



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Analizy Żywności**

Ćwiczenie 7

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą
miareczkową



1. Wprowadzenie

Witaminy są to niskocząsteczkowe związki organiczne, o różnorodnej budowie chemicznej, rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Ich odkrycie i udowodnienie ich roli w odżywianiu człowieka nastąpiło na przełomie XIX i XX wieku. Holenderski lekarz – Ejkmann w 1897 roku powiązał żywienie polerowanym ryżem z występowaniem choroby beri-beri; skąd wniosek, że w otrębach ryżowych występują substancje, których brak w organizmie powoduje chorobę beri-beri. W 1912 roku polski biochemik Kazimierz Funk nadał składnikowi wyizolowanemu z otrębów ryżowych nazwę **witamina**, tzn. *amina niezbędna do życia*. Nazwa ta jest powszechnie stosowana również we współczesnej terminologii, mimo że niektóre z później odkrytych witamin nie posiadają funkcji aminowych.

1.1. Charakterystyka witamin

Witaminy są katalizatorami ogólnych lub swoistych reakcji biochemicznych, wchodzą w skład enzymów i koenzymów, są niezbędne do wzrostu i podtrzymania funkcji życiowych. Dla wielu organizmów, w tym zwierząt i człowieka są to na ogół związki egzogenne i muszą być dostarczane z pożywieniem. Niektóre z nich okazały się również egzogennymi czynnikami wzrostowymi dla różnych drobnoustrojów, a dwie niezbędnymi biokatalizatorami, dostarczonymi przez bakterie glebowe roślinom wyższym (witamina B₁₂) i niższym (witamina B₁). Aby odróżnić je od innych niezbędnych składników pokarmowych, witaminy rozważa się jako substancje działające w bardzo małych ilościach; z wyjątkiem kwasu askorbinowego, dzienne zapotrzebowanie na pozostałe witaminy jest istotnie bardzo małe – nie przekracza 20 mg.

Niektóre witaminy wytwarzają zwierzęta z odpowiednich związków syntetyzowanych przez rośliny. Takie związki nazywane są prowitaminami np. β -karoten.

Źródłem witamin i prowitamin są rośliny i bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym, a także tkanki zwierząt. Rzeczywiste zapotrzebowanie ilościowe na poszczególne witaminy jest trudne do określenia min. ze względu na synergiczne działanie wielu z nich. Zależy ono od cech osobniczych, stanu zdrowia i okresu życia człowieka. Objawy wywołane całkowitym brakiem witamin zwane są **awitaminozami**. We współczesnym świecie zwłaszcza w krajach rozwiniętych awitaminozy należą do rzadkości. Często występują z kolei niedobory witamin tzn. niekorzystne stany pośrednie między awitaminozą, a optymalnym zaspokojeniem zapotrzebowania organizmu na określoną witaminę, czyli **hipowitaminozy**. Na ogół są one spowodowane niewłaściwym, jednostronnym odżywianiem, wadliwym przyswajaniem witamin z pokarmu oraz zniszczeniem bakterii w przewodzie



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

pokarmowym (przez antybiotyki, sulfonamidy). Niedoborom witamin zapobiega spożywanie różnorodnych pokarmów. Z kolei nadmierne przyjmowanie preparatów witaminowych, głównie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, może prowadzić do szkodliwych dla organizmu objawów, zwanych **hiperwitaminozami**.

Zawartość witamin w surowcach i produktach żywnościowych jest więc jednym z głównych wskaźników ich jakości oraz prawidłowości stosowanych zabiegów technologicznych. Większość witamin to substancje bardzo wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych, dlatego ich straty bywają stosunkowo duże. Podstawową klasyfikacją witamin jest podział na:

- witaminy rozpuszczalne w tłuszczach,
- witaminy rozpuszczalne w wodzie.

Taki podział ma znaczenie praktyczne, gdyż informuje, w jakich artykułach żywnościowych może występować dana witamina. Początkowo witaminy oznaczano symbolami literowymi, później często nadawano im nazwy określające ich strukturę bądź działanie fizjologiczne. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie ważniejszych witamin, pominięto natomiast związki, których rola nie została jeszcze w pełni wyjaśniona lub których charakter witaminowy bywa kwestionowany. Dotyczy to min. mezo-inozytolu, cholicy i bioflawonoidów.

Tabela 1. Zestawienie wybranych witamin

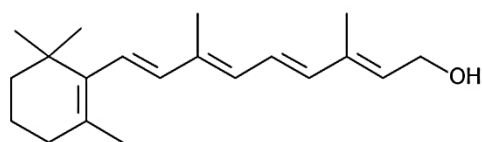
Witaminy rozpuszczalne w wodzie		Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach	
Oznaczenie literowe	Podstawowe nazwy związków	Oznaczenie literowe	Podstawowe nazwy związków
B ₁	tiamina		
B ₂	ryboflawina	A ₁	retinol
B ₃ ,	kwask nikotynowy	A ₂	2-dehydroretinol
PP	amid kwasu nikotynowego	D ₂	Ergokalcyferol
B ₅	kwask pantotenowy	D ₃	Cholekalcyferol
B ₆	pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina	E	tokoferole, tokotrienole
B ₉	kwask foliowy	K ₁	filochinon
B ₁₂	cyjanokobalamina, hydroksykobalamina – B _{12B}	K ₂	menachinon- <i>n</i>
H	biotyna	K ₃	menadion
C	kwask l-askorbinowy		

1.1.1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

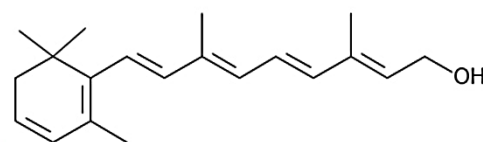
a) Witamina A

Witamina A, rozpuszczalna w tłuszczach została odkryta i zdefiniowana chemicznie w 1931 roku, a od 1947 witaminę A wytwarza się przemysłowo. Jej aktywność wykazuje wiele związków strukturalnie podobnych, z grupy polienów, mających w swoim składzie pierścień β -jononu lub jego pochodne. Bezpośrednimi prekursorami witamin z grupy A są karoteny zawierające co najmniej jeden taki pierścień. W roślinach i grzybach występują tylko prowitaminy, które w organizmie zwierzęcym są przekształcane w witaminę A, magazynowaną w wątrobie. Jest to proces polegający na enzymatycznym, połączonym z utlenianiem rozpadem prowitaminy.

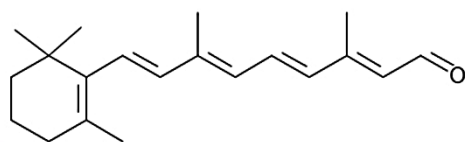
Właściwości witaminy A wykazuje kilka związków, a najważniejsze z nich to: retinol (wit. A₁), retinal, 3-dehydroretinol (wit. A₂) oraz niektóre stereoizomery retinolu (13-*cis*-retinol, 9-*cis*- i 9,13-*cis*-retinole).



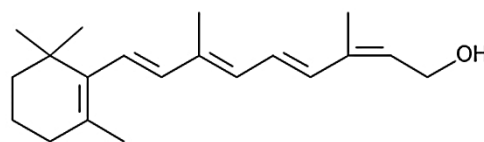
Retinol (witamina A₁)



3-dehydroretinol (witamina A₂)



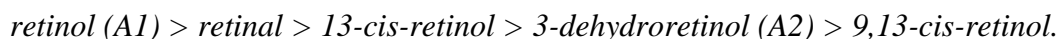
Retinal



13-*cis*-retinol (neowitamina A₂)

Rysunek 1. Struktury witamin z grupy A

Witamina A oraz prowitaminy w środowisku beztlenowym są trwałe w temp. do 130°C. W wyższej temperaturze są możliwe termiczne przemiany obejmujące, min. stereoizomeryzację oraz cyklizację łańcucha nienasyconego. W obecności tlenu substancje te łatwo ulegają rozkładowi. Proces jest przyspieszany przez: promienie UV, enzymy, jony metali ciężkich, nadtlarki. Produkty utleniania witaminy A i karotenów są biologicznie nieczynne. Aktywność biologiczna związków należących do witamin grupy A jest zróżnicowana. Ich uszeregowanie według malejącej aktywności jest następujące:





Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

Witamina A₂ wykazuje około 50% aktywności witaminy A₁. Obecnie zaleca się wyrażanie aktywności za pomocą tzw. równoważnika retinolu. Przy określaniu ilości retinolu stosuje się następujące przeliczenia:

$$\begin{aligned} 1 \mu\text{g równoważnika retinolu} &= 1 \mu\text{g czystej formy retinolu (pochodzenia zwierzęcego)} \\ &= 6 \mu\text{g } \beta\text{-karotenu (pochodzenia roślinnego)} \\ &= 12 \mu\text{g innych karotenoidów (pochodzenia roślinnego)} \end{aligned}$$

Witaminę A wyraża się również w tabelach żywnościowych w Jednostkach Międzynarodowych [I.U.]. Aby przeliczyć jednostki międzynarodowe na równoważnik retinolu należy zastosować przelicznik: 1 μg równoważnika retinolu = 3,3 Jednostek Międzynarodowych [I.U.].

Witamina A występuje wyłącznie w produktach pochodzenia zwierzęcego. Najbogatszym jej źródłem są tran rybane oraz wątróbki zwierzęce (Tabela 2). Natomiast dobrym źródłem fizjologicznie czynnych karotenów są przede wszystkim żółte i zielone owoce oraz warzywa, np.: marchew, natka pietruszki, szpinak, dynia, mango, morele, koperek, sałata i pomidor.

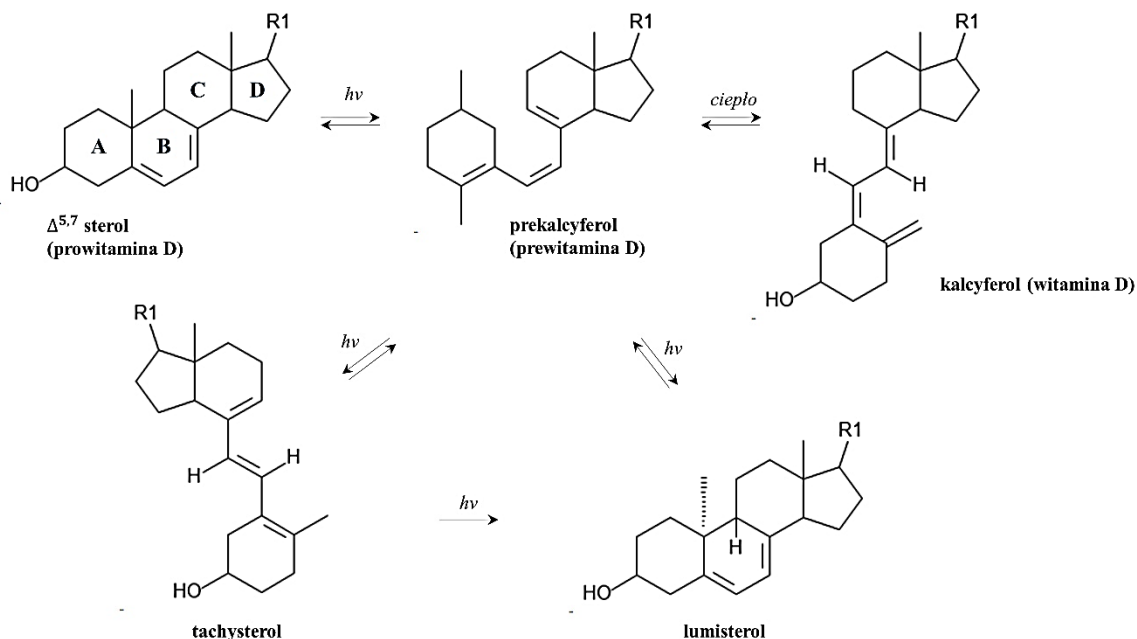
Tabela 2. Źródła witaminy A w żywności

Produkt	Zawartość [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$ lub $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$]
Tran	18000
Wątróbka drobiowa	9700
Wątroba wołowa	7280
Wątroba wieprzowa	3090
Olej z wątroby dorsza	1800
Masło śmietankowe	887
Żółtko jaj	770
Śmietana 18%	150

Witaminy A w organizmie człowieka spełniają wiele ważnych funkcji, jednak ich rola nie została w pełni wyjaśniona. Poznano jednak ich udział w procesie widzenia, przy niedoborze witaminy A najczęściej występuje tzw. kurza ślepotą. Później może nastąpić zrogowacenie nabłonka gałki ocznej (kseroftalmia). Innym objawem niedoboru witaminy A jest zahamowanie wzrostu. Zbyt duże spożycie witaminy A jest szkodliwe (drażliwość, powiększenie wątroby i śledziona, nudności, bóle głowy, krwawienie z dziąseł, zażółcenie skóry), organizm człowieka toleruje dawki około 100-krotnie większe od dziennego zapotrzebowania. Dzielne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę A wyrażone w μg retinolu wynosi 100

b) Witamina D

Witaminy z grupy D są rozpuszczalne w tłuszczach. Związki te należą do grupy steroidów i są pochodnymi tych steroli, które w pierścieniu B (Rysunek 2) mają układ dwóch sprzężonych wiązań podwójnych.



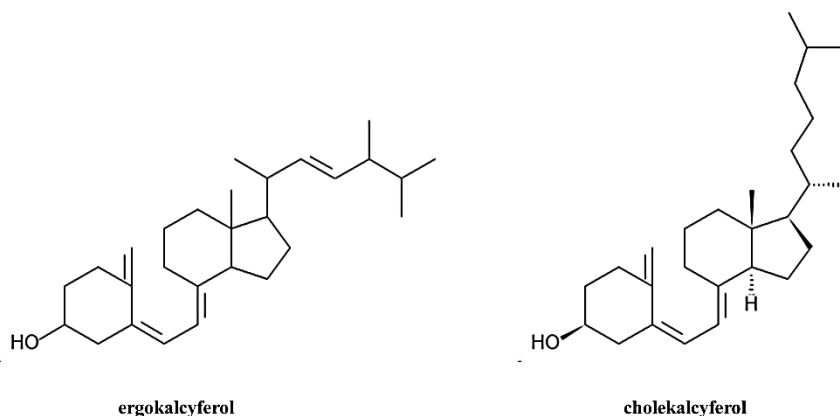
Rysunek 2. Struktury prowitamin i witamin z grupy D

Witaminy z grupy D powstają z odpowiednich prowitamin w wyniku przemiany fotochemicznej i termicznej, podczas której następuje min. otwarcie pierścienia B między C-9 i C-10 (Rysunek 2). Najbardziej efektywną długością fali do otrzymywania witaminy D jest 280 nm. Istnieje około 10 prowitamin, z których powstają związki wykazujące aktywność witaminy D. Najważniejsze witaminy grupy D to: witamina D₁ (kalciferol), D₂ (ergokalciferol) oraz D₃ (cholecalciferol) (Rysunek 2).

Witamina D jest odporna na działanie podwyższonej temperatury i nie zmienia się w czasie długotrwałego przechowywania. Jest również trwała w środowisku zasadowym, natomiast jest wrażliwa na działanie kwasów. Pod wpływem silnego promieniowania UV ulega zniszczeniu. Roztwory tłuszczu stabilizują witaminę D, w środowisku beztłuszczowym w obecności tlenu witamina D łatwo ulega autooksydacji.

Z punktu widzenia żywienia człowieka najważniejsze są witaminy D₂ i D₃. W organizmie witaminy te mogą powstawać na skutek syntezy pod wpływem promieni UV (witamina D₃), mogą

być też dostarczane z pożywieniem (wit. D₂ i D₃). Organizm człowieka może magazynować witaminy grupy D w ilościach wystarczających na kilka do kilkunastu tygodni. Najwięcej witaminy gromadzi się w wątrobie.



Rysunek 3. Struktury witaminy D₂ (ergokalcyferol) oraz witaminy D₃ (cholekalcyferol)

Najlepiej poznaną funkcją witaminy D, jest rola jaką odgrywa w gospodarce wapniowo-potasowej i w tworzeniu kości. Jej niedobór wywołuje krzywicę u dzieci, u dorosłych natomiast powoduje rozmięczenie, zrzaszotnienie, porowatość i kruchość układu kostnego. Wielkość zapotrzebowania na witaminę D zależy przede wszystkim od wieku, ilości witamin powstałej w skórze pod wpływem naświetlania, ilości i wzajemnej proporcji wapnia i fosforu w diecie. Istnieją duże rozbieżności na temat wysokości zalecanej normy spożycia witaminy D (według norm w naszym kraju dla dorosłego człowieka dzienne zapotrzebowanie wynosi 5-20 µg, czyli 200-800 j.m.), jednakże z uwagi na ograniczony dostęp promieni UV do skóry (zanieczyszczone powietrze, tryb życia) oraz jej niewielką zawartość w produktach żywnościowych, mogą wystąpić niedobory tej witaminy. Przedawkowanie witaminy D jest również niebezpieczne i może powodować zatrucia, których objawami są: osłabienie, zmęczenie, utrata apetytu, zmniejszenie masy ciała, bóle głowy, odkładanie się wapnia w różnych tkankach, wzrost zawartości wapnia i fosforu w surowicy i moczu. Ryzyko przedawkowania występuje tylko w przypadkach niewłaściwego użycia preparatów farmakologicznych.

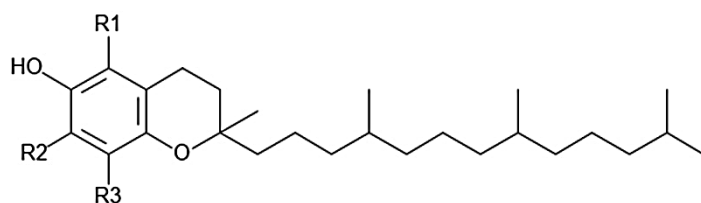
Witamina D występuje w nielicznych produktach żywnościowych, najbogatszym jej źródłem jest tran (Tabela 3).

Tabela 3. Źródła witaminy D w żywności

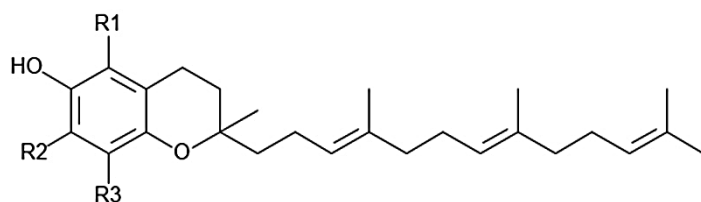
Produkt	Zawartość [$\mu\text{g}/100\text{ g}$ lub $\mu\text{g}/100\text{ ml}$]
Tran (2 łyżeczki)	242
Śledź	25
Makrela	24
Łosoś	12
Tuńczyk	6
Mleko (1 filiżanka)	3
Mąka pełnoziarnista	3
Jajko (1 żółtko)	1

c) Witamina E

Witaminy grupy E są pochodnymi albo tokolu, czyli 2-metylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-chroman-6-olu albo tokotrienolu, czyli 2-metylo-2-(4',8',12'-trimetylotrideka-3',7',11'-trienylo)-chroman-6-olu. Stwierdzono występowanie w przyrodzie co najmniej 8 związków należących do dwóch grup witamin E, nazywanych odpowiednio tokoferolami i tokotrienolami (Rysunek 4).



	R1	R2	R3
α -tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokoferol	H	H	CH ₃



	R1	R2	R3
α -tokotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokotrienol	H	H	CH ₃

Rysunek 4. Struktury związków należących do dwóch grup witamin E

Największą czynność biologiczną wykazują związki α . Wszystkie poznane dotąd tokotrienole mają konfigurację trans. W surowcach biologicznych obok tokoferoli i tokotrienoli występują także dimery i trimery oraz chinony.



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

Witaminy E w temperaturze pokojowej są substancjami oleistymi, nierozpuszczalnymi w wodzie, łatwo rozpuszczalnymi w tłuszczach. W środowisku beztlenowym są odporne na działanie wysokiej temperatury, nawet do 200°C oraz kwasów i zasad. Witaminy te są bardzo wrażliwe na działanie promieni UV oraz tlenu. W obecności soli żelaza łatwo ulegają utlenieniu, tworząc dimery, trimery i chinony. Ich wrażliwość wzrasta z liczbą grup metylowych w cząsteczce. Podczas przyjmowania żelaza nie powinno się jednocześnie stosować witaminy E. Pochodne estrowe w stosunku do form alkoholowych są bardziej trwałe, tracą jednak swą aktywność przeciwutleniającą.

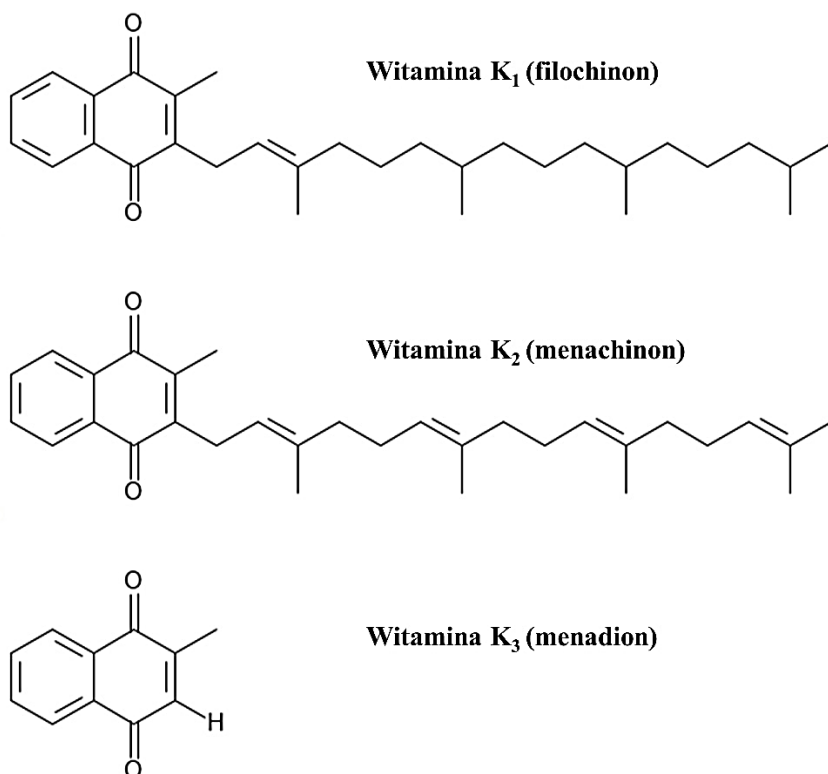
Na podstawie wielu obserwacji prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych stwierdzono, że witamina E jest odpowiedzialna za prawidłowe funkcjonowanie narządów rozrodczych. U dorosłego człowieka nie zaobserwowano dotąd charakterystycznych symptomów jej braku. U dzieci stwierdzono dodatni wpływ witaminy E na wytwarzanie czerwonych krwinek w przypadku anemii. Zgodnie z aktualnymi poglądami zapotrzebowanie dorosłego człowieka na tę witaminę waha się w granicach 10-30 mg α -tokoferolu na dzień. Witaminę E wyraża się w tabelach żywieniowych jako "równoważnik α -tokoferolu" w mg. α -Tokoferol wykazuje 100% bioaktywności.

1 mg równoważnika α -tokoferolu = 1 mg czystej formy α -tokoferolu
= 2 mg β -tokoferolu
= 4 mg γ -tokoferolu
= 5 mg α -tokotrienolu

W praktyce stosuje się zarówno naturalne, jak i syntetyczne tokoferole. Koncentraty naturalnej witaminy E otrzymuje się z olejów roślinnych (jest to mieszanina tokoferoli z przeważającą ilością α -tokoferolu). Bogatym źródłem tej witaminy są oleje roślinne, zwłaszcza z kielków pszenicy, sojowy i bawełniany. Z innych produktów wymieniwać należy: sałatę, szpinak, kapustę, masło, jaja.

d) Witamina K

Związki wykazujące aktywność biologiczną witaminy K zawierają w swoim składzie aromatyczny układ 1,4-naftochinonu, podstawiony w pozycji 2 grupą metylową. Naturalnie występujące witaminy K mają w położeniu 3 długi węglowodorowy łańcuch boczny fitolowy lub poliprenylowy. Do grupy tej należą: witamina K₁ (filochinon), witamina K₂ (menachinon), witamina K₃ (menadion) (Rysunek 5).



Rysunek 5. Struktury witamin K

Filochinon w temperaturze pokojowej jest cieczą oleistą, nierozpuszczalną w wodzie. W temperaturze powyżej 100°C ulega rozkładowi. Jest wrażliwy na światło, na promieniowanie UV oraz na działanie zasad i mocniejszych kwasów. Występuje głównie w produktach roślinnych. **Menachinony** są związkami krystalicznymi o temperaturze topnienia powyżej 35°C, nierozpuszczalnymi w wodzie. Ich wrażliwość na światło, kwasy i zasady jest podobna do właściwości filochinonu. Pod działaniem substancji utleniających ulegają rozkładowi. Menachinony znajdują się głównie w tkankach zwierzęcych i drobnoustrojach. **Menadion** jest związkiem syntetycznym, wykazującym większą aktywność biologiczną niż witaminy naturalne, lepiej rozpuszcza się w wodzie i jest łatwiej przyswajany przez organizm.

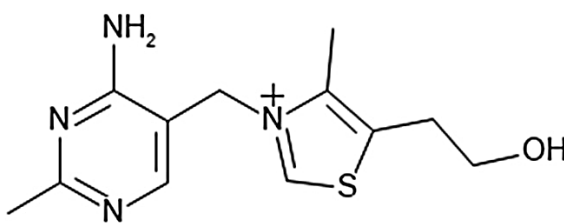
Witamina K jest niezbędna organizmom zwierzęcym do tworzenia czynników zapewniających prawidłową krzepliwość krwi. Katalizuje syntezę protrombiny w wątrobie. Niezależnie od tych funkcji prawdopodobnie bierze udział w formowaniu tkanki kostnej, ponadto ma również właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwbólowe i przeciwzapalne. Objawy niedoboru tej witaminy u człowieka występują bardzo rzadko, gdyż niezależnie od ilości

dostarczanych z pożywieniem, duża część jest syntetyzowana przez bakterie jelitowe w przewodzie pokarmowym. Awitaminozę mogą natomiast wywołać antybiotyki (niszczą bakterie przewodu pokarmowego). Witamina K występuje w znacznych ilościach w zielonych częściach roślin np. w kapuście i szpinaku.

1.1.2. Witaminy rozpuszczalne w wodzie

a) Witamina B₁

Cząsteczka tiaminy składa się z podstawionego pierścienia pirymidynowego związanego przez grupę metylenową z podstawionym pierścieniem tiazolowym. Z uwagi na funkcję azotu w pierścieniu tiazolowym (forma amoniowa) cała cząsteczka przejawia charakter dodatni – soli tiazoliniowych. Tiamina jest bardzo rozpowszechniona w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Najczęściej występuje jako difosforan tiaminy (pirofosforan), rzadziej jako niefosforylowana tiamina, bądź mono- lub trifosforan tiaminy. Difosforan tiaminy (TPP) jest koenzymem wielu enzymów o różnych funkcjach min. dekarboksylazy pirogronianowej. W handlu tiamina jest dostępna jako chlorek amoniowy chlorku tiaminy (nazywany też chlorkiem amoniowym tiaminy). Struktura tiaminy została zaprezentowana na Rysunku 6.



Witamina B₁ (tiamina)

Rysunek 6. Struktura witaminy B₁ (tiaminy)

Tiamina jest stosunkowo termostabilna, zwłaszcza w środowisku kwaśnym. W środowisku zbliżonym do obojętnego lub w zasadowym ulega rozkładowi na pojedyncze układy pierścieniowe, tracąc aktywność biologiczną. Destrukcyjnie działa na nią również SO₂. Straty witaminy podczas zabiegów kulinarnych i technologicznych są zatem najmniejsze w środowisku kwaśnym i przy ograniczonym dostępie tlenu. Niedobór witaminy B₁ prowadzi do choroby zwanej beri-beri, rozpowszechnionej dawniej w południowo-wschodniej Azji, objawiającej się zaburzeniami układu nerwowego i czynności serca oraz zanikiem mięśni. Witamina B₁ stanowi istotny czynnik

w reakcjach spalania węglowodanów w komórkach. Szczególnie ważną rolę pełni witamina B₁ w czynnościach i regeneracji systemu nerwowego. Wspomaga również proces wzrostu oraz przyspiesza gojenie się ran i wykazuje działanie uśmierzające ból. Dzielne zapotrzebowanie człowieka na witaminę B₁ wynosi przeciętnie 1- 2 mg i zależy od ilości sacharydów spożywanych i spalanych w organizmie. Najważniejszym źródłem witaminy B₁ są przetwory zbożowe (ok. 40 %), a następnie produkty mięsne (Tabela 4).

Tabela 4. Źródła witaminy B₁ w żywności

Produkt	Zawartość [mg/100 g lub mg/100 ml]
Drożdże	4,1
Pestki słonecznika	1,95
Kiełki pszenicy	1,76
Groch – suche nasiona	0,77
Szynka wieprzowa	0,68
Kasza gryczana	0,58
Mąka pełnoziarnista	0,54
Wątroba	0,26
Chleb graham	0,23

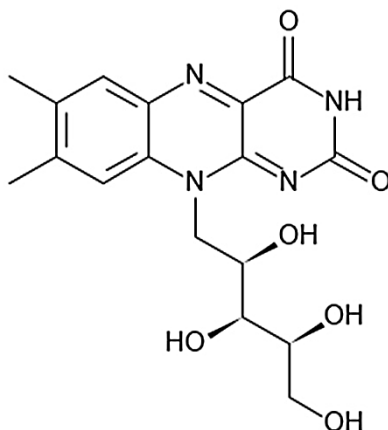
b) Witamina B₂ (ryboflawina)

Ryboflawina – 7,8-dimetylo-10-(1'-D-rybitylo)-izoaloksazyna (Rysunek 7), jest częścią składową wielu enzymów i występuje w tkankach prawie zawsze w formie związanej jako tzw. flawoproteina, tak więc organizm pobiera z pożywieniem na ogół flawoproteiny i fosforany flawinowe. Ryboflawina wchodzi w skład dwóch koenzymów: mononukleotydu flawinowego i dinukleotydu flawoadeninowego współdziałających z licznymi oksydoreduktazami.

Ryboflawina obecna w żywności jest dość stabilna w normalnych warunkach, natomiast, podobnie jak w przypadku innych witamin rozpuszczalnych w wodzie, występują straty witaminy B₂ podczas procesu rozdrabniania i płukania. W środowisku kwaśnym jest ona bardziej stabilna niż w alkalicznym. Pod wpływem światła łatwo ulega rozkładowi na związki niewykazujące aktywności biologicznej. Ryboflawina bierze udział w procesach utleniania i redukcji, współdziała w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, współuczestniczy z witaminą A w prawidłowym funkcjonowaniu błon śluzowych, dróg oddechowych, śluzówki przewodu pokarmowego, nabłonka naczyń krwionośnych i skóry, uczestniczy w przemianach aminokwasów

Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową



Witamina B₂ (ryboflawina)

Rysunek 7. Struktura witaminy B₂ (ryboflawiny)

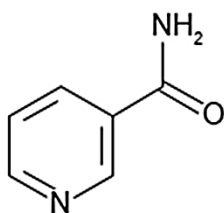
i lipidów, odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu narządu wzroku. Wiele faktów wskazuje na to, że ryboflawina odgrywa ważną rolę w tworzeniu się czerwonych krwinek, jak i samej krwi. Brak ryboflawiny powoduje u człowieka pękanie kącików ust i zmiany wokół oczu, u zwierząt natomiast zahamowanie wzrostu, zaburzenia skórne i oddechowe. Dzielne zapotrzebowanie na ryboflawinę wynosi od 1,5 do 3 mg. Jej najbogatszym źródłem jest wątroba, mięso, jaja. Źródła witaminy B₂ w żywności przedstawiono w Tabeli 5. Na ogół zapotrzebowanie na ryboflawinę jest pokrywane z nadmiarem, nie wykorzystaną ryboflawinę organizm wydala z moczem.

Tabela 5. Źródła witaminy B₂ w żywności

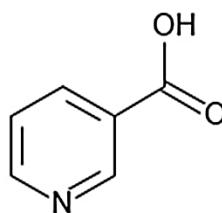
Produkt	Zawartość [mg/100 g lub mg/100 ml]
Drożdże	11,9
Wątroba wieprzowa	2,98
Migdały	0,78
Jajko	0,54
Ser twarogowy	0,45
Łosoś	0,37
Groch – nasiona suche	0,28
Szpinak	0,18

c) Witamina B₃ (PP)

Niacyna, czyli witamina B₃, zwana też witaminą PP obejmuje amid kwasu nikotynowego, kwas nikotynowy oraz pochodne wykazujące biologiczną aktywność nikotynoamidu. Witamina PP jest zaliczana do kompleksu witamin grupy B. Pod względem chemicznym jest pochodną pirydyny (Rysunek 8).



**Amid kwasu nikotynowego
(nikotynamid)**



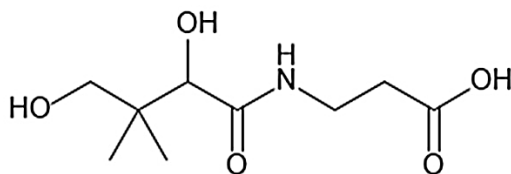
**Kwas nikotynowy
(niacyna)**

Rysunek 8. Struktury witaminy B₃ (PP)

Zarówno kwas nikotynowy, jak i jego amid są równo cenne pod względem aktywności biologicznej; każda z tych substancji może łatwo ulegać przemianie w drugą. Oba związki powstają w organizmie z tryptofanu. Nikotynoamid jest składnikiem dwóch koenzymów współdziałających z dehydrogenazami – dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego i jego fosforanu (NAD⁺, NADP⁺). Witamina PP w produktach żywnościowych występuje więc w różnych formach: kwas nikotynowy, amid kwasu nikotynowego, NAD⁺, NADP⁺. Witamina PP jest termostabilna i niewrażliwa na odczyn środowiska oraz utlenianie. Największe straty tych związków następują w wyniku rozdrabniania i wypłukiwania wodą. Witamina ta uczestniczy w regulacji poziomu cukru we krwi (produkcja związków energetycznych), regulacji poziomu cholesterolu, w procesach utleniania i redukcji w organizmie. Wpływa też na odpowiedni stan skóry, uczestniczy w regulacji przepływu krwi w naczyniach oraz współdziała w syntezie hormonów płciowych. Niedobór tej witaminy wywołuje biegunkę i majaczenia. Dzielne zapotrzebowanie człowieka na witaminę PP wynosi 10-25 mg. Do bogatych źródeł tej witaminy należą wątroba, mięso, ryby, ziarna zbóż oraz drożdże.

d) Witamina B₅ (kwas pantotenowy)

Kwas pantotenowy zbudowany jest z reszt kwasu 2,4-dihydroksy-3,3- dimetylo-masłowego i β -alaniny, połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym (Rysunek 9).



**Witamina B₅
(kwas pantotenowy)**

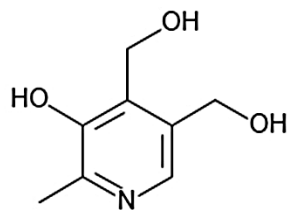
Rysunek 9. Struktura witaminy B₅ (kwasu pantotenowego)

Kwas pantotenowy jest zaliczany do kompleksu witamin B. W układach biologicznych jest składnikiem koenzymu A, a także kompleksu wieloenzymowego katalizującego syntezę kwasów tłuszczowych. Jest to związek dość trwały, przy czym pochodne fosforanowe, odznaczają się większą trwałością, zwłaszcza w środowisku alkalicznym. Kwas pantotenowy uczestniczy w syntezie hemu do hemoglobiny i cytochromów. Bierze udział w regeneracji komórek skóry i błon śluzowych, uczestniczy w wytwarzaniu przeciwciał. Wspomaga proces pigmentacji włosów. Na skutek znacznego rozpowszechnienia w produktach spożywczych nie obserwuje się u ludzi objawów braku tej witaminy. Dzielne zapotrzebowanie ocenia się na około 5 mg. Bogatym źródłem kwasu pantotenowego są min.: wątroba, mięso, jaja, groch oraz całe ziarna zbóż.

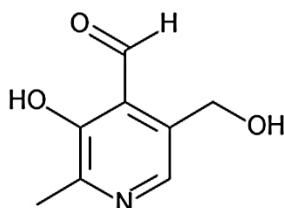
e) Witamina B₆ (pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina)

Nazwa witamina B₆ jest używana jako określenie wszystkich pochodnych 3-hydroksy-2-metylopirydyny. Strukturę tych trzech form (Rysunek 10) stanowi pierścień pirydynowy podstawiony w pozycji 2 grupą metylową, w pozycji 3 grupą hydroksylową, w pozycji 5 – hydroksymetylową, natomiast pozycja 4 jest podstawiona zmienną grupą reaktywną.

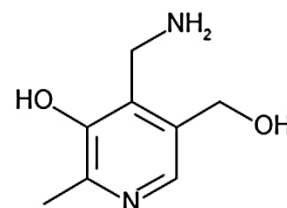
Te trzy związki (triada pirydoksynowa) posiadają prawie takie same działanie. Czynnymi biologicznie formami witaminy B₆ (koenzymami) są fosforanowe pochodne pirydoksaminy i pirydoksalu.



Pirydoksyna



Pirydoksal



Pirydoksamina

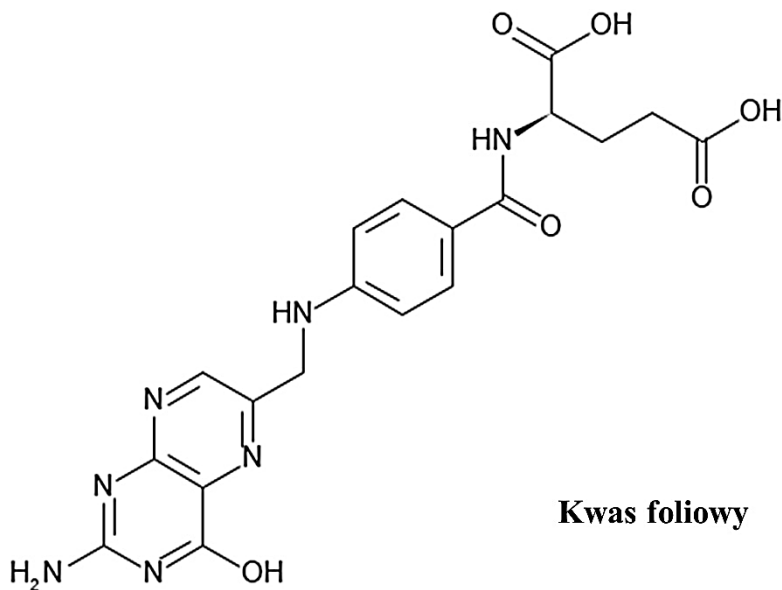
Rysunek 10. Struktury witamin B₆

Enzymy z takimi koenzymami biorą udział głównie w przemianach aminokwasów, np. w racemizacji optycznie czynnych aminokwasów, dekarboksylacji aminokwasów. Reagując z aminokwasami fosforan pirydoksalu tworzy zasadę Schiffa, która dzięki nietrwałemu układowi elektronów, może reagować wielokierunkowo. Reakcja tworzenia się zasady Schiffa jest odwracalna i najłatwiej przebiega w obecności nadmiaru aminokwasów. Fosforan pirydoksalu współdziała również z fosforylazą glikogenową oraz bierze udział w reakcji transaminacji. Witamina B₆ podnosi odporność immunologiczną organizmu i uczestniczy w tworzeniu przeciwciał. Pomaga w zamianie tryptofanu na witaminę PP, co zwiększa poziom tej witaminy w organizmie, jest również niezbędna w syntezie porfiryń (synteza hemu do hemoglobiny w produkcji krwinek czerwonych) i hormonów (np: histamina, serotonina).

Związki należące do triady pirydoksynowej są dość trwałe w procesach obróbki termicznej i nie ulegają wyraźnym przemianom pod wpływem tlenu atmosferycznego. Są stosunkowo wrażliwe na działanie światła, zwłaszcza w obojętnych i alkalicznych roztworach. Z uwagi na znaczne rozpowszechnienie tych substancji w pożywieniu, objawy niedoboru tej witaminy (stany zapalne skóry, podrażnienie błon śluzowych jamy ustnej, zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym: apatia, bezsenność, nadwrażliwość, napady drgawek, zwiększona podatność na infekcje, nadmierne pocenie się, niedokrwistość makrocytarna), występują bardzo rzadko. Dzielne zapotrzebowanie organizmu człowieka na tą witaminę nie jest ustalone, przypuszcza się, że wynosi ono kilka miligramów. Do najbogatszych źródeł witaminy B₆ należą: wątroba, ryby, mięso, warzywa, produkty zbożowe.

f) Kwas foliowy

Kwas foliowy należy do grupy witamin B. Jest on też zwany *kwasem pteroiloglutaminowym*, ponieważ zawiera „fragmenty” pochodnej pterydyny (2-amino-4-hydroksy- 6-metylopterydynę), kwasu *p*-aminobenzoesowy i kwasu glutaminowy (Rysunek 11).



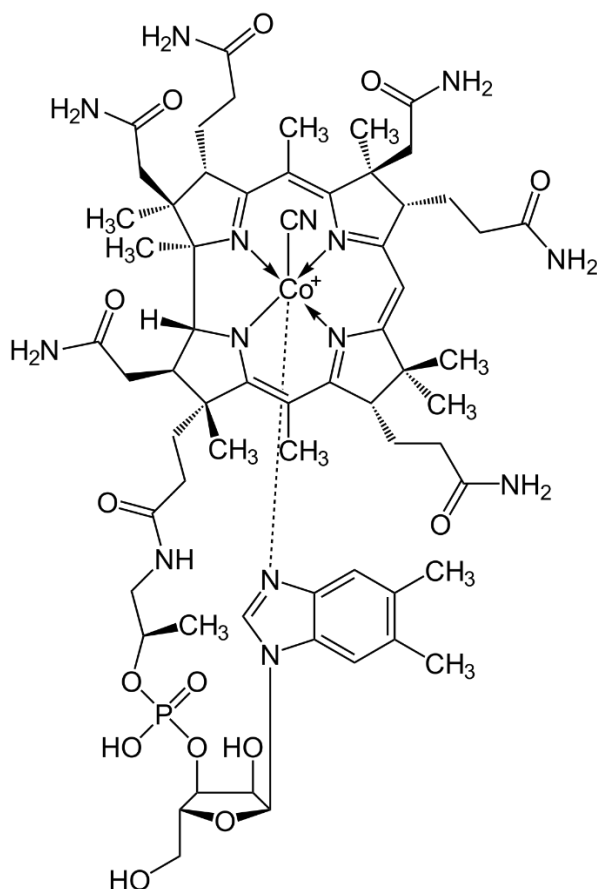
Rysunek 11. Struktura kwasu foliowego

Obecnie termin „kwas foliowy” ma szersze znaczenie i dotyczy wielu związków, ze względu na dużą ilość analogów i związków pokrewnych. W przyrodzie występują kwasy foliowe, które mają do siedmiu reszt kwasu glutaminowego połączonych wiązaniami peptydowymi. W czasie ogrzewania, w środowisku kwaśnym lub alkalicznym następuje hydrolityczne odszczepienie od kwasu foliowego reszty *p*-aminobenzoiloglutaminowej. W środowisku obojętnym jego rozkład jest nieznaczny. Jest on wrażliwy na światło, czynniki utleniające i redukujące. Kwas foliowy, uczestniczy w tworzeniu kwasów nukleinowych DNA i RNA, syntezie aminokwasów, puryn, pirymidyn, bierze udział w procesie podziału komórek, pełni ważną funkcję w procesie tworzenia czerwonych ciałek krwi (wraz z witaminą B12) oraz w procesach mielizacji (tworzenie osłonki mielinowej) neuronów i przy przekształcaniu homocysteiny w metioninę. Jako koenzym F w układach enzymatycznych uczestniczy w przenoszeniu reszt jednowęglowych. Niedobór kwasu foliowego objawia się głównie zmianami w obrazie krwi, prowadząc do anemii megaloblastycznej.

Po raz pierwszy kwas foliowy wyizolowano z liści szpinaku, jego bogatym źródłem są zielone części roślin, wątroba oraz drożdże. Dzielne zapotrzebowanie na tę witaminę wynosi ok. 0,4 mg. Niedobór tej witaminy w organizmie jest dość częstym zjawiskiem, a jego przyczynami mogą być: zła dieta, straty witaminy podczas przetwarzania, różne stany fizjologiczne (ciąża, laktacja), nadużywanie alkoholu i leków oraz zaburzenia wchłaniania w przewodzie pokarmowym.

g) Witamina B₁₂ (kobalamina)

Witamina B₁₂, należy do grupy korynoidów, gdyż zawiera w swoim składzie układ korynowy (pseudoporfirynowy). Układ ten jest zbudowany z czterech zredukowanych pierścieni pirolowych i umieszczonego centralnie, związanego kompleksowo, atomu kobaltu z przyłączoną do niego grupą cyjanową (Rysunek 12). Oprócz tego w cząsteczce występuje fragment nukleotydowy z zasadą benzimidazolową. Rybozyd 5,6-dimetylobenzimidazolu jest połączony przez rybozę i resztę fosforanową z 1-amino-2-propanolem.



Rysunek 12. Struktura witaminy B₁₂ (kobalaminy)



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

Inny związek z grupy B zawiera zamiast grupy cyjanowej – grupę hydroksylową – witamina B_{12b}. Stwierdzono również występowanie związku, który zamiast 5,6- dimetylobenzimidazolu ma w cząsteczce resztę adeniny, związek ten nazwano pseudowitaminą B₁₂. W komórce witamina B₁₂ występuje tylko w postaci koenzymu (adenozylkobalaminy lub metylokobalaminy) Dopiero po przekształceniu powstaje najczęściej forma izolowana – cyjanokobalamina. Funkcje biochemiczne koenzymu B₁₂ polegają na jego udziale w kilku typach reakcji min. izomeryzacji kwasów dikarboksylowych, przekształcania rybonukleotydów w deoksyrybonukleotydy, przenoszenia grup metylowych. Witamina B₁₂ w stanie czystym jest termostabilna. Wodne roztwory są trwałe w zakresie pH 4-7, rozkładają się jednak pod wpływem światła.

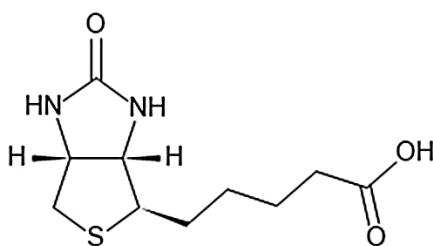
Witamina B₁₂ jest czynnikiem zapobiegającym anemii złośliwej. Jest to związane z współdziałaniem tej witaminy w budowie czerwonych krwinek oraz aktywacji kwasu foliowego. Istnieje pogląd, że anemia złośliwa nie jest tylko następstwem braku witaminy B₁₂ w pożywieniu, lecz również zakłóceniem w jej resorpcji. Kobalamina może być przyswajana przez organizm człowieka tylko w obecności tzw. czynnika wewnątrzpochodnego – glikoproteiny zawierającej kwas neuraminowy, powstającej normalnie w błonie śluzowej żołądka. Brak tego czynnika (zwanego też czynnikiem Castle'a) występuje u ludzi chorych na anemię złośliwą. Występowanie witaminy B₁₂ w przyrodzie jest bardzo ograniczone. W roślinach nie występuje w ogóle lub w ilościach śladowych, w produktach pochodzenia zwierzęcego jej stężenie jest bardzo małe. Do bogatszych źródeł witaminy B₁₂ należą wątroba i nerki oraz mięso wołowe. W niewielkim stopniu zapotrzebowanie na tą witaminę jest pokrywane dzięki syntezie kobalaminy przez mikroflorę przewodu pokarmowego. Zapotrzebowanie dobowe na witaminę B₁₂ wynosi około 0,003 mg.

h) Witamina H (biotyna)

Biotyna składa się z dwóch skondensowanych układów pierścieniowych – imidazolowego i tetrahydrotiofenowego, podstawionego w pozycji 2 resztą kwasu *n*-walerianowego (Rysunek 13).

Spośród ośmiu izomerów optycznie czynnych i czterech mieszanin racemicznych jedynie D-biotyna jest aktywna biologicznie. Związek ten jest termostabilny w środowisku obojętnym. Pod wpływem silniejszych kwasów i zasad rozkłada się. W materiale biologicznym biotyna występuje w stanie wolnym lub w połączeniu z białkiem za pomocą lizyny, połączenie to nazywane jest biocytyną. Biotyna występuje jako wolna lub związana z białkiem w wielu naturalnych produktach roślinnych i zwierzęcych. Do głównych źródeł biotyny należą drożdże, wątroba, w mniejszych ilościach występuje w innych produktach, np.: w żółtku jaj, grochu, kalafiorze. Ogólnie jednak

zawartość biotyny w produktach spożywczych jest mała. Witamina ta pełni rolę przekaźnika dwutlenku węgla w różnych procesach przemiany materii. Wytwarzana jest przez bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym. Bierze udział w metabolizmie białek i tłuszczów, uczestniczy w syntezie kwasów tłuszczowych, jak też przy wchłanianiu witaminy C. Współdziała w przemianie aminokwasów i cukrów jak również uczestniczy z witaminą K w syntezie protrombiny białka odpowiedzialnego za prawidłowe krzepnięcie krwi. Wpływa na właściwe funkcjonowanie skóry oraz włosów, zapobiega siwieniu włosów oraz łysieniu. Niedobór witaminy H u ludzi występuje bardzo rzadko i objawia się m.in. zmianami w skórze, bólami mięśniowymi, osłabieniem, apatią, stanami lękowymi i halucynacjami. Przepuszczalne dzienne zapotrzebowanie człowieka na biotynę wynosi około 100 µg.



**Witamina H
(biotyna)**

Rysunek 13. Struktura witaminy H (biotyny)

i) Witamina C (kwas L-askorbinowy)

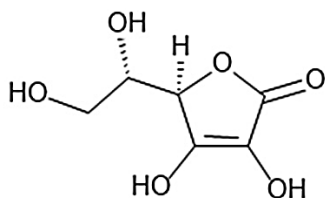
Przed poznaniem budowy chemicznej witaminy C była nazywana czynnikiem przeciwnilcowym. Zapobiegała bowiem skorbutowi, który znali już Wikingowie i zwalczali za pomocą cebuli. W 1928 Szent-György uzyskał z wyciągów z nadnerczy, kapusty i pomarańczy związek, który wykazywał właściwości oksydoredukcyjne. Szent-György nie zdawał sobie sprawy, że związek ten to witamina C nazwana przez niego kwasem heksuronowym. W 1932 Wang i King otrzymali witaminę C z cytryny. W rok później Haworth, Hirst i współpracownicy ustalili budowę chemiczną witaminy C. W latach 1933-34 Reichstein i współpracownicy dokonali syntezy kwasu askorbinowego (nazwa ta pochodzi od skorbutu).

Własności witaminy wykazuje C kwasu L-askorbinowy oraz jego forma utleniona - kwas L-dehydroaskorbinowy. Pod względem chemicznym kwas L-askorbinowy jest laktone endiolu

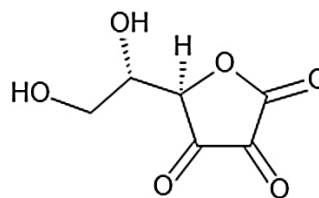
Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

kwasu 2-okso-L-gulonowego, a kwas L-dehydroaskorbinowy laktonem kwasu 2,3- diokso-L-gulonowego (Rysunek 14).



Kwas L-askorbinowy



Kwas dehydroaskorbinowy

Rysunek 14. Struktura kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego

Kwas L-askorbinowy jest związkami krystalicznym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie a jego roztwory mają smak kwaśny. Wykazuje właściwości redukujące. W warunkach beztlenowych jest odporny na wysoką temperaturę. Kwas dehydroaskorbinowy jest mniej trwały w tych warunkach i tym tłumaczy się straty witaminy C podczas ogrzewania. W obecności tlenu obie formy ulegają nieodwracalnemu utlenianiu do produktów nieaktywnych biologicznie, zwłaszcza w obecności jonów niektórych metali, szczególnie Cu^{2+} i Fe^{3+} . Biologiczne funkcje kwasu askorbinowego nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Układ oksydoredukcyjny kwas askorbinowy \leftrightarrow kwas dehydroaskorbinowy może uczestniczyć w regulowaniu potencjału oksydoredukcyjnego w komórce i brać udział w transporcie elektronów. Ponieważ witamina C występuje w znacznych ilościach w gruczołach nadnercza, przypuszcza się, że uczestniczy ona w syntezie hormonów sterydowych. Witamina C, uczestniczy w produkcji kolagenu i podstawowych białek w całym organizmie (kości, chrząstki, ścięgna, więzadła). Jako jeden z najważniejszych przeciwutleniaczy pełni także istotną funkcję w reakcjach odtruwania i odporności organizmu chroniąc go przed procesami utleniania, uczestniczy w metabolizmie tłuszczów, cholesterolu i kwasów żółciowych. Jest czynnikiem stabilizującym układ odpornościowy i immunologiczny, hamuje powstawanie w żołądku rakotwórczych nitrozoamin. Ma właściwości bakteriostatyczne i bakteriobójcze w stosunku do niektórych drobnoustrojów chorobotwórczych. Dla większości ssaków kwas askorbinowy nie jest witaminą, gdyż mogą go samodzielnie syntezować. Jedynie człowiek, małpy człekokształtne i świnka morska nie produkują enzymu przekształcającego lakton kwasu L-gulonowego w kwas askorbinowy. Zapotrzebowanie człowieka na witaminę C jest bardzo duże,



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

o około dwa rzędy wielkości większe niż na inne witaminy, wynosi średnio 50 - 100 mg. Niedobór kwasu askorbinowego, objawiający się: wolniejszym gojeniem się ran, bladością skóry i błon śluzowych, zaburzeniami w przemianie kwasów tłuszczowych, osłabieniem naczyń włosowatych i możliwością powstawania mikrowylewów w różnych narządach, zmniejszeniem odporności na infekcje oraz występowaniem szkorbutu (obrzęki i krwawienie z dziąseł oraz wypadanie zębów), występuje dziś niezwykle rzadko. Nadmiar witaminy C jest usuwany z moczem, jednakże stosowanie wysokich dawek powoduje zakwaszenie moczu, upośledzając w ten sposób wydalanie stałych kwasów i zasad. Kwaśny odczyn moczu może powodować wytrącanie się moczanów i cystynianów oraz tworzenie się kamieni w drogach moczowych. Do głównych źródeł witaminy C należą owoce i warzywa (Tabela 7), ponadto z uwagi na duże zapotrzebowanie organizmu na tę witaminę oraz straty w procesach kulinarnych i technologicznych duże znaczenie ma produkcja produktów wzbogaconych w witaminę C oraz witaminy syntetycznej.

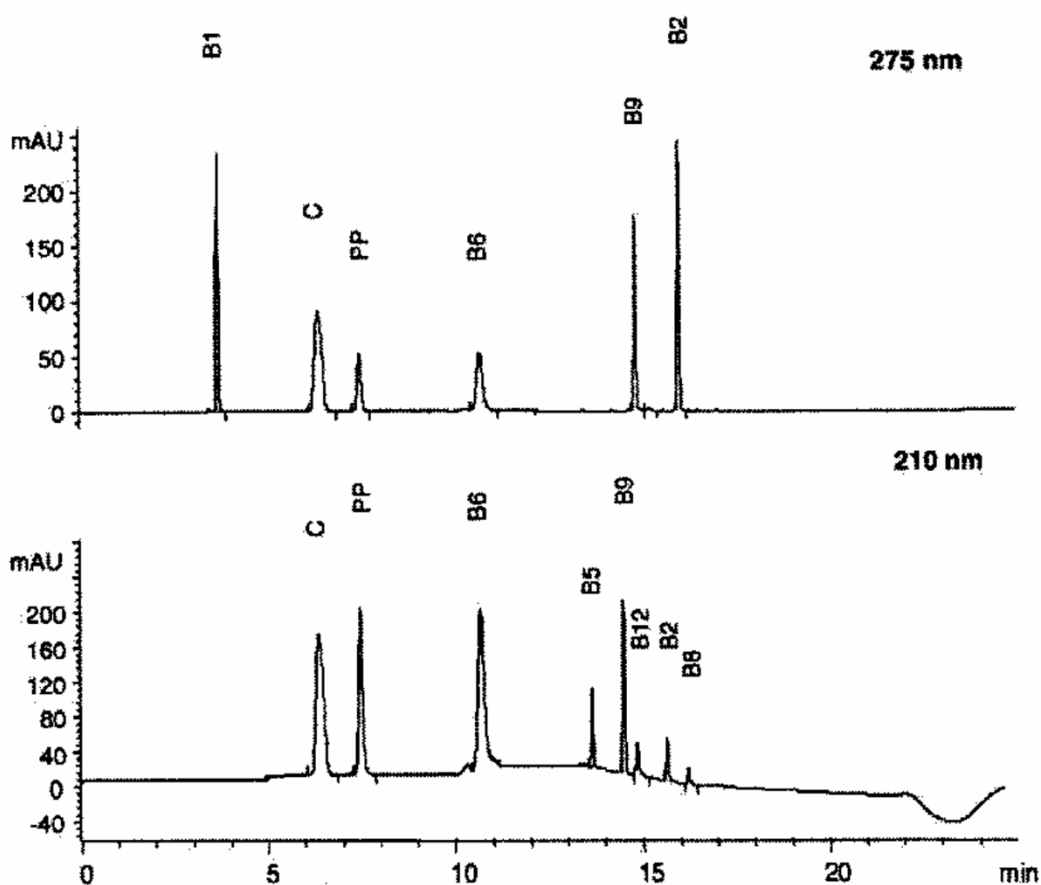
Tabela 6. Źródła witaminy C w żywności

Produkt	Zawartość [mg/100 g lub mg/100 ml]
Dzika róża (suszona)	1700
Guava	230
Czarna porzeczka	183
Papryka czerwona	144
Brukselka	94
Papryka zielona	91
Kalafior	69
Szpinak	68
Truskawki	68
Poziomki	60
Papaja	60
Kiwi	59
Kapusta czerwona	54
Cytryna	50
Pomarańcza	49

1.2. Metody oznaczania witamin

1.2.1. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do analizy witamin

W analizie jakości produktów spożywczych oznaczanie zawartości witamin zajmuje ważną pozycję. Ilościowe oznaczanie witamin w produktach spożywczych sprawia wiele trudności, co jest spowodowane występowaniem ich w bardzo małych ilościach oraz wrażliwością na czynniki fizykochemiczne. Duża część witamin występuje w produktach w postaci związanej, co wymaga zastosowania np. hydrolizy kwasowej lub enzymatycznej. Jakościowe i ilościowe oznaczanie zawartości witamin i prowitamin wykonuje się różnymi metodami (metody fizykochemiczne, chemiczne). Ostatnio coraz częściej w analizie witamin stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową, najczęściej w odwróconym układzie faz z zastosowaniem kolumny RP-C18. Jako fazy ruchome używa się mieszaniny wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluoroctowego) i acetonitrylu, lub wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluoroctowego) i metanolu.



Rysunek 15. Chromatogramy HPLC-UV mieszaniny witamin rozpuszczalnych w wodzie



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

Do wykrywania związków lub ich grup w HPLC stosuje się różne rodzaje detektorów. Najczęściej stosowanymi detektorami są detektory spektrofotometryczne (UV), spektrofotometryczne z matrycą diod (DAD) oraz spektrometry mas (MS). Przykładowe warunki chromatograficzne rozdzielania mieszanin witamin rozpuszczalnych w wodzie (B₅, B₈, B₁₂, B₁, C, PP, B₆, B₉, B₂) są następujące: kolumna RP-C18, detektor DAD rejestrujący przy dwóch długościach fali: $\lambda = 210$ nm dla witamin B₅, B₈ i B₁₂ oraz $\lambda = 275$ nm dla witamin B₁, C, PP, B₆, B₉, B₂. Jako fazę ruchomą zastosowano układ rozpuszczalników: acetonitryl (faza A), 0,025% wodny roztwór kwasu trifluoroctowego o pH = 2,6 (faza B). Rozdział prowadzono z zastosowaniem elucji gradientowej. Chromatogramy rozdzielania witamin są przedstawione na Rysunku 15.

1.2.2. Metody oznaczania witaminy C

Wśród metod oznaczania witaminy C można wyróżnić metody fizykochemiczne: chromatografia cieczowa, metoda spektrofotometryczna i metoda potencjometryczna oraz chemiczne.

a) Chromatografia cieczowa

Witamina C jest najbardziej stabilna w środowisku kwaśnym, dlatego do jej ekstrakcji z próbek stałych oraz rozcieńczania używa się rozcieńczonych roztworów kwasów: 2% kwasu szczawiowego, 3% kwasu metafosforowego (V), 8% kwasu octowego czy 2% kwasu solnego. Zasada metody polega na oznaczeniu łącznej zawartości kwasów: L-askorbinowego i dehydroaskorbinowego. Kwas dehydroaskorbinowy jest redukowany do kwasu L-askorbinowego za pomocą DTT (ditiotretolu). Witamina C oznaczana jest techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem kolumny RP-C18 i detektora UV ($\lambda = 254$ nm).

b) Metoda fluorymetryczna

Oznaczenie polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego do L-dehydroaskorbinowego i przeprowadzeniu reakcji z o-fenylendiaminą, w wyniku której powstaje fluoryzujący kompleks. Jego natężenie mierzy się przy długości fali światła wzbudzającego $\lambda_{\text{Ex}} = 365$ nm oraz długości fali światła emitowanego $\lambda_{\text{Em}} = 430$ nm.

c) Metoda spektrofotometryczna

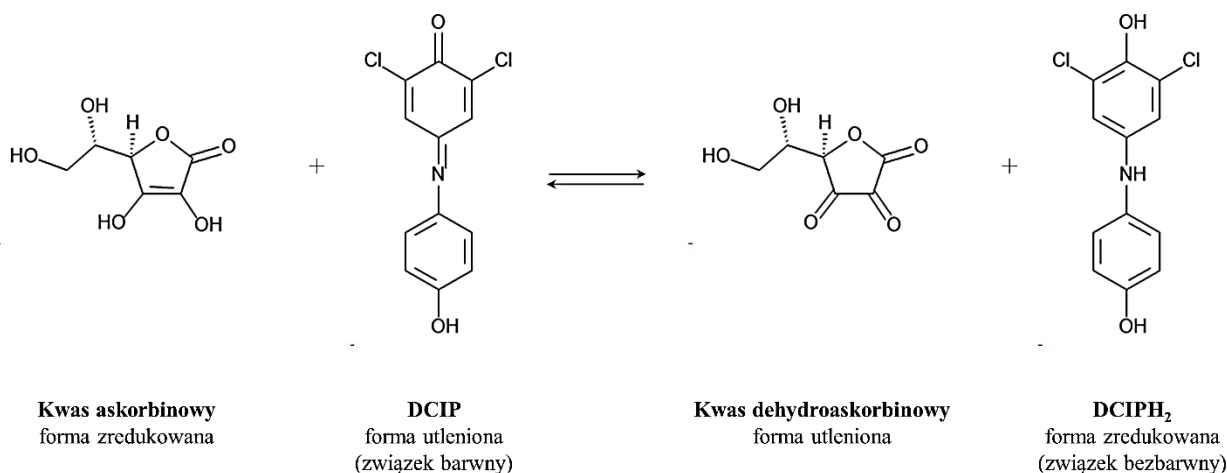
Rozdrobnioną próbkę zawieszają w rozcieńczonym kwasie metafosforowym (V), a następnie ekstrahują chloroformem. W celu przeprowadzenia kwasu askorbinowego w kwas

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

dehydroaskorbinowy faza wodna jest poddawana działaniu roztworu 2,6- dichlorofenoloindofenolu, a następnie roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny. Utworzony hydrazon jest ekstrahowany mieszaniną octanu etylu, lodowatego kwasu octowego i acetonu (96:2:2). Ekstrakt oczyszcza się metodą chromatografii adsorpcyjnej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, jako fazę ruchomą stosuje się mieszaninę dichlorometanu i lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 97:3. Eluat odparowuje się do sucha i pozostałość rozpuszcza się w rozcieńczonym kwasie siarkowym. Absorbancję roztworu mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 509 \text{ nm}$. pomiary przeprowadza się w odniesieniu do rozcieńczonego kwasu siarkowego.

d) Metoda Tillmansa i jej modyfikacje (metoda chemiczna)

Metoda Tillmansa oparta jest na redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas L-askorbinowy. Przebieg reakcji przedstawiono na Rysunku 16.



Rysunek 16. Reakcja redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCIP) przez kwas askorbinowy

Metoda ta sprowadza się do miareczkowania roztworu kwasu L-askorbinowego barwnikiem Tillmansa do momentu pojawienia się jasno różowego zabarwienia. Stosowany podczas oznaczenia niebieski barwnik 2,6-dichlorofenoloindofenol w środowisku kwaśnym w formie utlenionej przyjmuje zabarwienie różowe, natomiast w formie zredukowanej jest bezbarwny. Trwała barwa różowa podczas miareczkowania powstaje po całkowitym utlenieniu zawartego w próbce kwasu askorbinowego. Jest to metoda prosta, ale tylko w przypadku roztworów bezbarwnych i niezawierających innych związków powodujących redukcję odczynnika Tillmansa. W praktyce



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

wiadomo, że większość surowców roślinnych zawiera barwniki antocyjanowe, które nadają ekstraktom witaminy C różowe zabarwienie, a także mają właściwości redukujące. Ponadto w produktach, w których oznaczany witaminę C, występują inne związki ulegające utlenieniu podczas miareczkowania odczynnikiem Tillmansa. Należą do nich reduktony – związki obdarzone silnymi właściwościami redukującymi, które należy przypisywać obecności ugrupowania endiolowego. W przypadku oznaczania witaminy C w owocach i warzywach oraz ich przetworach mamy do czynienia z reduktonami białkowymi (aminokwasy lub białka zawierające grupy sulfhydrylowe, które są utleniane przez odczynnik Tillmansa do wiązań disulfidowych) oraz cukrowymi (pochodne cukrów, które powstają podczas obróbki termicznej).

W przypadku roztworów silnie zabarwionych stosuje się modyfikację metody Tillmansa, tzn. miareczkowanie 2,6-dichlorofenoloindofenolem w obecności rozpuszczalnika organicznego (chloroform, ksylen). Wykorzystuje się tu fakt zróżnicowanej rozpuszczalności. Barwniki antocyjanowe, w odróżnieniu od barwnika Tillmansa, nie rozpuszczają się w rozpuszczalniku organicznym, natomiast barwnik Tillmansa rozpuszcza się. Nadmiarowa kropla 2,6-dichlorofenoloindofenolu przechodzi do warstwy rozpuszczalnika barwiąc go na różowo.

Właściwości witaminy C ma również kwas L-dehydroaskorbinowy. W celu oznaczenia całkowitej zawartości witaminy C przeprowadza się redukcję kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego za pomocą siarkowodoru. Nadmiar siarkowodoru usuwa się przy użyciu sublimatu, przy czym wytrąceniu ulegają również reduktony białkowe. Na wynik miareczkowania składa się zawartość kwasu L-dehydroaskorbinowego, kwasu L-askorbinowego i reduktonów cukrowych. W oznaczeniach witaminy C metodą Tillmansa w produktach spożywczych należy wykonać cztery następujące miareczkowania, a uzyskane wyniki pozwolą na obliczenie całkowitej zawartości witaminy C po wyeliminowaniu wpływu reduktonów białkowych i cukrowych:

1. Bezpośrednie miareczkowanie roztworu witaminy C – na wynik składa się zawartość kwasu L-askorbinowego, reduktonów białkowych i cukrowych,
2. Miareczkowanie badanego wyciągu po przeprowadzonej uprzednio redukcji kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego – na wynik składa się zawartość kwasu L-askorbinowego, kwasu L-dehydroaskorbinowego i reduktonów cukrowych,
3. Miareczkowanie roztworu po uprzednim wytrąceniu kwasu L-askorbinowego i reduktonów białkowych – wynikowi odpowiada zawartość reduktonów cukrowych,
4. Miareczkowanie po wytrąceniu reduktonów białkowych – na wynik miareczkowania mają wpływ zawartość kwasu L-askorbinowego i reduktonów białkowych.



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na oznaczaniu zawartości kwasu L-askorbinowego w wybranym soku owocowym

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki:

- roztwór barwnika DCIP – 250 ml
- roztwór tiosiarczanu sodu ($c = 0,001 \text{ mol/dm}^3$) – 250 ml
- roztwór skrobi (NA ŚWIEŻO!) – 50 ml
- kwas siarkowy (VI), 1 mol/dm^3 – 100 ml
- 2% roztwór kwasu solnego – 500 ml
- jodek potasu (KI) – 10 g

b) Akcesoria laboratoryjne:

- kolby stożkowe, 100 ml – 12 szt.
- korki szklane – 3 szt.
- kolba miarowa, 50 ml – 3 szt.
- biureta, 10 ml – 2 szt.
- pipeta szklana, 1 ml – 1 szt.
- pipeta szklana, 5 ml – 1 szt.
- pipeta szklana, 10 ml – 6 szt.
- tuby wirówkowe – 4 szt.
- łopatką – 1 szt.
- pipety Pasteura – 10 szt.

2.3. Wykonanie ćwiczenia

2.3.1. Oznaczanie miana 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCIP)

W kolbie stożkowej z doszlifowanym korkiem o pojemności 50 cm^3 rozpuścić 100 mg jodku potasu w 5 cm^3 kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 1 mol/dm^3 , dodać szybko 10 cm^3 roztworu 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCIP), kolbę zamknąć i pozostawić na 10 min w ciemnym miejscu.



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

Wydzielony jod miareczkować roztworem tiosiarczanu sodu (0,001 mol/dm³), dodając 1 cm³ roztworu skrobi. Miareczkowanie powtórzyć 3 razy.

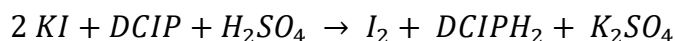
2.3.2. Oznaczanie witaminy C w soku metodą Tillmansa

20 cm³ badanego soku umieścić w probówce wirówkowej i odwirować (4000 obr./min., 10 min.). 10 cm³ odwirowanego soku z cytryny rozcieńczyć 2% HCl w kolbie miarowej o pojemności 50 cm³. Do trzech kolb stożkowych o pojemności 25 cm³ pobrać po 10 cm³ rozcieńczonego soku i miareczkować barwnikiem Tillmansa (DCIP) do barwy lekko różowej utrzymującej się 10 s. **Wykonać ślepią próbę**, w której zamiast rozcieńczonego soku pobrać wodę destylowaną. Do obliczeń przyjąć ilość zużytego roztworu barwnika pomniejszoną o ilość ml barwnika zużytą w próbie ślepej.

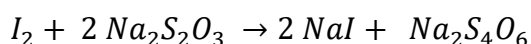
2.4. Opracowanie wyników

— Obliczyć miano roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCIP):

W pierwszej kolejności barwnik DCIP reaguje z anionami jodkowymi (KI), w efekcie czego powstaje równoważna ilość jodu (I₂):



Następnie, jod cząsteczkowy tworzy z zastosowanym wskaźnikiem (skrobią) kompleks o barwie niebieskiej, która zanika w miarę miareczkowania tiosiarczanem sodu:



Z wyżej wymienionych reakcji wynika, że na 1 mol barwnika DCIP przypadają 2 mole tiosiarczanu sodu. W związku z tym miano barwnika można wyliczyć ze wzoru:

$$C_{DCIP} = \frac{V_T \cdot C_T}{2 V_{DCIP}}$$

gdzie:

C_{DCIP} – stężenie molowe barwnika DCIP [mol/dm³]

V_T – objętość tiosiarczanu sodu zużyta do zmiareczkowania roztworu barwnika [ml]

C_T – stężenie molowe roztworu tiosiarczanu sodu [mol/dm³]

V_{DCIP} – objętość roztworu barwnika [ml]



Analiza Żywności

7. Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą miareczkową

- Z równania reakcji między kwasem askorbinowym i barwnikiem DCIP (Rysunek 16, Rozdział 1.2.2, podpunkt d) wynika, że z 1 molem kwasu askorbinowego reaguje 1 mol barwnika. Zatem, na podstawie objętości barwnika zużytego do miareczkowania rozcieńczonego soku, obliczyć zawartość witaminy C w czystym soku. Wynik wyrazić w mg/100 g.

3. Literatura:

- Sikorski Zdzisław E.(red.), Chemia Żywności, wyd. 4, WNT, Warszawa, 2002.
- Klepacka Mirosława (red.), Analiza żywności, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
- Małecka Maria (red.), Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
- Krelowska-Kułas Maria, Badanie jakości produktów spożywczych, PWE, Warszawa 1993

4. Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- charakterystyka witamin
- metody oznaczania witamin (szczególnie oznaczanie witaminy C metodą Tillmansa)

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.