. Maar vrij snel treedt er een afvlakken op. Aan de hand van de bekomen waarnemingen is het echter

Fig 29 Verband tussen de relatieve reaktiesnelheidskonstante en de concentratie van de sensibilisator



niet mogelijk om uit te maken of de reaktiesnelheidskonstante ooit volledig onafhankelijk wordt van de sensibilisatorconcentratie. Er dient uiteraard rekening gehouden te worden met de mogelijkheid dat, onder de invloed van de geactiveerde riboflavinemolekulen uit het water waterstofperoxyde gevormd wordt. Deze verbinding zou een chemische oxydatie van het l-ascorbinezuur kunnen veroorzaken, zodat de destructiesnelheid van het l-ascorbinezuur geleidelijk zou kunnen blijven toenemen in grootte, ondanks het feit dat de reaktiesnelheid voor het gesensibiliseerde proces een maximale waarde heeft. Het is echter met behulp van de bekomen gegevens niet zonder meer mogelijk om een riboflavineconcentratie aan te duiden waarbij de reaktiesnelheidskonstante van het fotochemische proces een maximale waarde bereikt heeft.

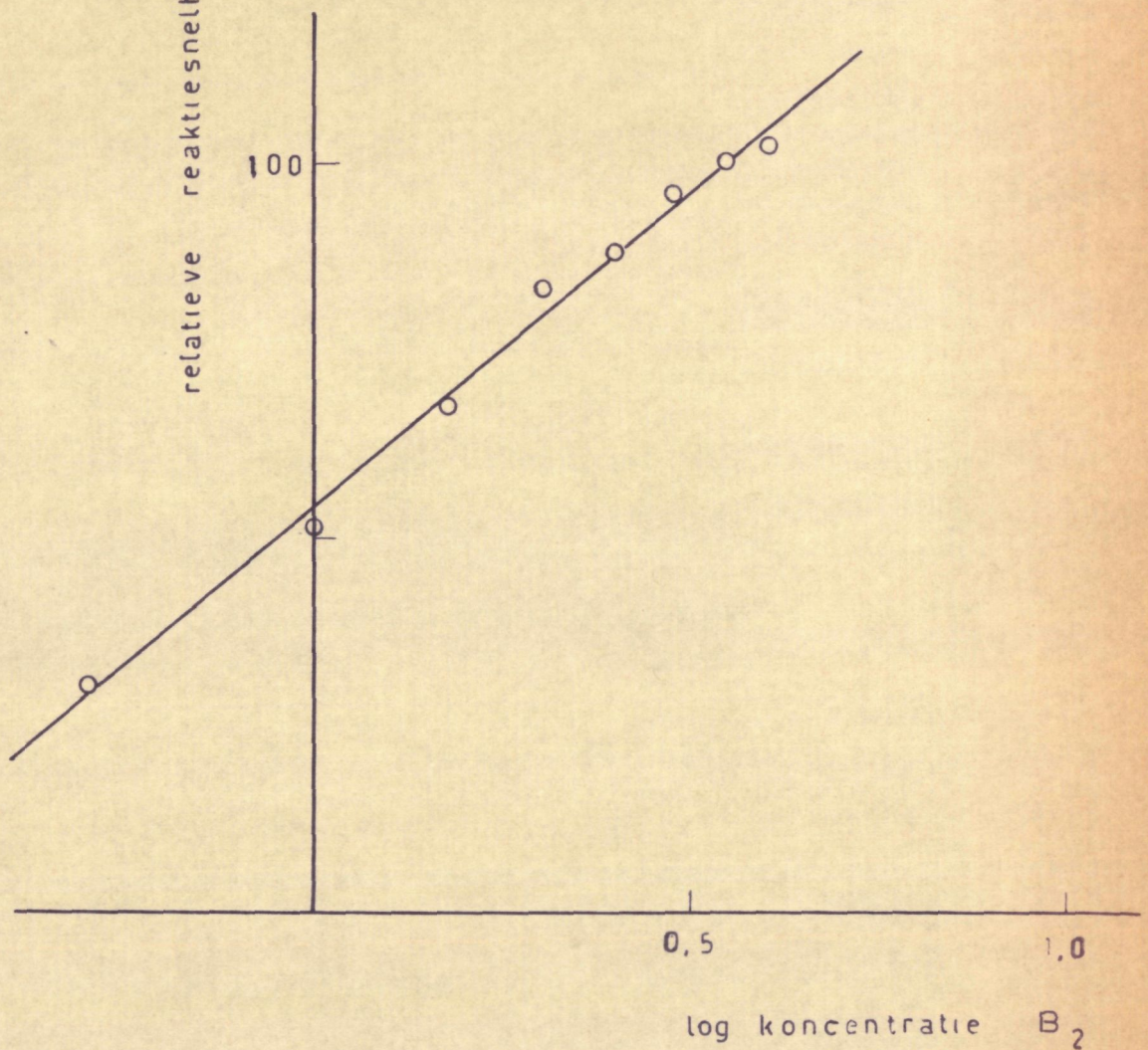
De vorm van de kurve in figuur 29 laat echter vermoeden, dat in het onderzochte concentratieinterval van de sensibilisator, de experimentele punten een semi-logaritmisch verband volgen van het type :

$$y = a + b \log x$$

waarin  $y$  de relatieve reaktiesnelheidskonstante voorstelt en  $x$  de concentratie aan riboflavine in mg/liter. Dit verband is weergegeven in figuur 30 en blijkt vrij goed overeen te stemmen met de gevonden waarden. Deze wijze van voorstellen dient echter beperkt te blijven tot het onderzochte interval, daar de waarde van  $y$  nooit kleiner kan worden dan 0,0 en bedoelde vergelijking voor de limietwaarde van  $x$  de waarde - oneindig benaderd.

Een andere betrekking die wel met een fysische realiteit zou kunnen overeenstemmen, is

Fig 30 Verband tussen de relatieve reaktiesnelheidskonstante en de log van de concentratie (mg/liter) van de fotosensibilisator



$$y = a(1 - e^{-kx})$$

waarin  $y$  : de relatieve reaktiesnelheidskonstante,

$x$  : de concentratie aan sensibilisator,

$a$  : de maximale reaktiesnelheidskonstante,

$k$  : een konstante,

voorstelt. De bekomen resultaten laten toe om op een vrij eenvoudige wijze  $a$  en  $k$  te berekenen. De twee vergelijkingen :

$$51,1 = a(1 - e^{-k}) \quad (1)$$

$$102,2 = a(1 - e^{-4k}) \quad (2)$$

kunnen opgeschreven worden. Hieruit volgt dan uiteraard

$$51,1 = a(1 - e^{-k})$$

$$51,1 = \frac{a}{2} (1 - e^{-4k})$$

waaruit volgt dat

$$1 - e^{-k} = 0,5 - 0,5 e^{-4k}$$

$$0,5 = -0,5 e^{-4k} + e^{-k}$$

De waarde voor  $k$  kan door proberen achterhaald worden en blijkt gelijk te zijn aan 0,6. Het invoeren van die waarde in de eerste vergelijking levert de waarde voor  $a$  op :

$$a = 51,1 / (1 - 0,549) = 113$$

Er is dus een relatie tussen de concentratie aan de fotosensibilisator en de reaktiesnelheidskonstante, maar het is niet zonder meer duidelijk dat bedoelde betrekking zou wijzen op een intermediaire vorm. Een dergelijk verband zou ook kunnen verklaard worden door transmissieverliezen te aanvaarden. Het feit dat dit in tegenspraak is met de verhouding tussen de gevonden reaktiesnelheidskonstante  $n$  bij de twee verschillende belichtingsinstallaties zal aan een verder onderzoek dienen onderworpen te worden.

#### 4. Bespreking en Besluiten.

##### 4.1. Algemene Bespreking.

Een uitvoerige studie van de literatuur onder een driedig oogpunt, namelijk omtrent de eventuele rol van het l-ascorbinezuur bij het tot stand komen van de smaakgebreken in melk, in verband met de kinetiek van de oxydatieve omzetting van het l-ascorbinezuur en over de aangewende analysetechnieken bij het onderzoek van voornoemde twee punten, bracht aan het licht dat :

1. de meningen ten zeerste verdeeld zijn in verband met de mogelijke rol van het l-ascorbinezuur bij het vormingsproces van de smaakgebreken, zowel wat betreft de oxydatie- als de lichtmaak ;

2. de voorhanden zijnde kinetische gegevens over het algemeen berusten op een te gering aantal waarnemingen om als zeer betrouwbaar te kunnen gelden ;

3. de kinetische gegevens volledig ontbreken inzake de oxydatieve omzetting van het l-ascorbinezuur in een fotogesensibiliseerd proces ;

4. praktisch gezien al de uitgevoerde experimenten berusten op het volgen van de evolutie van de l-ascorbinezuur concentratie met behulp van de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie.

Op grond van deze algemene vaststellingen werd beslist de fotogesensibiliseerde reactie nader te bestuderen, maar, daar aangenomen werd, dat de klassieke analysetechniek slechts een kwalitatief beeld opleverde, kon slechts tot de kinetische studie van dit

verschijnsel overgegaan worden nadat voorafgaandelijk het analytische aspect grondig onderzocht was.

De onderzoeken in verband met de te gebruiken methodes zijn weergegeven in het tweede hoofdstuk. Er werd hierbij uitgegaan van de volgende vereisten :

1. de gebruikte techniek diende voldoende gevoelig te zijn om bepalingen in het concentratieinterval 2,0 tot 20,0 mg l-ascorbinezuur per liter toe te laten. Daarenboven mocht slechts een relatief kleine hoeveelheid vloeistof per analyse verbruikt worden, teneinde in één enkele belichtingsproef een redelijk groot aantal analyses te kunnen doorvoeren ;

2. de gevolgde werkwijze diende voldoende eenvoudig en voldoende snel te zijn om toe te laten van in een redelijk korte proefduur nog een voldoende groot aantal waarnemingen uit te voeren of in gang te zetten ;

3. de gebruikte reagentia moesten een voldoende hoge specificiteit vertonen om niet gestoord te worden, noch door de ontstane afbraakprodukten, noch door het riboflavine, noch door de gebruikte bufferbestanddelen.

Op grond van de eerste vereisten konden slechts drie van de onderzochte methodes weerhouden worden voor de studie van de fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur, namelijk de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie, de fosfomolybdeenblauwmethode en de gewijzigde methode van Moor.

Van de 2,6-dichlorofenol-indofenol methode werd echter verondersteld, dat de specificiteit niet voldoende hoog is om een kwantitatieve interpretatie van de bekomen resultaten toe te laten.

De fosfomolybdeenblauwmethode werd in de loop van dit onderzoek op punt gesteld. Op grond van de literatuurgegevens in verband met het gedrag van de heteropolyzuren bij de reductie werd verondersteld, dat deze techniek niet gestoord zou worden door de afbraakprodukten van het l-ascorbinezuur. Deze methode is daarenboven zeer eenvoudig en snel, maar kan blijkbaar slechts aangewend worden bij het onderzoek van vrij zuivere, waterige oplossingen.

Een in de loop van de onderzoekingen ontwikkelde modificatie van de Moor methode bleek eveneens te beantwoorden aan de eisen in zake gevoeligheid en specificiteit. In vergelijking met de fosfomolybdeenblauwmethode was deze techniek echter minder eenvoudig, zodat het aantal waarnemingen dat bekomen werd met behulp van deze methode slechts de helft bedroeg van het aantal waarnemingen dat met behulp van de fosfomolybdeenblauwmethode bekomen werd bij het onderzoek van eenzelfde belichtingsexperiment. Daartegenover staat echter het belangrijke voordeel, dat dit reagens ook aangewend zou kunnen worden voor het onderzoek van de fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur in biologisch materiaal, in het bijzonder in melk.

In het derde hoofdstuk werden de gegevens samengebracht die bekomen werden bij het onderzoek van de afbraak van het l-ascorbinezuur. De belichtingen werden uitgevoerd met polychromatisch licht en in aanwezigheid van riboflavine als fotosensibilisator.

Een eerste reeks experimenten werd uitgevoerd met het oog op de keuze van de te gebruiken analysemethode. Hierin werden de



resultaten vergeleken, die enerzijds verkregen werden met de 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie en de resultaten die bekomen werden met de fosfomolybdeenblauw- en de diazomethode. Op grond van de bekomen gegevens bleek, dat de kolorimetriscne technieken tot hetzelfde resultaat leidden, resultaat, dat al naar gelang de andere proefvoorwaarden, min of meer afweek van de gegevens die bekomen werden met de titrimetriscne methode. Wanneer rekening gehouden wordt met :

1. het weinig uitgesproken specifieke karakter van de titrimetriscne methode ;
2. het sterk uitgesproken specifieke karakter van ten minste één van de kolorimetriscne technieken ;
3. het zeer goed overeenstemmen van de resultaten bij gebruik van de kolorimetriscne technieken ;
4. het feit, dat de kolorimetriscne methodes toe laten te besluiten tot een verloop van de l-ascorbinezuur concentratie volgens een eenvoudige wet ;
5. het feit, dat bij gebruik van de titrimetriscne techniek geen dergelijk eenvoudig verband gevonden wordt ;

is het blijkbaar verantwoord om te besluiten dat de titrimetriscne methode slechts een kwalitatieve benadering van het probleem mogelijk maakt. Het is verder duidelijk, dat deze techniek gestoord wordt door een reactieprodukt, maar het is aan de hand van de uitgevoerde experimenten niet uit te maken wat de precise aard van het storende bestanddeel is.

Zoals bij de oxydatieve afbraak door zware metaalionen, wordt tussen de concentratie aan het resterende l-ascorbinezuur en de reaktieduur bij het fotogesensibiliseerde proces een semi-logaritmisch verband gevonden, en dit onder diverse omstandigheden van de belichtingsintensiteit, van de aard van de lichtbron, van de pH van de proefoplossing, van de aard van de bufferbestanddelen, van de concentratie aan fotosensibilisator en van de vorm van de belichtingskuvet.

Experimenten die uitgevoerd werden met proefoplossingen enerzijds gebufferd op pH 6,7 - 6,8 met verschillende buffersystemen en anderzijds met niet belichte oplossingen bij verschillende pH waarden, toonden aan dat het l-ascorbinezuur wel is waar gedestabiliseerd werd bij pH waarden boven de 5,0, maar dat bij de uitgevoerde belichtingsexperimenten geen correctie diende ingevoerd te worden, noch voor de pH waarde, noch voor de normaal gebruikte fosfaatbuffer.

Door gebruik te maken van twee geometrisch verschillende belichtingskuvetten kon verder uitgemaakt worden, dat voor de daaruit resulterende belichtingsdensiteiten bij een gegeven belichtingsintensiteit blijkbaar al de absorbeerbare fotonen onder de aangewende proefvoorwaarden in de oplossing achterbleven.

Uit de bepaling van de reaktiesnelheidskonstante voor de fotochemische afbraak bij de diverse pH waarden volgde de grote analogie met de betrekking tussen de concentratie aan het monoascorbaat-ion en de pH, zodat de fotogesensibiliseerde afbraak, zoals de door zware metaalionen veroorzaakte oxydatie, verloopt over de eenmaal geassocieerde molekule.

Verder bleek uit de bekomen resultaten, dat de gemeten reaktiesnelheidskonstante bij een gegeven pH waarde van de proef-

oplossing rechtevenredig varieert met de belichtingsintensiteit.

Er werden tenslotte een reeks experimenten doorgevoerd, waarbij een vergelijking werd gemaakt over de toename van de reaktiesnelheidskonstante voor een gekombineerde variatie van de sensibilisatorconcentratie met een verandering van de pH, van de belichtingsintensiteit en de belichtingsdensiteit. Uitgaande van de berekende relatieve reaktiesnelheidskonstanten bleek dat de evolutie van dit gegeven een functie van de concentratie aan riboflavine was. Bij een toenemende concentratie van de sensibilisator nam de relatieve reaktiesnelheidskonstante aanvankelijk nagenoeg lineair toe, om bij concentraties van meer dan 2,0 mg riboflavine per liter vrij snel af te vlakken. In het gehele onderzochte concentratieinterval bleek het verband tussen de relatieve reaktiesnelheidskonstante en de concentratie aan riboflavine vrij goed weergegeven te worden door een functie van de aard :

$$y = a + b \log x$$

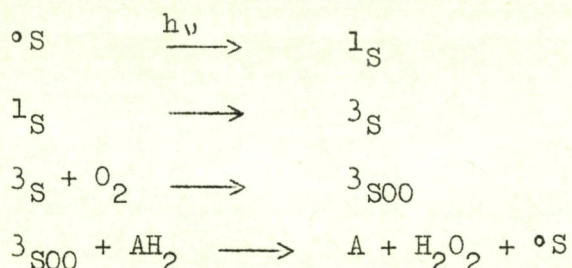
Dit verband kan echter moeilijk over het gehele, mogelijke concentratieinterval van de riboflavine gehandhaafd worden, daar bij het naderen tot de limietwaarde nul voor  $x$  de waarde van  $y$  ergens kleiner moet worden dan nul en moet evolueren in de richting van min oneindig. De waarde van de relatieve reaktiesnelheidskonstante kan echter nooit kleiner worden dan nul.

Een betrekking die misschien wel met een fysische realiteit overeenstemt is :

$$y = a(1 - e^{-kx})$$

maar het gebruik ervan steunt op het aannemen van een verlies aan kapteerbare fotonen door transmissie, hetgeen niet helemaal overeenstemt met andere waarnemingen.

Wordt, in het geheel van de experimentele gegevens, het klassieke schema voor de zuurstof overdracht via een "charge transfer complex" (CT) beschouwt, dan kan op grond van het schema :



wel vooropgezet worden dat de gemeten reaktiesnelheidskonstante beïnvloed wordt door de pH waarde en door de belichtingsintensiteit, en dat in bepaalde proefomstandigheden de reaktiesnelheid afhankelijk kan worden van de diffusiesnelheid van de zuurstof.

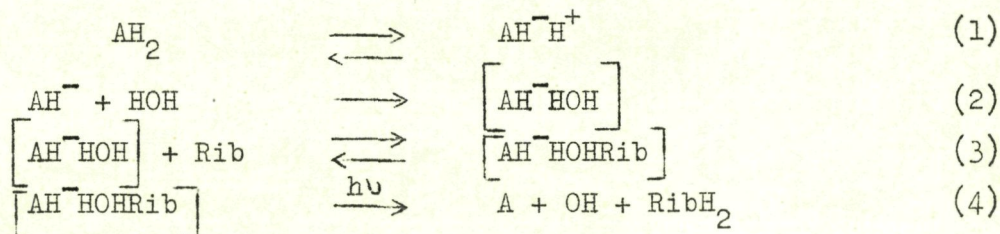
Als limiterende factoren zouden op grond van dit reactieschema de concentratie aan sensibilisatormolekulen, de zuurstofconcentratie of de belichtingsdensiteit kunnen vooropgesteld worden. Experimenteel is echter gebleken dat de totale hoeveelheid van de opneembare fotonen in de oplossing **kunnen** achterblijven zodat de concentratie aan riboflavinemolekulen niet de begrenzing in de reaktiesnelheid kan veroorzaken. Anderzijds werden de proefoplossingen klaargemaakt met water dat in evenwicht was met de normale laboratorium atmosfeer, zodat vooropgezet kan worden dat ten minste 0,25

millimoles zuurstof aanwezig zijn tegenover de 0,006 millimoles riboflavine en de 0,11 millimoles l-ascorbinezuur. Het lijkt dan ook weinig waarschijnlijk dat de zuurstof optreedt als een begren- zende faktor.

Volkomen in overeenstemming met de experimentele gegevens blijkt dus dat het aantal fotonen de begrenzende faktor is. Maar onder deze voorwaarden is het niet moeilijk om tot een welbepaalde verhouding te besluiten tussen de chemisch meetbare concentratie aan fotosensibilisator enerzijds en de concentratie aan het CT kom- plex anderzijds. Deze verhouding zal afhankelijk zijn van de ver- houding tussen het aantal fotonen en het aantal sensibilisator mole- kulen, zodat voor een verdubbelen van het beschikbare aantal fotonen, de verhouding CT/S verdubbeld wordt, het aantal botsingen per tijds- eenheid tussen een CT complex en een monoascorbaation eveneens zal verdubbelen en de reaktiesnelheidskonstante dubbel zo groot zal zijn. Wordt echter het aantal beschikbare fotonen konstant gehouden en wordt de concentratie aan sensibilisator molekulen verdubbeld, dan wordt de verhouding CT/S gehalveerd, maar de totale concentratie aan CT molekulen is konstant gebleven, zodat aan de botsingskansen tussen een CT complex en een monoascorbaation niets gewijzigd werd. Derge- lijke voorspelling is echter niet in overeenstemming met het gevonden gedrag van de reaktiesnelheidskonstante.

Ook het tweede vooropgezette schema, waarin de triplet- toestand van de zuurstofmolekule via een fotochemische aktivatie naar een reaktieve singuleettoestand overgaat, leidt tot de vooropstelling dat een variatie van de concentratie aan sensibilisator molekulen geen verhoging van de reaktiesnelheidskonstante voor gevolg heeft.

Het derde schema kan als volgt opgebouwd worden :



Voor een gegeven stel van proefvoorwaarden geeft dit schema aanleiding tot de vooropstelling dat er een bepaalde verhouding gevonden zal worden voor het aantal fotonen dat gekapteerd wordt door de complexe vorm van de sensibilisator en door de vrije vorm. Door een verandering van de pH zal een verandering tot stand komen van de dissociatiegraad van het l-ascorbinezuur. Onder deze voorwaarden wordt de concentratie aan het monoascorbaation gewijzigd, verschuift met andere woorden het evenwicht in de derde reactie in de richting van het complex, zodat ook de verhouding toeneemt tussen het aantal fotonen dat gevangen kan worden in het complex en het aantal dat gevangen kan worden door de vrije sensibilisatormolekulen.

Bij de verhoging van de belichtingsdensiteit, hetzij door de intensiteit te verhogen bij een welbepaalde belichtingskuvet, hetzij door bij een gegeven belichtingsintensiteit de kuvet te wijzigen, zal uiteraard de verhouding niet gewijzigd worden tussen het aantal fotonen dat door de vrije sensibilisator opgenomen wordt en het aantal fotonen dat door het complex gevangen wordt. Het aantal gekapteerde fotonen per tijdseenheid neemt wel toe, zodat ook de reactiesnelheidskonstante zal vergroten.

Wordt de concentratie aan riboflavinemolekulen verhoogd, dan verschuift het evenwicht in de derde reactie in de richting van

het complex. Schijnbaar wordt hierdoor de verhouding niet gewijzigd tussen het aantal sensibilisatormolekulen die in het complex opgenomen zijn en het aantal vrije sensibilisatormolekulen. In werkelijkheid is de effectieve concentratie aan riboflavine veel groter dan de gemeten concentratie en kan als een konstante waarde beschouwd worden, dit dank zij de recirkulatie van het riboflavine. Vanuit dit standpunt bezien wordt door een toename van het complex de verhouding tussen het aantal door het complex opgevangen fotonen en het aantal door de vrije riboflavinemolekulen opgevangen fotonen wel gewijzigd. De toename in de reaktiesnelheidskonstante zal dan ook waargenomen worden tot op het moment dat ieder monoascorbaation in het complex kan opgenomen worden, met andere woorden tot op het ogenblik tot er voldoende riboflavinemolekulen in de oplossing voorhanden zijn om, bij een gegeven belichtingsintensiteit, ieder foton te laten kapteren door een complex. De werkelijke concentratie aan riboflavine waarbij de effectieve concentratie de opname van alle aanwezige monoascorbaationen in het complex waarborgt zal afhankelijk zijn van de recirkulatiesnelheid en zal dus begrensd kunnen worden door de diffusiesnelheid van de zuurstof.

Dit alles steunt op het feit dat geen verschillen tussen de experimentele en de berekende verhouding van de reaktiesnelheidskonstanten bij de twee verschillende belichtingsinstallaties gevonden worden, tenminste voor concentraties aan de fotosensibilisator die gelijk zijn aan of groter dan 1 mg per liter. Het is duidelijk dat dit punt aan een uitgebreider onderzoek moet onderworpen worden, gezien de experimentele resultaten wel is waar een verandering van de reaktiesnelheidskonstante aan het licht brachten, maar die veranderingen blijkbaar niet op een eenvoudige wijze kunnen verklaard worden.

Naast een verklaring van de waargenomen verschijnselen omtrent de invloed van de pH, van de belichtingsintensiteit en van de riboflavineconcentratie op de evolutie van de reaktiesnelheidskonstante, naast het vooropstellen van een mogelijke begrenzing van de reaktiesnelheid door de diffusiesnelheid van de zuurstof, brengt dit schema eveneens een verklaring voor de stabilisatie van de riboflavinemolekule onder de aangewende proefbelichting en wordt de aanwezigheid van een watermolekule in de reactie niet een gevolg van een toevallige trimoleculaire botsing maar een logisch gevolg van de aanwezigheid van het monoascorbaation. Na de dissociatie van het proton blijft er een negatief geladen kern achter op de l-ascorbinezuurmolekule, zodat de polaire watermolekule via een waterstofbrug gebonden zal worden aan het monoascorbaation.

#### 4.2. Besluiten.

Op grond van de experimenten in verband met de fotoge-sensibiliseerde destructie van het l-ascorbinezuur in aanwezigheid van riboflavine en uitgevoerd in een waterig midden kunnen volgende algemene besluiten geformuleerd worden :

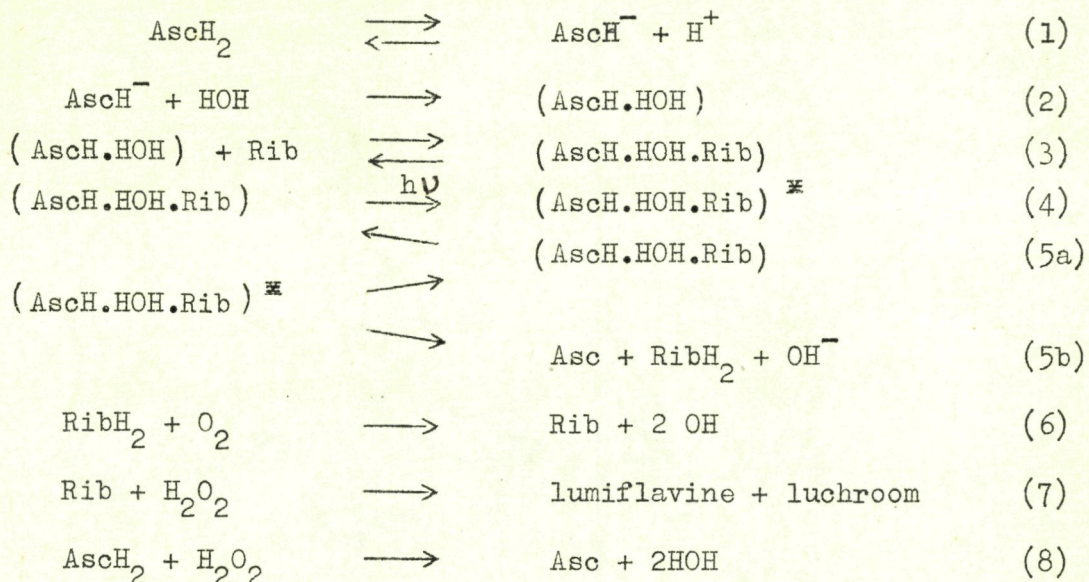
1. De klassiek aangewende 2,6- dichlorofenol-indofenol titratie laat niet toe om het verschijnsel kwantitatief te bestuderen. Dergelijke studie kan in waterig milieu wel uitgevoerd worden met behulp van de zeer eenvoudige kolorimetrische techniek steunend op de reductie van het fosfomolybdeenzuur. Voor het onderzoek van biologische vloeistoffen zoals melk of het oogvocht dient beroep gedaan op een voorgestelde modifikatie van de methode van Moor.

2. De fotochemische destructie van het l-ascorbinezuur in aanwezigheid van riboflavine verloopt volgens een wet van de

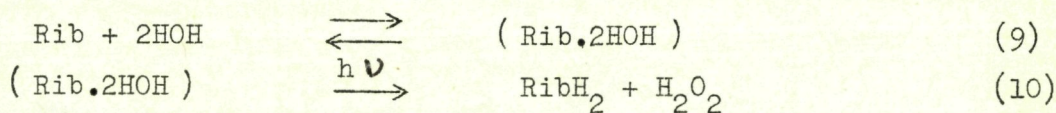


eerste orde. De gemeten reaktiesnelheidskonstante is rechtevenredig met de dissociatiegraad van het l-ascorbinezuur, met de belichtingsdichtheid en met de concentratie aan de sensibilisator, ten minste voor concentraties aan riboflavine die kleiner zijn dan 2,0 mg per liter.

3. De bekomen resultaten kunnen verklaard worden door het volgende reaktiemechanisme :



en bij een overmaat aan riboflavine



Aan te stippen valt dat de vergelijking (8) een mogelijkheid is die uiteraard nog een nader onderzoek vergt.

## 5. Literatuur.

1. SCHAFFNER, K.- Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 1964, 22, 92, Springer Verlag, Wien.
2. SCHAFFER, P.S., GREENBANK, C.A. & HOLM, G.E.- J. Dairy Sci., 1946, 29, 145.
3. GUTHRIE, E.S. - J. Dairy Sci., 1946, 29, 359.
4. WEINSTEIN, B.R. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 565.
5. SOLBERG, P., HAFLAND, G. & AUTHEN, W. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 649.
6. KUZDZAL-SAVOIE, S. & MOCQUOT, G. - Ann. Tech., 1960, 1, 5.
7. TROUT, G.M. & GJESSING, E.C. - J. Dairy Sci., 1939, 22, 271.
8. HOLMES, A.D., JONES, C.P., WERTZ, A.W., ESSELEN, K. & McKEY, B.C. - J. Dairy Sci., 1944, 27, 849.
9. HIETARANTA, M. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 656.
10. HENNING, J.C. & DAHLBERG, A.C. - J. Dairy Sci., 1938, 21, 345.
11. BROWN, W.C., VANLANDINGHAM, A.H. & WEAKLEY, C.E. Jr - J. Dairy Sci., 1941, 24, 925.
12. BROWN, W.C., VANLANDINGHAM, A.H. & WEAKLEY, C.E. Jr - J. Dairy Sci., 1941, 24, 1.035.
13. VANLANDINGHAM, A.H., HENDERSON, H.O. & WEAKLEY, C.E. Jr - J. Dairy Sci., 1944, 27, 365.
14. GUTHRIE, E.S. - J. Dairy Sci., 1946, 29, 359.
15. KRUKOVSKY, V.N., LOOSLI, J.K. & WHITTING, F. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 196.
16. KRUKOVSKY, V.N., TRIMBERGER, G.W., TURK, K.L., LOOSLI, J.K. & HENDERSON, G.R. - J. Dairy Sci., 1954, 37, 1.
17. DE LUCA, A.P., TEICHMAN, R., ROUSSEAU, J.E., MORGAN, M.E., EATON, H.D., MAC LEOD, P., DICKS, M.W. & JOHNSON, R.E. - J. Dairy Sci., 1957, 40, 877.

18. DUNKLEY, W.L., SMITH, L.M. & RONNING, M. - J. Dairy Sci., 1960, 43, 1766.
19. CORBETT, W.J. & TRACY, P.H. - J. Dairy Sci., 1943, 26, 1095.
20. WEINSTEIN, B.R. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 554.
21. PIJANOWSKI, E., WOJTOWICS, M. & LOCHOWSKA, H. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 633.
22. BROWN, W.C., THURSTON, L.M. & DUSTMAN, R.B. - J. Dairy Sci., 1936, 19, 753.
23. BROWN, W.C. & OLSON, F.C. - J. Dairy Sci., 1942, 25, 1041.
24. THURSTON, L.M., BROWN, C.W. & DUSTMAN, R.B. - J. Dairy Sci., 1936, 19, 671.
25. DAHLBERG, A.C. & CARPENTER, D.C. - J. Dairy Sci., 1936, 19, 541.
26. TOWNLEY, R.C. & GOULD, I.A. - J. Dairy Sci., 1943, 26, 853.
27. JOSEPHSON, D.V., BURGWALD, L.H. & STOLTZ, R.B. - J. Dairy Sci., 1946, 29, 273.
28. HERREID, E.O. & FRANCIS, J. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 202.
29. BERNHART, F.W. & LINDEN, E. - J. Dairy Sci., 1950, 33, 166.
30. WEINSTEIN, B.R. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 559.
31. ZWEIG, G. & BLOCK, R.J. - J. Dairy Sci., 1953, 36, 427.
32. SMITH, G.J. & DUNKLEY, W.L. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 625.
33. KON, S.K. - Lait, 1959, 39, 1.
34. BERGMAN, T., BERTELSEN, E., BERGLOEF, A. & LARSON, S. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 579.
35. SMITH, A.C. & MAC LEOD, P. - J. Dairy Sci., 1957, 40, 862.
36. LARSEN, R.B., GOULD, I.A. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1941, 24, 789.
37. STRIBLEY, R.C., NELSON, C.W., CLARK, R.E. & BERNHART, F.W. - J. Dairy Sci., 1950, 33, 573.
38. DAVIES, W.L. - Agric. Progr., 1930, blz. 7.

39. OLSON, F.C. & BROWN, W.C. - J. Dairy Sci., 1944, 27, 197.
40. EPPLE, W.F. & HORRALL, B.E. - J. Dairy Sci., 1943, 26, 525.
41. KRUKOVSKY, V.N. & GUTHRIE, E.S. - J. Dairy Sci., 1946, 29, 293.
42. DE VLEESCHAUWER, A., HENDRICKX, H. & WALLEZ, E. - Internationaal Zuivelkongres, 1953, III, 1072.
43. DE VLEESCHAUWER, A., VAN DEN BAERE, A. & HENDRICKX, H. - Internationaal Zuivelkongres, 1959, I, 280.
44. DE VLEESCHAUWER, A., VAN DEN BAERE, A & HENDRICKX, H. - Meded. LandbHogesch. Gent, 1958, 23, 121.
45. DE VLEESCHAUWER, A., TIJTGAT, B., HENDRICKX, H., DESCHACHT, W. - Meded. LandbHogesch. Gent, 1960, 25, 939.
46. KRUKOVSKY, V.N. - J. Dairy Sci., 1952, 35, 21.
47. GODED Y MUR, A. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 525.
48. KING, R.L. & DUNKLEY, W.L. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 420.
49. KING, R.L., LUICK, J.R., LITMAN, I.I., JENNINGS, W.G. & DUNKLEY, W.L. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 780.
50. THURSTON, L.M., BROWN, C.W. & DUSTMAN, R.B. - J. Dairy Sci., 1935, 18, 301.
51. TARASSUK, N.P. & KOOPS, J. - J. Dairy Sci., 1960, 43, 93.
52. FORSS, D.A., PONT, E.G. & STARK, W. - J. Dairy Res., 1955, 22, 91.
53. FORSS, D.A., PONT, E.G. & STARK, W. - J. Dairy Res., 1955, 22, 945.
54. STARK, W. & FORSS, D.A. - J. Dairy Res., 1962, 29, 173.
55. LUSAS, E.W., BIRD, E.W. & ROSENBERGER, W.S. - J. Dairy Sci., 1956, 39, 1487.
56. DUNKLEY, W.L. & KING, R.L. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 480.
57. STULL, J.W., HERREID, E.O. & TRACY, P.H. - J. Dairy Sci., 1948, 31, 449.
58. CHILSON, W.H., MARTIN, W.H. & WHITNACH, C.H. - J. Dairy Sci., 1950, 33, 925.

59. AURAND, L.W., SINGLETON, J.A., & NOBLE, B.W. - J. Dairy Sci., 1966, 49, 138.
60. ARRINGTON, L.R. & KRIENKE, W.A. - J. Dairy Sci., 1954, 37, 819.
61. OLSON, F.C. & BROWN, W.C. - J. Dairy Sci., 1942, 25, 1027.
62. KIERMEYER, F. & HAMED, M.G.E. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1961, 115, 322.
63. KIERMEYER, F. & HAMED, M.G.E. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1961, 115, 506.
64. KIERMEYER, F. & HAMED, M.G.E. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1961, 116, 20.
65. GJESSING, E.C. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1940, 23, 373.
66. SMITH, G.J. & DUNKLEY, W.L. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 625.
67. KRISTOFFERSEN, T., GOULD, I.A. & RAO, P.S. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 599.
68. RUSSELL, O.M. & DAHLE, C.D. - J. Dairy Sci., 1943, 26, 25.
69. GREENBANK, G.R. - J. Dairy Sci., 1948, 31, 913.
70. GREENBANK, G.R., ROGERS, L.V., HUFNAGEL, G.E. & MIDDLETON, M.B. - J. Dairy Sci., 1954, 37, 644.
71. KURAMOTO, S., JENNESS, R. & COULTER, S.T. - J. Dairy Sci., 1957, 40, 187.
72. AURAND, L.W., WOODS, A.E. & ROBERTS, Q.M. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 961.
73. AURAND, L.W. & WOODS, A.E. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 1111.
74. SMITH, G.J. & DUNKLEY, W.L. - J. Dairy Sci., 1960, 43, 278.
75. FLAKE, J.C., WECKEL, K.G. & JACKSON, H.C. - J. Dairy Sci., 1939, 22, 153.
76. FLAKE, J.C., JACKSON, H.C. & WECKEL, K.G. - J. Dairy Sci., 1940, 23, 1087.
77. KRUKOVSKY, V.N. & GUTHRIE, E.S. - J. Dairy Sci., 1945, 28, 565.
78. WEINSTEIN, B.R. & TROUT, G.M. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 570.

79. WEINSTEIN, B.R., LILLEVIK, H.A., DUNCAN, C.W. & TROUT, G.M. -  
J. Dairy Sci., 1951, 34, 784.
80. PATTON, S. & JOSEPHSON, D.V. - Science, 1953, 118, 211.
81. PATTON, S. - J. Dairy Sci., 1954, 37, 446.
82. PATTON, S. - Food Tech., 1956, 10, 1.
83. ORO, J.F., GUIDRY, C.L. & ZIATKIS, A. - Food Res., 1959, 24, 240.
84. WEIL, L., GORDON, W.G. & BUCHERT, A.R. - Arch. Biochem. Biophys.,  
1951, 33, 90.
85. NICKERSON, J.W. & STRAUSS, G. - J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82,  
5007.
86. STRAUSS, G. & NICKERSON, J.W. - J. Amer. chem. Soc., 1961, 83,  
3187.
87. DE MOOR, H. & HENDRICKX, H. - Meded. LandbHogesch. Gent, 1965, 30,  
561.
88. PRODANSKI, P. - Dtsch. Milchwirtschaft, 1962, 9, 98.
89. HENDRICKX, H., DE MOOR, H. & HUYGHEBAERT, A. - Neth. Milk & Dairy  
J., 1966, 20, 123.
90. SAMUELSSON, E.G. - Milchwissenschaft, 1959, 14, 153.
91. SAMUELSSON, E. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 552.
92. AURAND, L.W., SINGLETON, J.A. & MATRONE, G., - J. Dairy Sci.,  
1964, 47, 827.
93. WISHNER, L.A. & KEENEY, M. - J. Dairy Sci., 1963, 46, 785.
94. WISHNER, L.A. - J. Dairy Sci., 1964, 47, 216.
95. DE VLEESCHAUWER, A., HENDRICKX, H. & WALLEZ, E. - Wereldkongres  
Landbouwkundig Onderzoek, 1959, blz. 1007.
96. KRUKOVSKY, V.N., ELLIS, G.H. & PERCY, W.A. - J. Dairy Sci., 1943,  
26, 869.
97. KEENEY, M. & DOAN, F.J. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 713.
98. KEENEY, M. & DOAN, F.J. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 719.
99. KEENEY, M. & DOAN, F.J. - J. Dairy Sci., 1951, 34, 728.
100. VELANDER, H.J. & PATTON, S. - Milk Plant Monthly, 1955, 44, (9),  
18.

101. HENDRICKX, H., DESCHACHT, W. & DE MOOR, H. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 545.
102. SMITH, A.C. & MAC LEOD, P. - J. Dairy Sci., 1955, 38, 870.
103. RADEMA, L. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 561.
104. HENDRICKX, H. & DE MOOR, H. - Landbouwtijdschrift, 1962, 15, 753.
105. HERREID, E.O., RUSKIN, B., CLARK, G.L. & PARKS, T.B. - J. Dairy Sci., 1952, 35, 772.
106. MATTSON, S. - Svenska Mejeritidn., 1954, 46, 501.
107. HENDRICKX, H. & DE MOOR, H. - Meded. LandbHoges. Gent, 1962, 27, 1413.
108. STADHOUDERS, J., RADEMA, L. & LABOTS, H. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 529.
109. HENDRICKX, H. - Colloquium, Gent, 1963.
110. SHARP, P.F. & HAND, D.B. - Proc. Inst. Food Techn., 1940, 1, 139.
111. BELL, R.W. - J. Dairy Sci., 1948, 31, 951.
112. BELL, R.W. & MUCHA, T.J. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 833.
113. WRIGHT, P.A. & GREENBANK, G.R. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 644.
114. BABCOCK, C.J., STROBEL, D.R., YAGER, R.H. & WINDHAM, E.S. - J. Dairy Sci., 1952, 35, 195.
115. HARTMAN, G.H., GARETT, O.F. & BUTTON, F.C. - J. Dairy Sci., 1943, 26, 515.
116. GOULD, I.A. - J. Dairy Sci., 1940, 23, 977.
117. DUNKLEY, W.L., FRANKLIN, J.D. & PANGBORN, R.M. - J. Dairy Sci., 1962, 45, 1040.
118. OLSON, F.C. & BROWN, W.C. - J. Dairy Sci., 1944, 27, 205.
119. HOLMES, A.D. - J. DAIRY Sci., 1949, 32, 556.
120. GREENBANK, G.R. - J. Dairy Sci., 1940, 23, 725.
121. GODED Y MUR, A. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 576.
122. GUTHRIE, E.S. & KRUKOVSKY, V.N. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 786.
123. CHILSON, W.H., MARTIN, W.H. & PARRISH, D.B. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 306.

124. HARTMAN, G.H. & GARRETT, O.F. - J. Milk Tech., 1942, 5, 86.
125. TOBIAS, J. & HERREID, E.O. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 428.
126. HENDRICKX, H. & DE MOOR, H. - Meded. LandbHoges., Gent, 1962, 27, 1398.
127. BECK, G.H., WHITNAH, C.H. MARTIN, W.H. - J. Dairy Sci., 1939, 22, 17.
128. GODED Y MUR, A. - Internationaal Zuivelkongres, 1962, II/1, 569.
129. HERBERT, R.W., HIRST, R.L., PERCIVAL, E.G.V., REYNOLDS, R.J.W. & SMITH, F.J. - J. chem. Soc., 1933, 135, 1270.
130. BEZSSONOFF, N., WOLOSZYN, M. & LEROUX, H. - Z. Vitaminforsch., 1943, 13, 37.
131. CATTANEA, C. & SARTORI, G. - Z. Unters. Lebensmittel., 1943, 85, 362.
132. KERN, D.M.H. - J. Amer. chem. Soc., 1954, 76, 1011.
133. HUELIN, F.E. & STEPHENS, I.M. - Austral. J. sci. Res., Ser. B, 1948, 1, 50.
134. STROHECKER, R., BUSSE, A. & WEINREICH, A. - Z. Unters. Lebensmittel, 1941, 81, 126.
135. STROHECKER, R., BUSSE-SUNDERMANN, A. & BUCHHOLZ, E. - Z. Unters. Lebensmittel, 1941, 82, 113.
136. STROHECKER, R., BUCHHOLZ, E. - Z. Unters. Lebensmittel, 1942, 83, 122.
137. BELL, R.W. & MUCHA, T.J. - J. Dairy Sci., 1949, 32, 827.
138. GRAB, W. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1951, 92, 285.
139. SMITH, G.J. & DUNKLEY, W.L. - Food Sci., 1962, 27, 127.
140. LIVINGSTON, R. - Technique of Organic Chemistry, Vol. VIII, blz. 1, 1953, Editors : Friess & Weissberger, Interscience Publishers, N.Y.
141. GERO, E. & LE GALLIC, P. - Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 557.
142. ARCUS, C.L. & ZILVA, S.S. - Biochem. J., 1940, 34, 61.
143. HOPKINS, F.G. - C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1938, 22, 226.



144. GOLLNICK, K. & SCHENK, G.O. - International Symposium on Organic Chemistry, 1964, 507, International Union of Pure and Applied Chemistry, Butterworths, London.
145. NICKON, A. & BAGLI, J.F. - J. Amer. chem. Soc., 1959, 81, 6330.
146. NICKON, A. & BAGLI, J.F. - J. Amer. chem. Soc., 1961, 83, 1498.
147. MOORE, R.N. & LAWRENCE, R.V. - J. Amer. chem. Soc., 1958, 80, 1438.
148. SCHULLER, W.H., MOORE, R.N. & LAWRENCE, R.V. - J. Amer. chem. Soc., 1960, 82, 1734.
149. SCHULLER, W.H. & LAWRENCE, R.V. - J. Amer. chem. Soc., 1961, 83, 2563.
150. LIVINGSTONE, R. & OWENS, K.E. - J. Amer. chem. Soc., 1956, 78, 3301.
151. FOOTE, C.S. & WEXLER, S. - J. Amer. chem. Soc., 1964, 86, 3879.
152. FOOTE, C.S. & WEXLER, S. - J. Amer. chem. Soc., 1964, 86, 3880.
153. COKEY, E.J. & TAYLOR, W.C. - J. Amer. chem. Soc., 1964, 86, 3881.
154. FRISELL, W.R., CHUNG, C.W. & MAC KENZIE, C.G. - J. biol. Chem., 1959, 234, 1297.
155. TILLEMANS, J. - Z. Unters. Lebensmittel, 1927, 54, 33.
156. TILLEMANS, J., HIRSEN, P. & REINSHAGENE, E. - Z. Unters. Lebensmittel, 1928, 56, 273.
157. ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS. - Methods of Vitamin Assay, 1951, 76, Sec. Ed., Interscience Publishers, N.Y.
158. GSTIRNER, F. - Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden, 1951, 147, Vierte Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
159. MARX, T. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1952, 95, 315.
160. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. - Official methods of analysis of the A.O.A.C., 1960, 660, ninth Ed., A.O.A.C. Washington,

161. SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH. - Methoden für die Untersuchung und Beurteilung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen, Erster Band, 1964, 690, funfte auflage, Eidg. Drucksachen- und Materialenzentrale, Bern.
162. VAN EKKELEN, M. - Z. Vitaminforsch., 1938, 7, 254.
163. SOUCI, S.W. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1948, 88, 190.
164. SABALITSCHKA, T. & KLEFFNER, U. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1950, 90, 66.
165. ENDERS, C. - Biochem. Z., 1943, 314, 389.
166. SOMMERS, G.F., KELLY, W.C., THACKER, E.J. & REDDER, A.M. - Science, 1949, 110, 17.
167. LUGG. - Nature, 1942, 150, 577.
168. WENDLAND, G. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1948, 88, 665.
169. HUELIN, F.E. & STEPHENS, J.M. - J. Exp. Biol. & Med. Sci., 1947, 25, 17.
170. WINTER, E. - Z. analyt. Chem., 1952, 134, 401.
171. GAWRON, O. & BERG, R. - Ind. engng. Chem., Analyt. Edit., 1944, 16, 757.
172. WINTER, E. - Z. analyt. Chem., 1952, 137, 163.
173. MAPSON, L.W. - Biochem. J., 1942, 36, 196.
174. STROHECKER, R. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1948, 88, 12.
175. DE VLEESCHAUWER, A. TIJTGAT, B. & HENDRICKX, H. - Wereldkongres Landbouwkundig Onderzoek, 1959, 1007.
176. HUELIN, F.E. - Austral. J. sci. Res., Ser. B , 1949, 2, 346.
177. FEIGL, F. - Spot Tests, 1947, 420, third ed., Elsevier Publishing Cy, Amsterdam.
178. WOODS, J.T. & MELLON, M.G. - Ind. engng. Chem., Analyt. Edit., 1941, 13, 760.
179. FISTER, J.H. - Manual of Standardized Procedures for Spectrofotometric Chemistry, 1950, P35 - 38, Standard Scientific Supply Corporation, N.Y.

180. CAMOOZA, S. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1953, 97, 210.
181. JAHONTOVA, E.L. - Nutri Abstr. Rev., 1962, 32, 433, (2081).
182. BEZSSONOFF, N. & STOERR, E. - Z. Vitaminforsch., 1936, 5, 193.
183. FUJITA, A. & EBIHARA - ref. GSTIRNER (158).
184. MICHAELIS, H. & STRAUB, H. - Biochem. Z., 1949, 319, 493.
185. CUVELIER, B.V.J. - Kwantitatieve Analytische Chemie, 1944, 57, 2e druk, Het Kompas, N.V. Antwerpen.
186. TOPPING, J. - Errors of Observation and their Treatment, 1960, 102, Chapman & Hall, limited, London.
187. YOUDEN, W.J. - Statistical Methods for Chemists, 1959, fourth Printing, John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
188. DE VLEESCHAUWER, A., DESCHACHT, W. & HENDRICKX, H. - Meded. Land-  
bHogeschool, Gent, 1961, 26, 149.
189. PENNY, J.R. & ZILVA, S.S. - Biochem. J., 1943, 37, 403.
190. PENNY, J.R. & ZILVA, S.S. - Biochem. J., 1943, 37, 39.
191. ROE, J.H. & KUETHER, C.A. - J. biol. Chem., 1943, 147, 399.
192. ROE, J.H. & OESTERLING, M.J. - J. biol. Chem., 1944, 152, 511.
193. ROE, J.H., MILLS, M.B., OESTERLING, M.J. & DAMRON, C.M. - J. biol.  
Chem., 1948, 174, 201.
194. MILLS, M.B., DAMRON, C.M. & ROE, J.H. - Analyt. Chem., 1949, 21,  
707.
195. ROE, J.H. - Methods of Biochemical Analysis, Vol. I, 1959, 115,  
third printing, ed. Click, Interscience Publishers, Inc.,  
N.Y.
196. FISTER, J.H. - Manual of Standardized Procedures for Spectrofotometric  
Chemistry, 1950, A 47, Standard Scientific Supply  
Corporation, N.Y.
197. BOLOMEY, R.A. & KEMMERER, A. - J. Biol. Chem., 1947, 167, 781.
198. SZOKE, K. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1960, 112, 419.
199. GESCHWIND, I.I., WILLIAMS, B.S. & CHOH HAO LI - Acta endocr.,  
1951, 8, 247.

200. SCHAFFERT, R.R. & KINGSLEY, G.R. - J. biol. Chem., 1955, 212, 59.
201. LEVENSON, S.M., ROSEN, H. & HITCHINGS, G.H. - Arch. Biochem. Biophys., 1951, 33, 50.
202. TERUUCHI, J. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1953, 96, 209.
203. WYCHGRAM, H.L. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1953, 97, 210.
204. FISHER, K.H. & DODDS, M.L. - Food Res., 1955, 20, 247.
205. BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. & BROCK, M.J. - J. biol. Chem., 1947, 168, 197.
206. VAN VAERENBERG, L. - Vergelijkende Studie van enkele photometrische Ascorbinezuur Bepalingsmethoden, 1955, proefschrift Rijkslandbouwhogeschool, Gent.
207. SCHMALL, M., PIFER, C.W. & WOLLISCH, E.G. - Analyt. Chem., 1953, 25, 1486.
208. SCHMALL, M., PIFER, C.W., WOLLISCH, E.G., DUSCHINSKY, A. & GAINER, H. - Analyt. Chem., 1954, 26, 1521.
209. CROSSLAND, I. - Acta Chem. Scand., 1960, 14, 805.
210. DAVIDEK, J. & DAVIDKOVA, E. - Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., 1960, 112, 420.
211. HIROYASU, F., ATSUKA, Y & CHOTEN, I. - Chemical Abstracts, 1956, 50, 15673i.
212. MOOR, H. - Mitt. Lebensm. Hyg., 1956, 47, 20.
213. MOOR, H. - Food Manuf., 1957, 32, (3), 119.
214. TSUMEMATSU, T., KOJI, D. & DADAO, T. - Chemical Abstracts, 1956, 50, 533c.
215. DESCHACHT, W. & HENDRICKX, H. - Meded. LandbHogesch., Gent, 1962, 27, 1371.
216. HENDRICKX, H. & DESCHACHT, W. - Meded. LandbHogesch., Gent, 1964, 29, 81.

217. HODGMAN, G.D. - Handbook of Chemistry and Physics, 1962, 44 ed.,  
Chemical Rubber Publishing Cor., Ohio.
218. DESCHACHT, W. & HENDRICKX, H. - Meded. LandbHogesch., Gent, 1964,  
29, 102.

## 6. Inhoud.

Voorwoord	i
1. Inleiding	1
1.1. De chemische oxydatie	2
1.2. De enzymatische oxydaties	4
1.3. De fotochemische oxydaties	4
1.4. De terminologie	6
1.5. De rol van het l-ascorbinezuur in de vorming van de smaakgebreken	7
1.6. De oxydatieve degradatie van het l-ascorbinezuur	10
1.7. Doel van het onderzoek	17
2. De dosering van het l-ascorbinezuur	21
2.1. Vereisten waaraan de gebruikte doseringsmethode moet beantwoorden	21
2.2. De 2,6-dichlorofenol-indofenol titratie	22
2.3. De molybdeenblauwreactie	24
2.4. Koppelingsreacties	47
2.5. Besluiten	68
3. De fotogesensibiliseerde afbraak van het l-ascorbinezuur	69
3.1. De belichtingsinstallatie en -methode	69
3.2. De dosering van het l-ascorbinezuur gedurende de fotochemische destructie	74
3.3. De fotogesensibiliseerde oxydatie van het l-ascor- binezuur volgt een wet van de eerste orde	83

3.4. Invloed van de gebruikte bufferbestanddelen	86
3.5. Invloed van de belichtingsinstallatie	90
3.6. Invloed van de pH op de reaktiesnelheid	91
3.7. Invloed van de belichtingsintensiteit op de reaktiesnelheidskonstante	99
3.8. Invloed van de concentratie aan fotosensibilisator op de reaktiesnelheidskonstante bij de fotochemische oxydatie van het l-ascorbinezuur	106
4. Bespreking en Besluiten	125
4.1. Algemene bespreking	125
4.2. Besluiten	135
5. Literatuur	137
6. Inhoud	148

