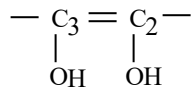


ROZDZIAŁ XVIII. **ZAWARTOŚĆ KWASU
ASKORBINOWEGO (WITAMINY C)
W WARZYWACH I OWOCACH**

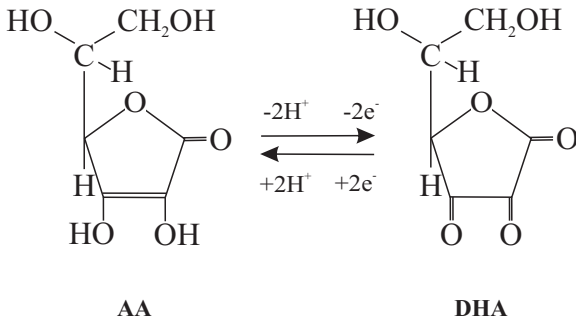
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Kwas askorbinowy (C₆H₈O₆) pod względem chemicznym jest γ -laktonem kwasu 2,3-dehydro-*L*-gulonowego i powstaje w wyniku przemian związków cukrowych. U roślin istnieją dwie główne drogi biosyntezy kwasu askorbinowego: z glukozy i z galaktozy. Działanie fizjologiczne kwasu *L*-askorbinowego wiąże się z **ugrupowaniem endiolowym**, którego obecność warunkuje **właściwości redukujące** tego związku i jego charakter kwasowy:



Kwas *L*-askorbinowy ma zdolność do odwracalnego utleniania i redukcji (por. rysunek 18.1). Dzięki temu kwas *L*-askorbinowy to **główny antyoksydant nieenzymatyczny** środowiska wodnego komórki, chroniący je przed skutkami stresu oksydacyjnego. Współdziała także z antyoksydantami lipofilowymi komórek, w tym tokoferolami i karotenoidami.

Formy zredukowana – kwas ***L*-askorbinowy (AA)**, i utleniona – **kwas *L*-dehydroaskorbinowy (DHA)** (C₆H₆O₆), tworzą **układ oksydoredukcyjny**, w którym kwas *L*-askorbinowy jest utleniany (nieenzymatycznie lub enzymatycznie) do anionorodnika askorbylowego i dalej do monodehydro- i dehydroaskorbinianu, a ten jest regenerowany do formy zredukowanej na drodze enzymatycznej przy udziale zależnej od glutationu reduktazy dehydroaskorbinianowej.



Rysunek 18.1. Kwas *L*-askorbinowy (AA) i *L*-dehydroaskorbinowy (DHA) jako formy zredukowana i utleniona witaminy C

Kwas askorbinowy odgrywa rolę regulacyjną w procesach wzrostu, różnicowania i w metabolizmie komórek roślinnych. Pełni również funkcję kofaktora enzymów uczestniczących np. w cyklu ksantofilowym, biosyntezie giberelin, katabolizmie glukozynolanów (hydroliza do bioaktywnych pochodnych), biosyntezie etylenu, biosyntezie ekstensyny, metabolizmie tyrozyny, syntezie NAD(P)H i ATP.

Kwas askorbinowy jako związek chemiczny występuje w formie bezbarwnych kryształów o temperaturze topnienia 190–192°C, kwaśnym smaku, bez zapachu. W postaci krystalicznej jest stosunkowo trwały, natomiast w roztworach wodnych łatwo ulega oksydatywnej degradacji pod wpływem szeregu czynników, takich jak: wysoka temperatura, pH > 6, obecność tlenu i jonów metali ziem przejściowych (np. miedź, żelazo), światło, UV. Pod wpływem wymienionych czynników AA utlenia się do DHA, a ten dalej ulega nieodwracalnej hydrolizie do kwasu 2,3-diokso-*L*-gulonowego, który nie wykazuje aktywności biologicznej. Kolejne etapy katabolizmu to przekształcenie kwasu 2,3-diokso-*L*-gulonowego do kwasu szczawowego i treonowego.

Dla ludzi i niektórych zwierząt, takich jak małpy, owocożerne nietoperze, kawia domowa, które nie mają zdolności do biosyntezy tego związku, AA i DHA jest witaminą C i musi być przyjmowany z pożywieniem. Źródłem witaminy C są głównie produkty roślinne.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Analiza wpływu procesów przetwarzania żywności na zawartość formy zredukowanej (kwas *L*-askorbinowy, AA) i utlenionej (kwas *L*-dehydroaskorbinowy, DHA) witaminy C w wybranych produktach pochodzenia roślinnego.

2. Porównanie całkowitej zawartości kwasu *L*-askorbinowego (AA) w wybranych świeżych i przetworzonych produktach pochodzenia roślinnego.

Doświadczenie I

Analiza jakościowa kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Zasada metody

Analiza jakościowa form kwasu askorbinowego za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC): identyfikacja AA i DHA obecnych w badanych ekstraktach na podstawie porównania zabarwienia w świetle UV (254 nm) i współczynników przesunięcia (R_f) ich plam na chromatogramie względem wzorców.

Materiał

owoce i warzywa, w zależności od sezonu i dostępności, w formie surowej oraz poddane procesom przetwarzania w celu przygotowania do spożycia (np. gotowanie) lub po okresie przechowywania (np. zamrażanie, pasteryzacja, inna konserwacja):

- a) warzywa, np. ziemniak gotowany, natka pietruszki, liście kopru, brokuł i brukselka – świeże i zamrożone, papryka czerwona i zielona, ogórek świeży, kiszony, konserwowy, cebula i szczypior, groch mrożony i konserwowy, bulwy i kiełki rzodkiewki
- b) owoce, np. jabłko, gruszka – surowe i przechowywane w formie kompotu, truskawka, maliny świeże i zamrożone, owoce cytrusowe, owoce dzikiej róży

Odczynniki

3% kwas szczawiowy (lub 2–5% kwas metafosforowy lub 1% HCl), roztwory wzorcowe AA i DHA o stężeniu $0,05 \text{ mg cm}^{-3}$, mieszanina butanol–pirydyna–woda (4:6:3; v/v/v)

Sprzęt laboratoryjny

nóż, deseczka do krojenia, tarka, sączi z miękkiej bibuły, mrożone moździerz porcelanowe, pipety ($0,01\text{--}5 \text{ cm}^3$), cylindry miarowe 25 i 50 cm^3 (w liczbie zależnej od ilości materiału do badań), bagietki, lejek Büchnera + kolba ssawkowa, zlewki 100 cm^3 , waga laboratoryjna, pompa, markery

Do analizy TLC: komora chromatograficzna, minutnik, lampa UV, suszarka, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), pipety kapilarne do nanoszenia próbek na płytki chromatograficzne, linijki, ołówki

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktów

Ekstrakcja kwasu askorbinowego z badanych prób 3% roztworem kwasu szczawiowego (lub 2–5% kwasem metafosforowym lub 1% HCl) ma na celu stabilizację AA i przeciwdziałanie jego utlenianiu i dalszej degradacji.

a) Odważyć 5 g materiału roślinnego.

b) Tkanki rozdrobnić i dokładnie zhomogenizować w moździerzu porcelanowym z dodatkiem 25 cm^3 3% kwasu szczawiowego. Kwas szczawiowy dodawać porcjami po około 5 cm^3 . Roztarty materiał przenieść ilościowo do cylindra miarowego o objętości 50 cm^3 i uzupełnić kwasem szczawiowym do 50 cm^3 . Delikatnie i dokładnie wymieszać bagietką, pozostawić na 5 minut.

c) Homogenat przesączyć przez sącze z bibuły przy użyciu lejka Büchnera podłączonego do pompy (lejek Büchnera wsunąć w szyjkę kolby ssawkowej, dokładnie docisnąć gumową uszczelkę, zapewniając szczelne połączenie, kolbę ssawkową podłączyć do pompy, na lejku Büchnera umieścić zwilżony wodą destylowaną krążek bibuły filtracyjnej, włączyć pompę, upewnić

się, że filtr całkowicie zakrywa wszystkie otwory lejka, przesączyć ekstrakty), przelać do opisanych zlewek na 100 cm³.

2. Analiza TLC

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B):

- a) Na płytce chromatograficznej zaznaczyć odpowiednio dwa punkty startowe dla wzorców AA i DHA, pozostałe dla badanych ekstraktów.
- b) Wybrać pary ekstraktów badanych materiałów roślinnych w taki sposób, aby w każdej parze jeden ekstrakt pochodził z materiału surowego, a drugi – z odpowiadającego mu materiału przetworzonego.
- c) Na punkty startowe kolejno nakropić pipetą kapilarną porcjami łącznie po 0,05 cm³ ekstraktów oraz po 0,025 cm³ roztworów wzorcowych AA i DHA.
- d) Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej wysyczonej fazą ruchomą o składzie butanol–pirydyna–woda (4:6:3; v/v/v), chromatogram rozwijać około 60 minut.
- e) Po wyjęciu chromatogramu z komory natychmiast zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika, płytkę wysuszyć.

Opracowanie wyników

1. Oglądać chromatogram w świetle UV, przy długości fali 254 nm, na ścieżkach wzorców i ekstraktów obrysować ołówkiem plamy odpowiadające AA i DHA.
2. Obliczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla obu związków, dzieląc odległość środka plamy od linii startu [cm] przez odległość czoła fazy ruchomej od linii startu [cm].
3. Zidentyfikować AA i DHA w ekstraktach badanych materiałów w oparciu o porównanie współczynników R_f plam prób badanych i wzorców.

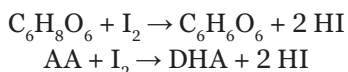
4. Wykonać rysunek chromatogramu, uwzględniając wielkość plam (por. rozdział XXI, rysunek 21.1).
5. W oparciu o uzyskane wyniki ocenić wpływ procedur przetwarzania żywności na zawartość kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego.

Doświadczenie II

Jodometryczne oznaczenie zawartości kwasu askorbinowego

Zasada metody

Przygotowane ekstrakty miareczkowane są roztworem I w KI w obecności roztworu skrobi. Obecny w próbach AA ulega utlenieniu do DHA, po zakończeniu reakcji nadmiar jodu wybarwia skrobię na niebiesko:



Odczynniki

1% kleik skrobiowy, 0,001 M roztwór I w KI, roztwór wzorcowy AA o stężeniu 0,05 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

zlewki (25–50 cm³), pipeta 5 cm³, biureta, lejek z cienką nóżką

Wykonanie doświadczenia

1. Miareczkowanie roztworu wzorcowego: do 3 zlewek (25–50 cm³) wlać po 5 cm³ wzorcowego roztworu AA, dodać 3–4 krople 1% kleiku skrobiowego. Biuretę napełnić 0,001 M roztworem I w KI. Roztwory wzorcowe AA miareczkować roztworem I w KI do momentu pojawienia się trwałego niebieskiego zabarwienia. Zapisać, jaką objętość I w KI zużyto do zmiareczkowania wzorca, uzyskane wyniki uśrednić.
2. Miareczkowanie badanych ekstraktów (por. Doświadczenie I): do 3 zlewek (25 cm³) wlać po 5 cm³ ekstraktu badanego materiału, dodać 3–4 krople 1% kleiku skrobiowego. Dalej postępować tak jak przy miareczkowaniu wzorca.

UWAGA: Jeżeli pierwsze miareczkowanie wykaże, że badany materiał ma niską zawartość AA, do ponownego miareczkowania należy wziąć 10 cm³ ekstraktu.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć zawartości AA w miligramach w przeliczeniu na 100 g ś. m. materiału roślinnego [mg 100 g⁻¹ ś. m.], korzystając z przykładu obliczenia podanego w załączniku 4. Wyniki przedstawić w tabeli 18.1.

Tabela 18.1. Zawartość kwasu askorbinowego (AA) w badanych owocach i warzywach

Badany materiał	Objętość [cm ³] I w KI zużytego na zmiareczkowanie 5 cm ³ ekstraktu	Zawartość AA [mg 100 g ⁻¹ ś. m.]

2. W oparciu o uzyskane wyniki ocenić różnice w zawartości AA w badanych materiałach oraz wpływ procedur przetwarzania żywności na jego utlenianie i degradację. Porównać z danymi w załączniku 4.

Literatura

- Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Moszczyński P., Pyć R., *Biochemia witamin, cz. 2: Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- Sikorski Z. E. (red.), *Chemia żywności, t. 3: Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2007.