

# OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WITAMINY C W MATERIALE ROŚLINNYM METODĄ MIARECZKOWĄ

## Cel ćwiczenia

Ćwiczenie poświęcone jest praktycznemu zapoznaniu się z metodyką oznaczania zawartości kwasu askorbinowego w wybranych produktach spożywczych (sok z kapusty, papryki, kiwi, cytryny, grejpfruta).

## WPROWADZENIE

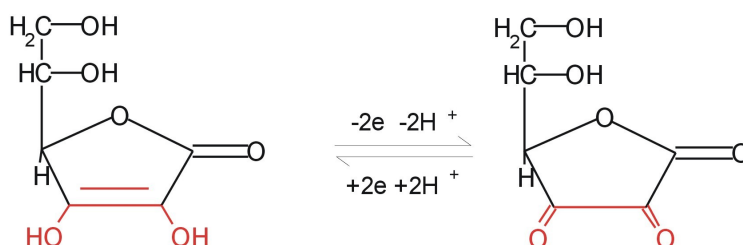
### Budowa i funkcje kwasu askorbinowego

Witaminy to związki organiczne, które nie będąc związkami dostarczającymi energię ani składnikami budulcowymi komórek są konieczne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Nazwę „witamina” zaproponował polski biochemik Kazimierz Funk, który odkrywając związki o właściwościach amin organicznych, nazwał je aminami warunkującymi życie (łac. *vita*- życie).

Witaminę C zaliczamy do witamin egzogennych dla człowieka, rozpuszczalnych w wodzie.

Kwas askorbinowy w standardowych warunkach jest białym krystalicznym ciałem stałym o wzorze chemicznym  $C_6H_8O_6$  i masie cząsteczkowej 176g. Pod względem budowy jest to ketolakton strukturalnie podobny do węglowodanów.

Witamina C występuje w dwóch formach, przy czym właściwości witaminy zachowują obie formy: forma zredukowana- kwas askorbinowy i forma utleniona- kwas dehydroaskorbinowy. Kwas askorbinowy ma właściwości silnie redukujące, ponieważ ugrupowanie pomiędzy C-2 i C-3, zwane endiolowym, łatwo oddaje dwa protony i dwa elektrony, przechodząc w ugrupowanie diketonowe kwasu dehydroaskorbinowego (rys.1).



Rys 1. Zredukowana i utleniona forma witaminy C.

Przemiana kwasu askorbinowego w kwas dehydroaskorbinowy jest odwracalna. Obie substancje są wysoce niestabilne i łatwo ulegają dalszym przemianom nieodwracalnym, prowadzącym

do utraty ich aktywności biologicznej jako witaminy C. Czynnikiem sprzyjającymi procesowi rozkładu witaminy C są:

- podwyższona temperatura,
- obecność tlenu,
- środowisko obojętne lub zasadowe,
- obecność enzymów utleniających,
- obecność jonów metali, takich jak żelazo, miedź i srebro.

Możliwość syntezy tej witaminy posiadają liczne rośliny i zwierzęta. Do organizmów niezdolnych do syntezy tej witaminy oprócz człowieka i małp należy także świnka morska, nietoperz indyjski, ryby i ptaki. Brak możliwości biosyntezy witaminy spowodowany jest mutacją w genie kodującym końcowy enzym szlaku biosyntezy kwasu askorbinowego- oksydazę L-glukonolaktonową. U roślin każda komórka organizmu jest potencjalnie zdolna do syntezy kwasu askorbinowego, podczas gdy u zwierząt synteza ma miejsce w wątrobie i nerkach. Wchłanianie witaminy C u człowieka odbywa się w dwunastnicy i jelicie cienkim, a gromadzona jest ona w tkankach o wzmożonym metabolizmie, jak wątroba, trzustka czy mózg. Nadmiar witaminy C wydalany jest z potem i moczem, a znaczne ubytki kwasu askorbinowego w organizmie powodowane są przez stres, nikotynę czy promieniowanie UV.

W organizmie człowieka witamina C pełni szereg funkcji, m.in. jest zaangażowana w:

- I. hydroksylację proliny i lizyny w procesach syntezy kolagenu
- II. syntezę adrenaliny
- III. syntezę karnityny pełniącej rolę w transporcie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do mitochondrium, gdzie ulegają  $\beta$ -oksydacji
- IV. rozkład tyrozyny
- V. wchłanianie żelaza
- VI. działanie antyoksydacyjne (zapobiega tworzeniu się nitrozoamin – związków rakotwórczych)

Witamina C może być gromadzona w organizmie ludzkim i jej zapas może wystarczyć na kilka miesięcy. Duże jej ilości są w owocach (kapusta, czarna porzeczka, truskawka, cytryna)

### **Źródła występowania i znaczenie kwasu askorbinowego**

Średnie dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę C wynosi około 60-200mg.

Skutkiem długotrwałych niedoborów witaminy C jest choroba zwana szkorbutem. Objawami tego schorzenia są ropne stany zapalne dziąseł, wypadanie zębów, wysypka i pogłębiające się owrzodzenia ciała.

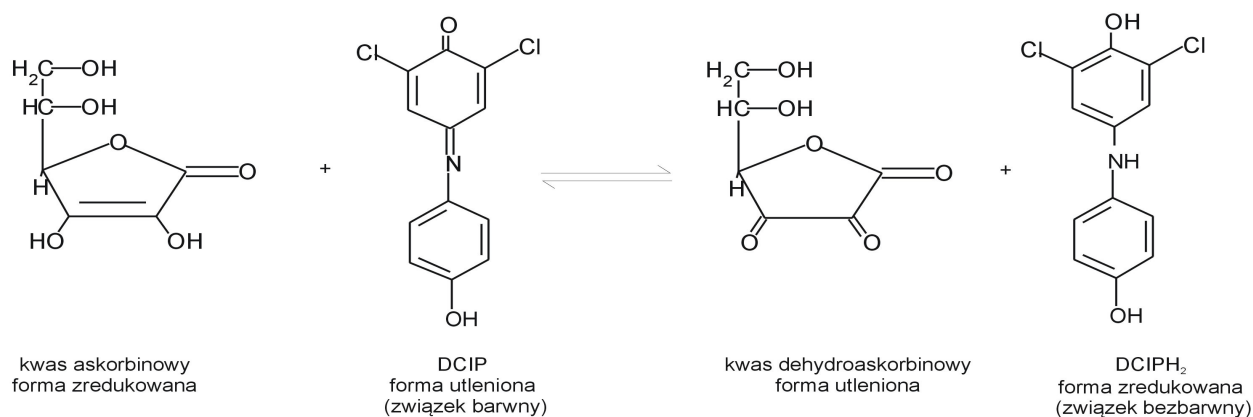
Tabela 1. Zawartość witaminy C w kilku pospolitych owocach i warzywach (w mg/100g s.m):

owoce		warzywa	
aronia	350-550	papryka świeża	180-280
czarna porzeczka	390-500	pietruszka natka	270-410
truskawka	60-112	chrzan	100-240
cytryna, pomarańcza	ok. 40	kapusta kiszona	9-19
winogrona	18-37	ziemniak	16-27

Kwas askorbinowy dodawany jest do żywności jako przeciwutleniacz i posiada symbol E 300. Stanowi składnik wzbogacający i odżywczy. Hamuje procesy brunatnienia krojonych owoców i soków. Polepsza jakość mąki, utrzymuje naturalną barwę mięsa. Stosowany jest głównie do soków skoncentrowanych, napojów bezalkoholowych, masła, przetworów mięsnych i wyrobów cukierniczych.

### Oznaczanie zawartości kwasu askorbinowego

Metoda miareczkowa (PN-A-04019:1998) oznaczania witaminy C polega na jej ekstrakcji kwasem szczawiowym, a następnie utlenieniu kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego w środowisku kwaśnym za pomocą mianowanego, niebieskiego barwnika 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCIP). Reakcja przebiega w sposób ilościowy, w stosunku 1:1 wynikającym z reakcji podanej na rysunku 2, a zawartość kwasu askorbinowego oblicza się z ilości zużytego mianowanego roztworu barwnika.

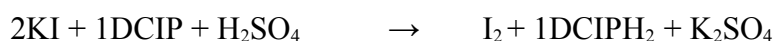


Rys 2. Reakcja redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas askorbinowy.

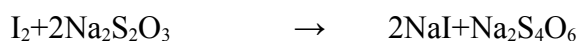
Stosowany podczas oznaczenia niebieski barwnik 2,6-dichlorofenoloindofenol w środowisku kwaśnym w formie utlenionej przyjmuje zabarwienie różowe, natomiast w formie zredukowanej jest bezbarwny. Trwała barwa różowa podczas miareczkowania powstaje po całkowitym utlenieniu zawartego w próbie kwasu askorbinowego.

### Mianowanie roztworu DCIP

Mianowanie roztworu DCIP wykonuje się z użyciem roztworu miareczkującego, którym jest mianowany (posiadający ściśle określone stężenie molowe) tiosiarczan sodowy. DCIP w środowisku kwaśnym przyjmuje barwę różową. Utleniony barwnik reaguje z dodanymi anionami jodkowymi (KI), w efekcie powstaje równoważna ilość jodu (I<sub>2</sub>).



Jod cząsteczkowy tworzy z zastosowanym wskaźnikiem (skrobią) związek addycyjny o barwie niebieskiej, która zanika w miarę odmiareczkowania wydzielonego jodu tiosiarczanem sodowym.



### **ODCZYNNIKI**

1. 2% kwas szczawiowy C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O
2. 2,6-dichlorofenoloindofenol - DCIP
3. Krystaliczny jodek potasowy - KI
4. Kwas siarkowy rozcieńczony (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stężony + woda, w stosunku 1:4)
5. 0,005-molowy mianowany roztwór tiosiarczanu sodowego Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
6. 0,25% roztwór skrobi

### **WYKONANIE**

#### **Oznaczenie miana 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCIP) przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu**

Do kolby stożkowej odmierzyć 10ml barwnika DCIP (2), dodać 1ml kwasu siarkowego (4), szczyptę (ok. 100mg) krystalicznego jodku potasowego (3), wymieszać i dodać kilka kropel roztworu skrobi (6), następnie miareczkować roztworem tiosiarczanu (5) do odbarwienia.

Miareczkowanie wykonać kilkakrotnie, aż do uzyskania dwóch równoległych wyników nie różniących się między sobą więcej niż o 0,1ml.

## **Oznaczenie kwasu askorbinowego w soku z wybranych produktów**

Materiał ćwiczeniowy może stanowić sok z kapusty, papryki, kiwi, cytryny lub grejpfruta.

Otrzymany w kolbie miarowej na 50ml sok (zadanie kontrolne) uzupełnić kwasem szczawiowym (1) do kreski, wymieszać. Z tak przygotowanego roztworu pobrać pipetą automatyczną 10ml, przenieść do kolby stożkowej i szybko miareczkować 2,6-dichlorofenoloindofenolem (2), aż do uzyskania jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się w ciągu 30 sekund. Miareczkowanie powtórzyć kilkakrotnie, aż do uzyskania dwóch równoległych wyników nie różniących się między sobą więcej niż o 0,1ml. Po uzyskaniu wyników należy podać prowadzącemu ilość ml DCIP zużytych do zmiareczkowania 10ml soku z zadania. Prowadzący ćwiczenia poda ilość ml zadania zawartego w kolbie miarowej na 50ml (soku obecnego w kolbie miarowej uzupełnianej następnie kwasem szczawiowym).

Następnie należy wycisnąć sok z cytryny, przesączyć przez gazę i pobrać do kolby miarowej na 50 ml odpowiednią ilość soku (równoznaczną z ilością ml soku podaną przez prowadzącego). Kolbę uzupełnić do kreski kwasem szczawiowym, wymieszać. Przenieść pipetą automatyczną 10ml roztworu do kolby stożkowej i szybko miareczkować 2,6-dichlorofenoloindofenolem (2), aż do uzyskania jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się w ciągu 30 sekund.

Podczas ćwiczeń 4-godzinnych studenci oznaczają zawartość witaminy C także w soku z grejpfruta postępując analogicznie jak przy oznaczaniu witaminy C w soku z cytryny.

**Po wykonaniu oznaczenia należy spuścić DCIP z biuret i przepłukać je wodą destylowaną.**

### **Opracowanie wyników**

#### Wyznaczenie miana DCIP

Wyznaczane miano empiryczne roztworu DCIP to taka ilość  $\mu\text{g}$  kwasu askorbinowego, która jest utleniana przez  $1\text{cm}^3$  (1ml) tego roztworu. Aby obliczyć miano barwnika, należy poznać jego stężenia molowe ( $C_B$ ) na podstawie reakcji z tiosiarczanem sodu, w której z 1molem barwnika reagują 2mole tiosiarczanu.

$$2 (V_B \cdot C_B) = V_T \cdot C_T \longrightarrow C_B = \frac{V_T \cdot C_T}{2V_B}$$

$C_B$  – stężenie roztworu barwnika [mol/l]

$V_B$  – objętość barwnika DCIP [ml]

$C_T$  – stężenie roztworu tiosiarczanu sodu (5) [mol/l]

$V_T$  – objętość tiosiarczanu sodu zużytego do miareczkowania roztworu barwnika [ml]

Z równania reakcji pomiędzy kwasem askorbinowym, a 2,6-dichlorofenoloindofenolem wynika (Rys.2), że 1mol kwasu reaguje z 1molem barwnika. Wiedząc, że masa molowa kwasu askorbinowego wynosi 176g można obliczyć miano DCIP:

1mol barwnika utlenia 1 mol kwasu askorbinowego, czyli 176g

0,001M (1mM) roztwór barwnika utlenia 0,001M (1 mM) kwasu askorbinowego, czyli 176mg

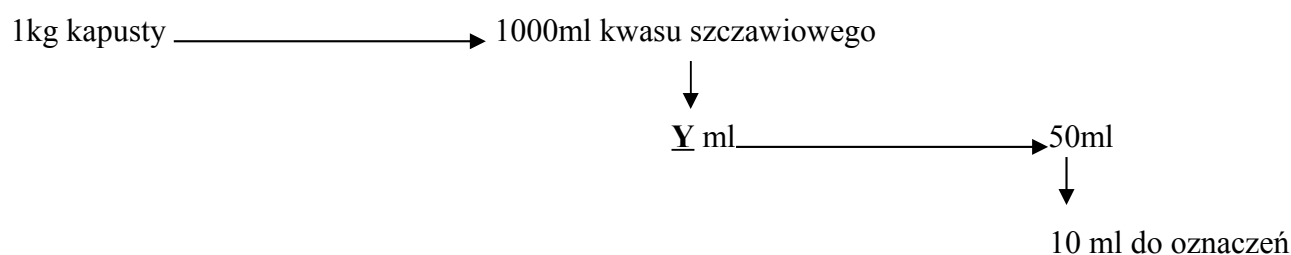
**1ml 0,001M barwnika utlenia 0,001 mM kwasu askorbinowego, czyli 176µg**

**▲ MIANO DCIP**

1ml	0,001M	DCIP	→	176 µg kwasu askorbinowego
1 ml	(wyliczone $C_B$ )	DCIP	→	<b>X</b> µg kwasu askorbinowego

### Obliczenie zawartości kwasu askorbinowego w badanych produktach

Na podstawie ilości zużytego do miareczkowania soku z badanych produktów obliczyć zawartość witaminy C, uwzględniając rozcieńczenia, i wyrazić ją w miligramoprocentach (mg%)



Przykład:

Na zmiareczkowanie kwasu askorbinowego zawartego w 10ml soku z cytryny zużyto 7ml DCIP.

1ml (wyliczone  $C_M$ ) DCIP → **X** µg kwasu askorbinowego

7ml (wyliczone  $C_M$ ) DCIP → **Z** µg = **Z** mg kwasu askorbinowego

$$\begin{array}{l} \text{zawartość} \\ \text{witaminy C} \\ \text{(mg\%)} \end{array} = \frac{\mathbf{Z} \text{ mg} \cdot 50\text{ml} \cdot 100\text{ml}}{\mathbf{Y}\text{ml} \cdot 10\text{ml}}$$

### PYTANIA

1. W jakich formach w przyrodzie może występować witamina C? Napisać wzory tych form oraz podkreślić i nazwać ugrupowanie decydujące o silnie redukujących właściwościach odpowiedniej formy.

2. Dlaczego do przygotowania wyciągów kwasu askorbinowego używa się noży nierdzewnych oraz kwasu szczawiowego?

3. Napisać reakcję zachodzącą podczas miareczkowania kwasu askorbinowego 2,6-dichlorofenoloindofenolem.

4. Dlaczego podczas oznaczania zawartości kwasu askorbinowego w materiale roślinnym metodą miareczkową przy użyciu DCIP należy przerwać miareczkowanie po uzyskaniu jasnoróżowego zabarwienia? Który z tych dwóch związków ulega utlenieniu, a który redukcji podczas miareczkowania. Napisz wzór pierwszego z nich.

5. Zawartość witaminy C w soku z cytryny wynosiła 0,044%. Wyraż to stężenie w mg/ml. Wyjaśnij związek między tą witaminą, a schorzeniem nazywanym szkorbutem.

## LITERATURA

- 1) Borek-Wojciechowska Regina. Znaczenie kwasu L-askorbinowego w terapii. 2007 *Zdr Publ* 117:237-241.
- 2) PN-A-04019:1998. Produkty spożywcze. Oznaczanie zawartości witaminy C. PKN, Warszawa.
- 3) O.O. Oguntibeju. The biochemical, physiological and therapeutic roles of ascorbic acid. 2008 *Afr J Biotechnol* 7:4700–4705.