



Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Ćwiczenia laboratoryjne - teoria

Witaminy

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

1. Wprowadzenie

Witaminy są to niskocząsteczkowe związki organiczne, o różnorodnej budowie chemicznej, rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Związki te 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 witaminy – 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 provitamin 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 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.

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 ważniejszych witamin

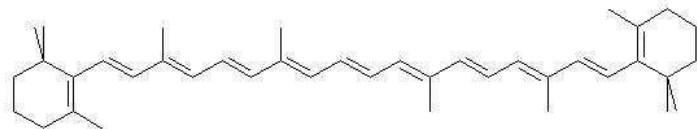
Oznaczenia literowe	Podstawowe związki i nazwy
<i>Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach</i> A ₁ A ₂ D ₂ D ₃ E K ₁ K ₂ K ₃	Retinol 3-Dehydroretinol Ergokalciferol Cholekalciferol Tokoferole, tokotrienole Filochinon Menachinon- <i>78</i> Menadion
<i>Witaminy rozpuszczalne w wodzie</i> B ₁ B ₂ B ₃ , PP B ₅ B ₆ B ₉ , B _C B ₁₂ H C	Tiamina Ryboflawina Kwas nikotynowy, amid kwasu nikotynowego Kwas pantotenowy Pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina Kwas foliowy Cyjanokobalamina, hydroksykobalamina-B _{12B} Biotyna Kwas L-askorbinowy

1.2. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

Pochodne izopentenu zawierające w cząsteczce składniki nieterpenowe, zwykle o charakterze chinonów, pełnią w komórkach roślin ważne, choć nie zawsze wyjaśnione funkcje. Do związków tych należą witaminy grup E i K, ubichinony i plastochinony oraz wiele mniej rozpowszechnionych i o nie całkowicie zbadanych funkcjach. Biorąc pod uwagę fakt, że witaminy grup A i D mają pochodzenie terpenowe, należy przyjąć, że wszystkie witaminy rozpuszczalne w tłuszczach są pochodnymi izopentenu.

1.2.1. Witamina A

Jedynymi przedstawicielami tetra terpenów, czyli związków o 40 atomach węgla są karotenowce. Są to związki w większości barwne i w znacznym stopniu nienasycone, o licznych podwójnych wiązaniach sprzężonych zwykle w konfiguracji *trans*, zawierające zwykle układy cykliczne powstałe przez cyklizację na końcach łańcucha poliizopentenolowego. Karotenowce występują zarówno w roślinach wyższych, jak i niższych oraz w bakteriach zdolnych do fotosyntezy, a także w niezdolnych do tego procesu tkankach oraz w niektórych grzybach. W komórkach zwykle związki te są zlokalizowane w chloroplastach bądź w chromoplastach; w procesie fotosyntezy pochłaniają kwanty świetlne lub pełnią funkcje ochronne. Witamina A 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. Częsteczka β (β , β)-karotenu (Rys. 1) rozpada się teoretycznie na dwie cząsteczki retinolu, praktyczna wydajność tej reakcji w przybliżeniu równa się połowie wydajności teoretycznej.



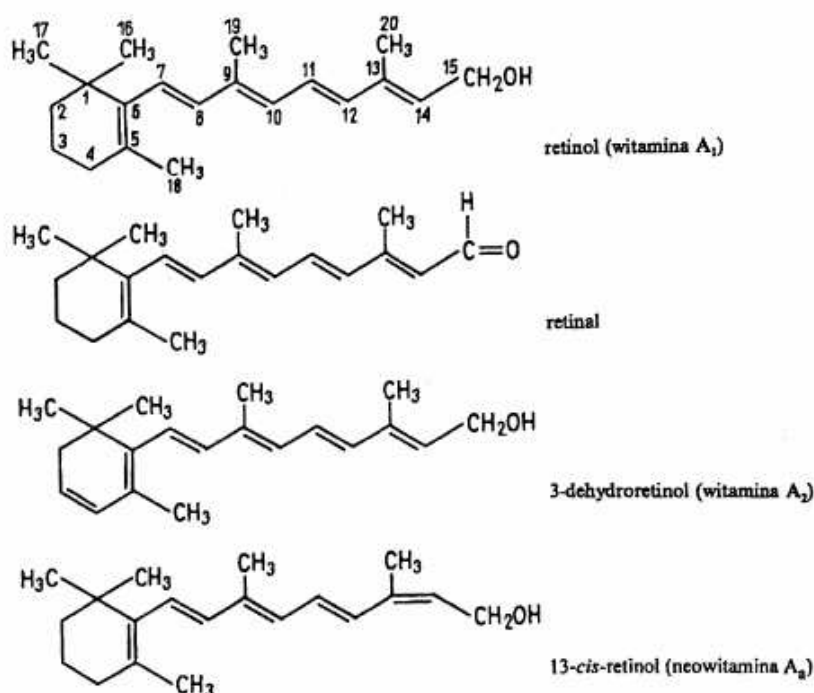
Rys. 1. Struktura β -karotenu

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) – Rys. 2.

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: retinol (A1) > retinal > 13-*cis*-retinol > 3-dehydroretinol (A2) > 9,13-*cis*-retinol. 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:

1 µg równoważnika retinolu = 1 µg czystej formy retinolu (pochodzenia zwierzęcego)
= 6 µg β-karotenu (pochodzenia roślinnego)
= 12 µg innych karotenoidów (pochodzenia roślinnego)



Rys. 2. Struktury witamin z grupy A

Witaminę A wyraża się również w tabelach żywieniowych w Jednostkach Międzynarodowych [IU]. Witamina A występuje wyłącznie w produktach pochodzenia zwierzęcego. Najbogatszym jej źródłem są trany rybne oraz wątróbki zwierzęce. Dobrym źródłem fizjologicznie czynnych karotenów są również owoce oraz warzywa (Tabela 2).

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 ślepota. 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 śledziony, nudności, bóle głowy, krwawienie z dziąseł, zażółcenie skóry), organizm człowieka toleruje dawki około 100-krotnie większe od dziennego zapotrzebowania. Dienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę A wyrażone w μg retinolu wynosi 1000.

Tabela 2. Źródła karotenów w żywności

Zawartość w 100 [g] lub [ml] produktu	[μg]
Marchew	1650
Natka pietruszki	990
Szpinak	707
Dynia	472
Mango	300
Morele	231
Koperek	209
Salata	144
Pomidor	123

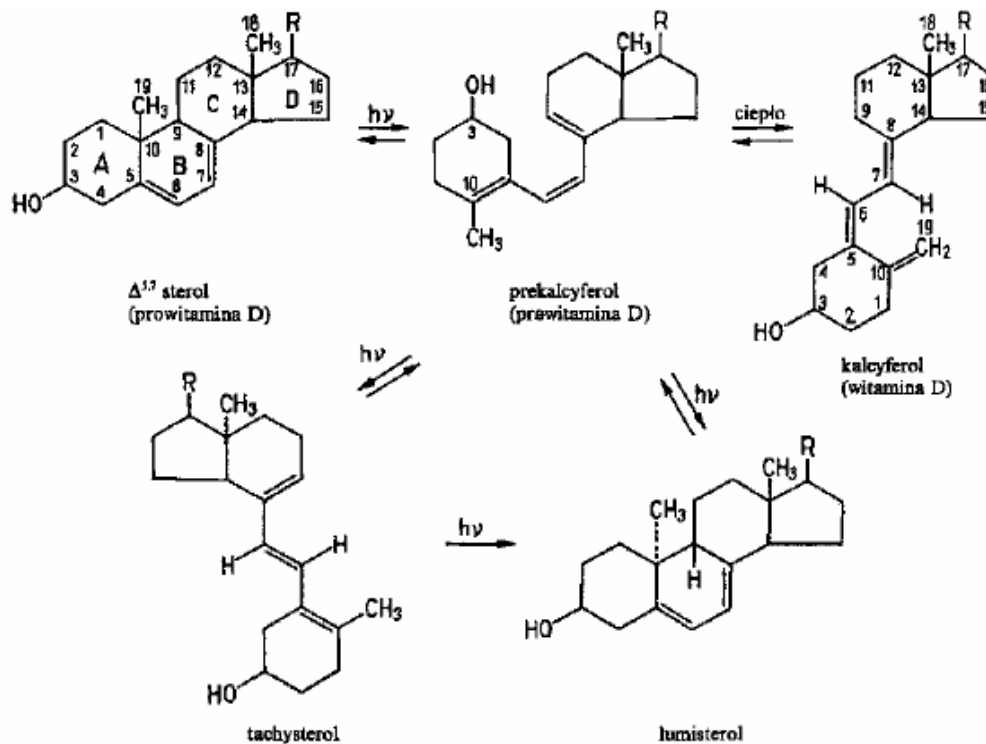
1.2.2. Witamina D

Odkrycie witaminy D wiąże się ściśle z chorobą zwaną krzywicą. W XVIII wieku tran został dość powszechnie uznany jako lek przeciw krzywicy. Pierwsi stosowali go rybacy mieszkający w pasie nadmorskim. Powiązanie roli światła i żywienia w etiologii krzywicy nastąpiło dopiero w 1924. W 1931 w wyniku naświetlania ergosterolu wyodrębniono czystą krystaliczną witaminę D₂. W sześć lat później otrzymano witaminę D₃ przez naświetlanie 7-dehydrosterolu. Następnie wyjaśniono, że zjawisko powstawania naturalnej witaminy w skórze człowieka pod wpływem promieniowania słonecznego. Związki z grupy witamin D należą do steroidów i są pochodnymi tych steroli, które w pierścieniu B (Rys. 3) mają układ dwóch sprzężonych wiązań podwójnych.

Witaminy D powstają z odpowiednich prowitamin w wyniku przemiany fotochemicznej i termicznej, podczas której następuje min. otwarcie pierścienia B między C-9 i C-10 (Rys.3). 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 (kalcyferol, Rys. 3), D₂ (ergokalcyferol) – Rys. 4a oraz D₃ (cholekalcyferol) – Rys. 4b.

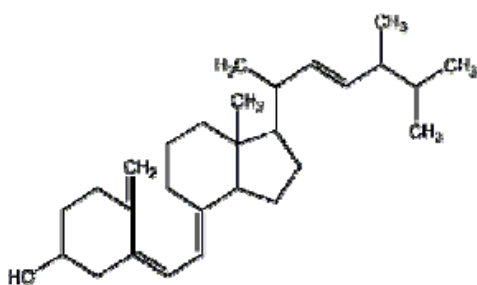
Witamina D jest odporna na działanie podwyższonej temperatury i nie zmienia się w czasie długotrwałego przechowywania. Jest również trwała w środowisku zasadowym, natomiast jest wrażliwa na działanie kwasów. Pod wpływem silnego promieniowania UV

ulega zniszczeniu. Roztwory tłuszczu stabilizują witaminę D, w środowisku beztłuszczowym w obecności tlenu łatwo ulega autooksydacji.

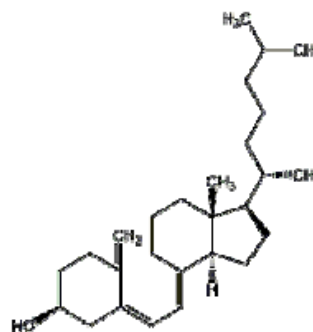


Rys. 3. Struktury prowitamin i witamin z grupy D

(a)



(b)



Rys. 4. Struktury witamin D: (a) ergokalcyferol, (b) cholekalcyferol

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

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, zrzyszotnienie, 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 obowiązujących w naszym kraju dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka wynosi 5-20 µg, czyli 200-800 j.m.). 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).

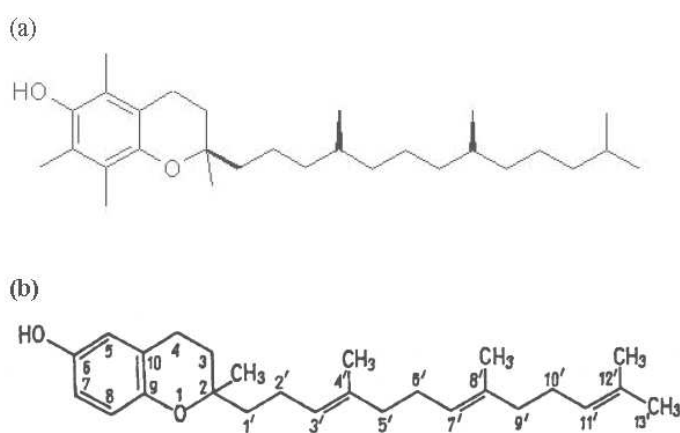
Tabela 3. Źródła witaminy D w żywności

Zawartość w 100 [g] lub [ml] produktu	[µg]
Tran (2 łyżeczki)	242
Śledź	25
Makrela	24
Łosoś	12
Tuńczyk	6
Mleko (1 filiżanka)	3
Mąka pełnoziarnista	3
Jajko (1 żółtko)	1

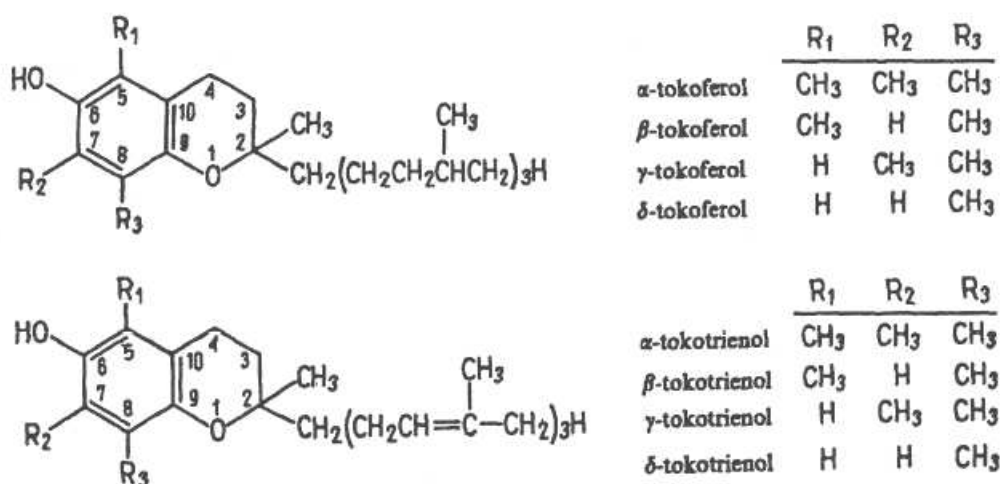
1.2.3. Witamina E

W 1922 roku Evans i Bishop dowiedli istnienia czynnika pokarmowego zapobiegającego bezpłodności u szczurów. Najpierw nazwano go witaminą E, a potem dla podkreślenia sposobu działania na organizm tokoferolem (*tokos* - rodzenie, *phero*, ol - alkoholowy charakter związku). W 1927 uzyskano z kielków pszenicy stężone koncentraty

witaminy E, a 10 lat później wyodrębniono czysty α -tokoferol. Witaminy należące do grupy E są zbudowane z aromatycznego układu hydroksyfenylowego z łańcuchem tetraizopentenyłowym, a ich zróżnicowanie polega na różnej liczbie i położeniu grup CH_3 . Występują one powszechnie w mitochondriach i chloroplastach roślin, a w szczególnie dużych ilościach – w kiełkach pszenicy (*Triticum*), sałacie siewnej (*Lactuca sativa*), nasionach soi (*Glycine max*). 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 (Rys. 5a i b). Obecnie wyizolowano z materiału roślinnego 8 związków należących do dwóch grup witamin E, nazywanych odpowiednio tokoferolami i tokotrienolami (Rys. 6).



Rys. 5. Struktury związków chemicznych: (a) - tokolu, (b) – tokotrienolu



Rys. 6. 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. Zarówno tokoferole, jak i tokotrienole są typowymi układami oksydacyjno-redukcyjnymi, gdyż mogą łatwo przekształcić się w tokochinony. Na tym przypuszczalnie polega ich rola biologiczna, gdyż we wspomnianych organellach stanowią czynnik ochronny przed zbyt wysokim potencjałem oksydacyjno-redukcyjnym. Związki te biorą również udział w strukturze i w regulacji przepuszczalności błon cytoplazmatycznych.

Biosynteza tokoferoli i tokotrienoli nie jest jeszcze szczegółowo wyjaśniona. Łańcuch boczny i fragment pierścienia heterocyklicznego powstają drogą wspólną dla terpenów, natomiast pierścień aromatyczny tworzy się w drodze kwasu szikimowego, a jego metylacja odbywa się już po przyłączeniu łańcucha terpenowego

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.

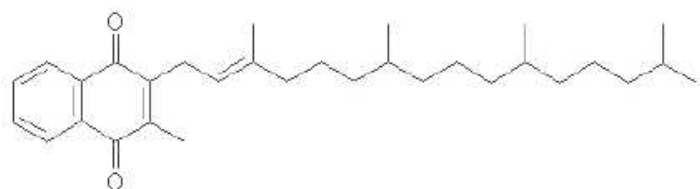
1 mg równoważnika α -tokoferolu = 1 mg czystej formy α -tokoferolu
= 2 mg β -tokoferolu
= 4 mg γ -tokoferolu
= 5 mg α -tokotrienolu

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 wymienić należy: sałatę, szpinak, kapustę, masło, jaja.

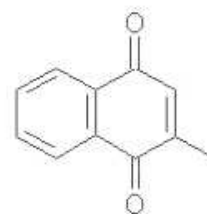
1.2.4. Witamina K

W 1929 roku Dam zauważył podskórne i śródskórne wybroczyny krwawe u kurcząt na sztucznej diecie. W pięć lat później badacz uznał, że choroba ta jest na skutkiem niedoboru czynnika, nazwanego witaminą K, potrzebnego do utrzymania normalnego poziomu protrombiny. W 1939 wyodrębniono czystą witaminę K z liści lucerny (witamina K1). Następnie wykazano, że pewne drobnoustroje mogą syntetyzować czynnik przeciwkrwotoczny (witamina K2).

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) – Rys 7.



Filochinon (K1)



Menadion (K3)

Rys. 7. Struktury witamin K

Filochinony występują powszechnie w organizmach żywych, jednakże ich biosynteza jest ograniczona do organizmów zdolnych do fotosyntezy i określonych bakterii, np. określone szczepy występujące w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt (z tego powodu stosunkowo rzadko obserwuje się brak witaminy K). W roślinach głównym miejscem ich powstawania i lokalizacji jest chloroplast i chromoplast, dlatego uważa się że synteza tych substancji jest indukowana przez światło. Łańcuch boczny witamin z grupy K pochodzi od kwasu mewalonowego, a układ naftochinonu tworzy się w drodze kwasu szikimowego.

Wykazano też, że grupa metylowa jest przyłączona wtórnie do już gotowego układu aromatycznego i pochodzi z grupy CH₃ metioniny. Menadion, tj. układ 2-metylo-1,4-naftochinonu bez łańcucha terpenowego, również jest spotykany w organizmach żywych i wykazuje aktywność biologiczną. Dowodzi to, że łańcuch terpenowy jest przyłączany ostatni i że nie jest niezbędny dla pełnienia przez te związki funkcji witaminy, a jedynie nadaje im właściwości bardziej liofilowe.

Witaminy grupy K, jako dichinony, pozostają w równowadze z formami di-fenyłowymi, stanowiąc efektywne układy oksydacyjno-redukcyjne. Udowodniono, że pełnią one w chloroplastach funkcję przenośników elektronów w fosforylacji fotosyntetycznej. Natomiast ich rola w łańcuchu oddechowym oraz fosforylacji oksydacyjnej wydaje się ograniczona do pewnych bakterii, u których związki te mogą zastępować koenzym Q.

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. *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.

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.

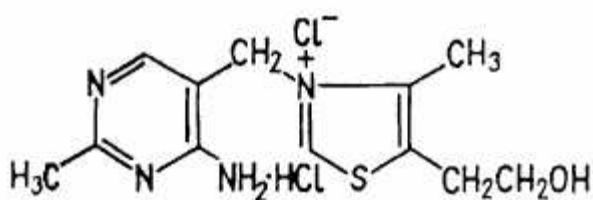
1.3. Witaminy rozpuszczalne w wodzie

1.3.1. Tiamina (witamina B1)

Pierwsze obserwacje dotyczące choroby z braku witaminy B1 poczyniono w krajach Dalekiego Wschodu. Choroba ta nosi nazwę beri-beri i cechuje się zaburzeniami sercowo -

naczyniowymi, zwyrodnieniem nerwów i obrzękami. Rozwój tej choroby występował szczególnie w populacjach, w których żywiono się głównie polerowanym ryżem, u ludzi w więzieniach, u marynarzy i bardzo często u niedożywionych kobiet w ciąży i niemowląt. Wykrycie przyczyny tej choroby, zrjonalizowanie żywienia i produkcja syntetycznej tiaminy przyczyniły się do zlikwidowania epidemii beri-beri w krajach Dalekiego Wschodu. Jednak utajone niedobory tiaminy mogą występować do dziś, nawet w krajach wysoko rozwiniętych, w tych wypadkach, gdy ludzie żywią się jednostronnie, nie spożywają ciemnego pieczywa, a jedzą zbyt dużo cukru i słodczy. Do niedoboru witaminy B1 dochodzi także w stanach chorobowych spowodowanych wadliwym jej wchłanianiem oraz u alkoholików. Witamina B1 została wyekstrahowana z otrąb ryżu w 1927 przez Jansena i Doutha.

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) – Rys. 8.



chlorowodorek chlorku tiaminy

Rys. 8. Struktura chlorku amoniowego 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 spożywanym i spalanych w organizmie. Najważniejszym źródłem witaminy B1 są przetwory zbożowe (ok. 40 %), a następnie produkty mięsne (Tabela 5).

Tabela 5. Źródła witaminy B1

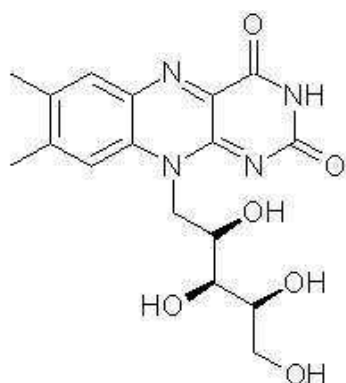
Zawartość w 100 [g] lub [ml] produktu	[mg]
Drożdże	4,1
Pestki słonecznika	1,95
Kiełki pszenicy	1,76
Groch - suche nasiona	0,77
Szynka wieprzowa	0,68
Kasza gryczana	0,58
Mąka pełnoziarnista	0,54
Wątroba	0,26
Chleb graham	0,23

1.3.2. Ryboflawina (witamina B2)

W roku 1932 Warburg i Christian opisali "żółty enzym" znajdujący się w drożdżach. Przypisywali mu doniosłą rolę w procesach utleniania i redukcji. W rok później wykazano, że witamina B2 i żółto zielony fluoryzujący barwnik, rozpowszechniony w tkankach roślinnych i zwierzęcych są identyczne. Ryboflawina – 7,8-dimetylo-10-(1'-D-rybitylo)-izoaloksazyna (Rys. 9), 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.



Rys. 9. Struktura ryboflawiny

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 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 pęknięcie 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.

1.3.3. Kwas nikotynowy i jego amid (witamina PP, B3)

Pelagra była uznana za jednostkę chorobową najpierw w Hiszpanii, Portugalii i Włoszech, a potem w kolejnych krajach europejskich. Ustalenie zależności występowania tej choroby od niedoboru witaminy PP w diecie wymagało jeszcze żmudnych badań, które dały dopiero rezultat w poprzednim stuleciu. W okresie międzywojennym pelagra była schorzeniem rozpowszechnionym zarówno w Europie, jak i Ameryce Południowej. Objawiała się zmianami skórnymi (na języku, szyi, twarzy, rękach), a także zaburzeniami układu trawienia oraz zaburzeniami nerwowymi i psychicznymi. 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 (Rys 10).



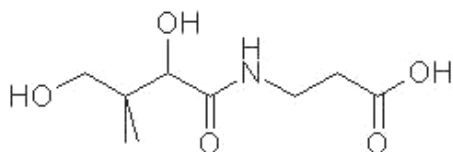
Rys. 10. Struktury witamin PP: (a) - amid kwasu nikotynowego, (b) kwas nikotynowy.

Zarówno kwas nikotynowy, jak i jego amid są równocenne 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. Dienne zapotrzebowanie człowieka na witaminę PP wynosi 10-25 mg. Do bogatych źródeł tej witaminy należą wątroba, mięso, ryby, ziarna zbóż oraz drożdże.

1.3.4. Kwas pantotenowy (witamina B5)

Pierwsze informacje na temat hipotetycznej substancji pobudzającej wzrost drożdży, którą nazwano Bios II datują się na rok 1901. W 1933 Wiliams wykazał, że czynnik ten jest szeroko rozpowszechniony i nazwał go kwasem pantotenowym (z greckiego "wszechobecny"). W tym czasie Ringrose i współpracownicy prowadząc doświadczenia na kurczętach wywołali u nich zapalenie skóry podobne do pelagry (pelagra kurcząt) i stwierdzili (w 1930), że zmiany te łatwo ustępują po podaniu drożdży i wyciągu z wątroby. Substancje tak działające nazwali czynnikiem przesączalnym II. Wreszcie Jukes i współpracownicy w 1939 stwierdzili, że oba oznaczane czynniki tj. kwas pantotenowy i czynnik przesączalny II są

identyczne. W tym czasie Williams wyodrębnił kwas pantotenowy, a Major określił jego skład i budowę. W 1940 w kilku laboratoriach Ameryki i Europy otrzymano kwas pantotenowy na drodze syntetycznej. Kwas pantotenowy zbudowany jest z reszt kwasu 2,4-dihydroksy-3,3-dimetylo-masłowego i β -alaniny, połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym (Rys. 11).



Rys. 11. Struktura kwasu pantotenowego

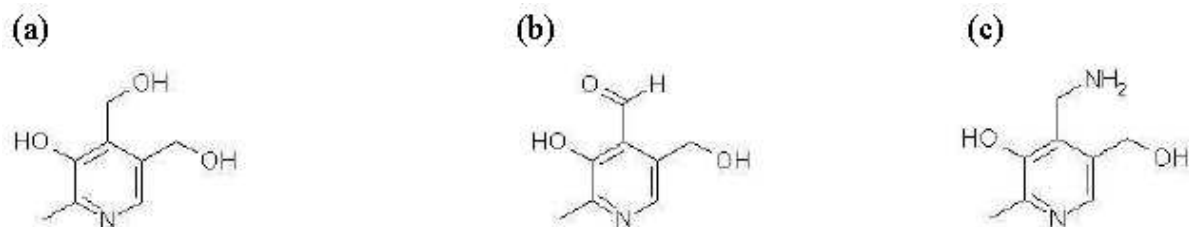
Kwas pantotenowy jest zaliczany do kompleksu witamin B. W układach biologicznych jest składnikiem koenzymu A, a także kompleksu wieloenzymowego katalizującego syntezę kwasów tłuszczowych. Jest to związek dość trwały, przy czym pochodne fosforanowe, odznaczają się większą trwałością, zwłaszcza w środowisku 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.

1.3.5. Pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina (witamina B6)

W 1930 Chick i Copping opisali nową witaminę, którą nazwali czynnikiem I. W 1935 w pięciu różnych laboratoriach wyizolowano witaminę B6 z otrąb ryżu. Nazwa witamina B6 jest używana jako określenie wszystkich pochodnych 3-hydroksy-2-metylopirydyny. Strukturę tych trzech form (Rys. 12) stanowi pierścieńpirydyny 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.

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.

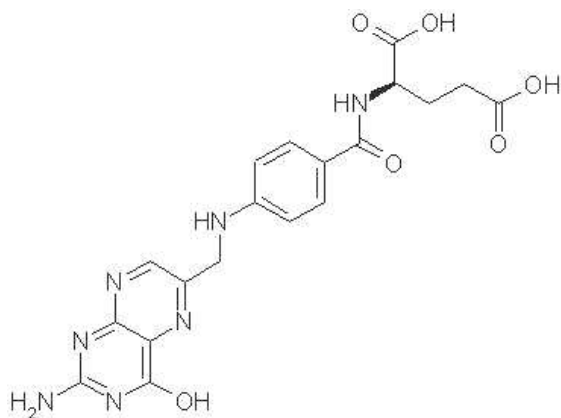


Rys. 12. Struktury witamin B6 (a) – pirydoksyna, (b) – pirydoksal, (c) pirydoksamina

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 porfiryn (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. Dienne 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.

1.3.6. Kwas foliowy

W 1941 Mitchell, Shunell i Williams otrzymali ze szpinaku związek, który nazwali kwasem foliowym (łac. folium - liść). Kwas foliowy należy do grupy witamin B. Jest on też zwany *kwasem pteroiloglutaminowym*, ponieważ zawiera „fragmenty” pochodnej pterydyny (2-amino-4-hydrokso-6-metylopterydnę), kwasu *p*-aminobenzoesowy i kwasu glutaminowy (Rys 13).



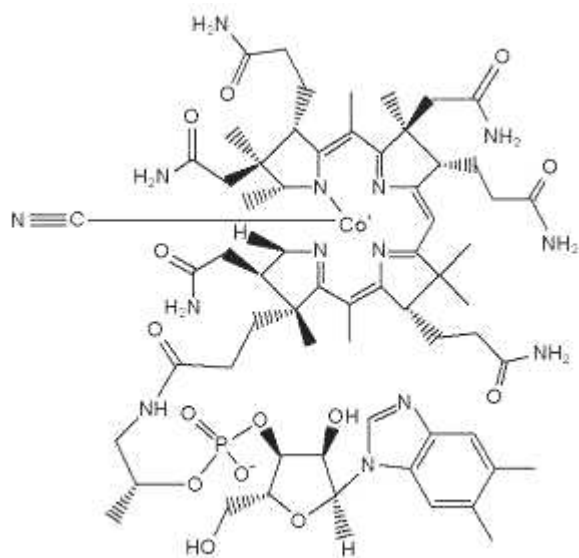
Rys. 13. Struktura kwasu foliowego

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*-aminobenzoilglutaminowej. 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. Dienne 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.

1.3.7. Cyjanokobalamina (witamina B12)

W 1926 Whipple i współpracownicy ogłosili , że podawanie wątroby wykrwawionym

psom przyspiesza ich powrót do zdrowia. Minot i Murphy podjęli dalsze badania kliniczne dowodząc, że wątroba jest skutecznym środkiem leczniczym w leczeniu niedokrwistości złośliwej. W 1948 Rickes ze współpracownikami po 6 latach żmudnych badań, wyizolowali z wątroby czysty, krystaliczny związek o czerwonym zabarwieniu, który w dawkach kilku mikrogramów zapobiegał wystąpieniu niedokrwistości. Związek zawierał fosfor i kobalt - nazwano go początkowo witaminą B12, a potem kobaminą, kobalaminą itd. 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 (Rys.14). 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.



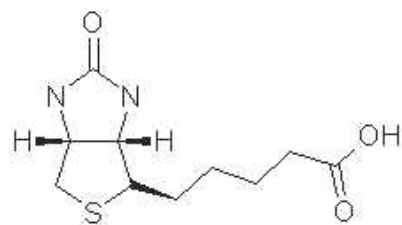
Rys. 14. Struktura cyjanokobalaminy

Inny związek z grupy B zawiera zamiast grupy cyjanowej – grupę hydroksylową – witamina B12b. 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 Npolegają 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.

1.3.8. Biotyna (witamina H)

W 1927 Boas i współpracownicy wywołali zmiany na skórze u szczurów, następnie podawali różne produkty spożywcze określając skuteczność leczenia choroby skóry. Nieznany jeszcze czynnik, skuteczny w leczeniu zmian skórnych, György nazwał witaminą H od niemieckiego słowa haut - skóra. W 1935 Kögl doniósł o wyizolowaniu z żółtka jaja krystalicznego związku, który pobudzał wzrost drożdży. Czynnik ten nazwano biotyną. Biotyna składa się z dwóch skondensowanych układów pierścieniowych – imidazolowego i tetrahydropyridynowego, podstawionego w pozycji 2 resztą kwasu *n*-walerianowego (Rys. 15).

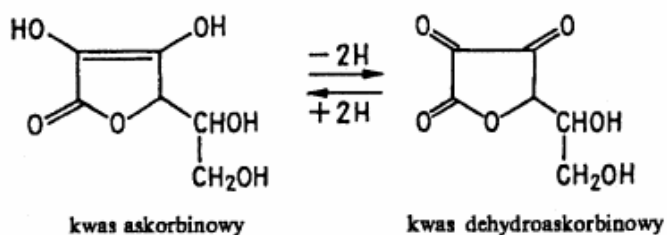


Rys. 15. Struktura biotyny

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 biocytną. 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 min. zmianami w skórze, bólami mięśniowymi, osłabieniem, apatią, stanami lękowymi i halucynacjami. Przepuszczalne dzienne zapotrzebowanie człowieka na biotynę wynosi około 100 µg.

1.3.9. Kwas L-askorbinowy (witamina C)

Przed poznaniem budowy chemicznej witamina 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). Właściwości witaminy wykazuje C kwasu L-askorbinowy oraz jego forma utleniona - kwas L-dehydroaskorbinowy. Pod względem chemicznym kwas L-askorbinowy jest laktonem endiolu kwasu 2-okso-L-gulonowego, a kwas L-dehydroaskorbinowy laktonem kwasu 2,3-diokso-L-gulonowego (Rys. 16).



Rys. 16. Struktury chemiczne: kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego

Kwas L-askorbinowy jest związkem 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, o około dwa rzędy wielkości większe niż na inne witaminy, wynosi średnio 50 - 100 mg. Niedobór kwasu askorbinowego, objawiający się: wolniejszym gojeniem się ran, błądzącą skórą 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, 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.

2. Metody oznaczania wybranych witamin

Ilościowe oznaczanie witamin 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 trifluorooctowego) i acetonitrylu, lub wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluorooctowego) i metanolu. 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 trifluorooctowego o pH = 2,6 (faza B). Rozdział prowadzono z zastosowaniem elucji gradientowej.

Oznaczanie zawartości witamin rozpuszczalnych w tłuszczach przeprowadza się z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją spektrofotometryczną lub najlepiej fluorymetryczną. Przykładowe warunki chromatograficzne rozdzielania mieszanin witamin rozpuszczalnych w tłuszczach przedstawiono w Tabeli 6 i 7.

Tabela 6. Przykłady systemów NP-HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Kolumna	Wymiary, mm	Faza ruchoma (V+V)	Detektor, λ
Polygosil® 60,5 μ m	250 \times 8	izooktan + izobutanol (99+1)	265 nm
LiChrospher® Si 60,5 μ m	250 \times 4	<i>n</i> -heksan + 2-propanol (99+1)	265 nm
LiChrospher® Si 100,5 μ m	250 \times 8	<i>n</i> -heksan + 2-propanol (98+2)	265 nm
μ Porasil® krzemionka	300 \times 3,9	<i>n</i> -heksan + THF + 2-propanol (98+1+1)	265 nm
Partisil® PAC, 5 μ m	250 \times 4,6	<i>n</i> -heksan + alkohol izoamylowy (99+1)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 \times 4	<i>n</i> -heksan + 2-propanol + THF (99+1+1)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 \times 4	<i>n</i> -heksan + 2-propanol (95+5)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 \times 4	<i>n</i> -heptan + 2-propanol (97+3)	265 nm

Tabela 7. Przykłady systemów RP-HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Kolumna	Wymiary, mm	Faza ruchoma (V+V)	Detektor, λ
Hypersil® ODS, 5 μ m	250 \times 4,6	Metanol	265 nm
LiChrospher® 100 RP 18, 5 μ m	250 \times 4	Metanol + H ₂ O (95+5)	264 nm
Vydac® 201TP54	250 \times 4,6	Metanol + H ₂ O (93+7)	265 nm
Vydac® 201TP54	250 \times 4,6	Acetonitryl + metanol (80+20)	265 nm
Spherisorb® ODS 2,5 μ m	250 \times 4,6	Acetonitryl + dichlorometan + metanol (93+4+3)	z matrycą diodową
Nucleosil® C ₁₈ , 5 μ m	250 \times 4	Acetonitryl + metanol (70+30)	265 nm
Zorbax® ODS	250 \times 4,6	Acetonitryl + metanol (95+5)	265 nm

W większości przypadków konieczne jest zmydlenie badanego materiału, a następnie wyodrębnienie badanej witaminy za pomocą odpowiedniej ekstrakcji (Tabela 8).

Witamina A zawiera w cząsteczce dużą liczbę sprzężonych wiązań nienasyconych, których maksimum absorpcji przypada w obszarze 328. Oznaczanie zawartości karotenoidów w produktach naturalnych przeprowadza się najczęściej metodami spektrofotometrycznymi. Identyfikacja oparta jest na pomiarze absorbancji w zakresie światła widzialnego. Poszczególne karotenoidy wykazują charakterystyczne krzywe absorpcji. W tabeli 9 podano maksima absorpcji α -, β -, γ -karotenów.

Tabela 8. Przykłady odpowiednich warunków ekstrakcji i zmydlenia stosowanych przy oznaczaniu witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Zmydlenie	Ekstrakcja
16 g tłuszczu + 150 ml etanolu + 1 g pirogalolu + [75 ml wody + 30 g KOH] + przemywanie azotem; 70 °C przez 30 min.	PE + DEE (9+1) 2 × 100 ml; przemywanie wodą 5 × 100 ml
8 g tłuszczu + 100 ml etanolu + 1 g askorbinianu sodu + 0,04 g siarczku sodu + 12 g KOH + 50 ml wody + przemywanie azotem; 80 °C przez 30 min.	n-heksan, 3 × 100 ml i 3 × 50 ml; przemywanie wodą 4 × 100 ml
8 g tłuszczu + 35 ml etanolu + 2 g askorbinianu sodu + 10 g KOH + 50 ml wody; 100 °C przez 45 min.	n-heksan, 1 × 100 ml; przemywanie 5 % KOH, 1 × 100 ml; przemywanie 30 % etanolem w 9 % chlorku sodu 1 × 100 ml; przemywanie 0,9 % chlorkiem sodu; 1 × 100 ml
12 g tłuszczu + 30 ml etanolu + 30 ml metanolu + 0,1 g kwasu askorbinowego + 30 ml 50 % KOH + przemywanie azotem; 100 °C przez 30 min.	DEE, 2 × 100 ml; przemywanie wodą, 4 × 50 ml
6 g do 8 g tłuszczu + 100 ml etanolu + 1 g kwasu askorbinowego + 50 ml 50 % KOH + przemywanie azotem; 20 °C przez 20 h	PE + DEE (1+1), 2 × 200 ml; przemywanie wodą, 6 × 50 ml
8 g tłuszczu (etanol + woda 9+1) + 1 g pirogalolu + 150 ml 28 % KOH + przemywanie azotem; 100 °C przez 30 min. pod chłodnicą zwrotną	DEE + PE (1+1), 2 × 500 ml; przemywanie wodą, 5 × 150 ml
24 g tłuszczu + 90 ml etanolu + 0,5 g askorbinianu sodu + 30 ml 60 % KOH + przepłukiwanie azotem; 100 °C przez 45 min. pod chłodnicą zwrotną	DEE, 1 × 150 ml, 3 × 75 ml; przemywanie, 5 × 200 ml
10 g tłuszczu + 150 ml etanolu + 0,5 pirogalolu + 50 ml 60 % KOH; 97 °C przez 30 min. pod chłodnicą zwrotną	DEE + PE (1+1), 3 × 100 ml; przemywanie wodą (x × 100 ml) do neutralnego pH
KOH = wodorotlenek potasu PE = eter naftowy DEE = eter dietylowy	

Tabela 9. Maksyma absorpcji α -, β -, γ -karotenów

Karotenoid	Maksyma absorpcji w eterze naftowym [nm]		
α -karoten	422	444	473
β -karoten	(425)	451	482
γ -karoten	437	462	494

Do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach wykorzystuje się również metodę kolorymetryczną opartą na reakcji barwnej z chlorkiem antymonu(III), (witamina A - barwa niebieska, pomiar przy długości fali 620 nm, witamina D – barwa pomarańczowa, pomiar przy długości fali 500 nm). Oznaczenie tokoferoli wykonuje się w oparciu o metodę Emmeric-Engela. W odpowiednich warunkach tokoferole redukują jony Fe^{3+} do Fe^{2+} , które następnie tworzą barwne połączenie z α, α' -dipirydylem. Nie wszystkie tokoferole reagują w sposób identyczny. Ogólną zawartość tokoferolu wyraża się w przeliczeniu na α -tokoferol. Przed właściwym oznaczaniem należy wyeliminować z próbki nadtlenki, karotenoidy i inne

składniki redukujące. Analiza może być wykonana bezpośrednio lub po wyodrębnieniu substancji niezmydlających. Poszczególne rodzaje tokoferoli oznacza się metodą chromatografii cienkowarstwowej, cieczowej lub gazowej (w postaci pochodnych trimetylosililowych).

Literatura

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