

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C

1. Εισαγωγή

Η απουσία της βιταμίνης C από το διαιτολόγιο των ανθρώπων οδηγεί στην εμφάνιση σκορβούτου. Η διατροφική αυτή ασθένεια, ήταν ίσως από τις πρώτες που μελετήθηκαν και ήταν εξαιρετικά διαδεδομένη στην Ευρώπη του 15^{ου} και 16^{ου} αιώνα. Ο Lind το 1753 θεράπευε το σκορβούτο με χυμούς φρούτων. Το 1933 ο Szent Gyorgyi Kirg απομόνωσε την βιταμίνη C και στη συνέχεια Βρετανοί και Ελβετοί την συνέθεσαν χημικά. Στη σημερινή εποχή εκδηλώνεται σπάνια.

Η μόνη βιταμίνη που είναι απαραίτητη σε μεγάλες ποσότητες για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Η βιταμίνη C είναι γνωστή και ως ασκορβικό οξύ (α στερητικό + σκορβούτο). Η λήψη της βιταμίνης είναι επαρκής αφού υπάρχει σε μεγάλη ποικιλία ευρέως διαδεδομένων τροφών, πράγμα όμως που δεν είναι αυτονόητο για τους πληθυσμούς με χαμηλό βιοτικό επίπεδο. Το ασκορβικό οξύ είναι ευρύτατα διαδεδομένο στη φύση αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκεται σε καρπούς (εσπεριδοειδή, πιπεριές κ.ά.) αλλά και σε άλλους φυτικούς ιστούς όπως το σπανάκι, ο μαϊντανός και το μπρόκολο. Η βιταμίνη C βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα αλλά όχι στο κρέας. Καταστρέφεται εύκολα κατά το μαγείρεμα των τροφίμων. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο της Ε.Ε με τον χαρακτηρισμό E300.

Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (ΣΗΠ) [Recommended Daily Allowance ή Recommended Dietary Allowance, (RDA)] δόση για υγιείς μη καπνιστές ενήλικες που είναι 75-90 mg, υπερβαίνει την απαιτούμενη για αποφυγή σκορβούτου (45mg) και είναι αρκετή για παροχή αντιοξειδωτικής προστασίας. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν υπάρχει πλεονέκτημα στην πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας.

Μεγαδόσεις ίσες με 100-250mg/day θεωρήθηκαν ότι προφυλάσσουν από το κρύωμα κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε σε δοκιμές υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι μεγάλες δόσεις αντιμετωπίζονται εύκολα από τον οργανισμό όμως μπορεί να συνεισφέρουν στη δημιουργία πετρών στα νεφρά.

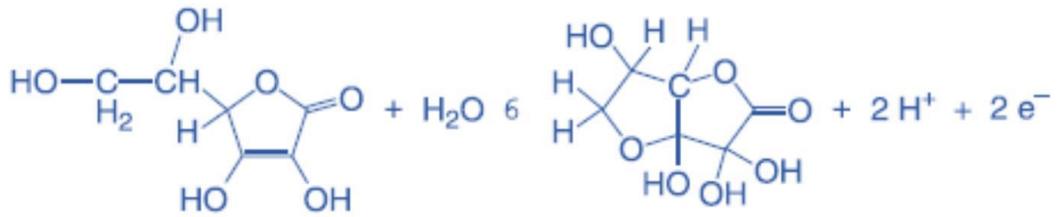
Ο ρόλος του ασκορβικού οξέος στη μεταβολική διαδικασία δεν έχει γίνει απόλυτα κατανοητός. Υπάρχουν ενδείξεις ότι παίρνει μέρος στις αντιδράσεις υδροξυλίωσης της τυροσίνης, της προλίνης και κάποιων στεροειδών ορμονών. Ο μηχανισμός σε αυτές τις μεταβολικές διαδικασίες φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα της βιταμίνης C να δρα ως αναγωγικός παράγοντας. Εκτός από τη δράση της στην παρεμπόδιση εκδήλωσης σκορβούτου, η βιταμίνη C έχει σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος. Επίσης συμβάλλει στην αποτελεσματική κατανομή του σιδήρου στον οργανισμό εμποδίζοντας την εμφάνιση αναιμίας, και καταπραΰνει τις αλλεργίες θωρακίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα.

1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της βιταμίνης C (ασκορβικού οξέος)

- Είναι ευαίσθητη στη οξείδωση και τον αερισμό.
- Είναι ευαίσθητη σε pH=7 ακόμη και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 60°C.
- Είναι υδατοδιαλυτή.
- Παρουσιάζει απώλειες κατά το πλύσιμο των κομμένων λαχανικών.
- Ο τραυματισμός (κόψιμο ή πολτοποίηση) των φυτικών ιστών οδηγεί σε απελευθέρωση οξειδασών με αποτέλεσμα την οξείδωση και καταστροφή του ασκορβικού οξέος. Η οξείδωση του ασκορβικού οξέος προσδίδει καστανό μεταχρωματισμό στο χυμό των φρούτων και λαχανικών.
- Η ποσότητα βιταμίνης C που λαμβάνεται εξαρτάται από την ποσότητα κατανάλωσης του φυτικού οργάνου.
- Οι μεγάλες απώλειες οφείλονται στο ότι η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή και απομακρύνεται με το νερό του βρασίματος. Προτείνεται η χρήση ατμού.
- Βράσιμο λαχανικών: Να ρίχνονται σε βραστό νερό (αδρανοποίηση ενζύμων) και όχι σε κρύο έως ότου βράσει γιατί τα ένζυμα προλαβαίνουν να αποικοδομήσουν τη βιταμίνη.
- Λόγω της χαρακτηριστικής ομάδας της διενόλης, το ασκορβικό οξύ έχει αναγωγικές ιδιότητες και όξινο χαρακτήρα.
- Διαλύεται σε νερό, μεθανόλη και αιθανόλη, είναι αδιάλυτο στο βενζόλιο, αιθέρα, χλωροφόρμιο και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Είναι αρκετό ευαίσθητο στα αλκάλια και την οξείδωση, ιδιαίτερα παρουσία καταλύτη.
- Οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ, που είναι σχετικά σταθερό σε pH<4,0 και διατηρεί το 75-80% της ενεργότητας του L-ασκορβικού οξέος.

Οι βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του οφείλονται στις αναγωγικές του ιδιότητες-λειτουργεί ως φορέας ηλεκτρονίων. Απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο της βιταμίνης λόγω αλληλεπίδρασης του με οξυγόνο ή μεταλλικά ιόντα παράγει semihydro-L-ascorbate, μία δραστική ελεύθερη ρίζα που μπορεί να αναχθεί από διάφορα ένζυμα και να δώσει ξανά L-ascorbic acid, στα φυτά και τα ζώα. Επιπλέον, μια άλλη χαρακτηριστική αντίδραση για το ασκορβικό οξύ είναι η οξείδωσή του σε dehydro-L-ascorbic acid δίνοντας έτσι ένα αποτελεσματικό οξειδοαναγωγικό σύστημα (Εικόνα 1):

Οι δυο αυτές μορφές (οξειδωμένη-ανηγμένη) είναι βιολογικά ενεργές. Το ασκορβικό οξύ (ανηγμένη μορφή) είναι σχετικά σταθερό στη θέρμανση ενώ το αφυδρογονωμένο ασκορβικό (οξειδωμένη μορφή) είναι ασταθές και ο δακτύλιός του υδρολύεται εύκολα σε δικετογουλονικό οξύ, το οποίο δεν έχει αντισκορβουτικές ιδιότητες. Όταν φρούτα, λαχανικά και άλλες τροφές υποβάλλονται σε θερμική κατεργασία (π.χ. βράσιμο, μαγείρεμα κ.τ.λ.) λαμβάνει χώρα μερική ή ολική απώλεια της βιταμίνης C λόγω μετατροπής της σε δικετογουλονικό οξύ.



Εικόνα 1. Η εξίσωση οξείδωσης του ασκορβικού οξέος.

1.2. Ευεργετικές ιδιότητες της βιταμίνης C

Η βιταμίνη C:

- Διεγείρει τους φυσικούς αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού.
- Έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Ρυθμίζει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα.
- Συμμετέχει στην σύνθεση των ορμονών των επινεφριδίων.
- Βελτιώνει την αγγειακή λειτουργία.
- Είναι απαραίτητη για την αύξηση και την επιδιόρθωση του συνδετικού ιστού των δοντιών, των οστών και των χόνδρων.
- Διατηρεί ακέραια τα τριχοειδή αγγεία.
- Ενισχύει την απορρόφηση του σιδήρου.
- Έχει αντικαρκινική δράση.
- Συμμετέχει στον σχηματισμό του κολλαγόνου.

1.3. Έλλειψη βιταμίνης C

Έλλειψη της βιταμίνης C έχει ως αποτέλεσμα:

- Κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας σκορβούτο.
- Βραδεία επούλωση πληγών, καταγμάτων.
- Μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις.
- Αναιμία.
- Πρόκληση καρδιαγγειακών νοσημάτων λόγω αποδυνάμωσης των αγγειακών τοιχωμάτων.

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την καταστροφή του ασκορβικού οξέος:

- Η θερμοκρασία
- Το O₂
- Το pH
- Η παρουσία ενζύμων, μετάλλων και αναγωγικών ή οξειδωτικών σωμάτων

Κατάψυξη (-18°C) => απώλεια του 30% της βιταμίνης C

Κατάψυξη (-12°C) => Απώλεια του 80% της βιταμίνης C

Μέσες τιμές βιταμίνης C σε διάφορα φυτικά όργανα

ΦΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ	[C] mg/100g
Σταφίδα μαύρη κορινθιακή	210
Μαϊντανός	190
Μπρόκολα	120
Πράσινη πιπεριά	120
Ακτινίδια	100
Εσπεριδοειδή	50

Απώλειες βιταμίνης C κατά τη θερμική επεξεργασία

ΛΑΧΑΝΙΚΑ	ΑΠΩΛΕΙΑ (%)
Πατάτα:	
Βραστή με επιδερμίδα	15
Βραστή χωρίς επιδερμίδα	50
Τηγανητή	30
Ψητή με επιδερμίδα	20
Λάχανο	40-65
Κουνουπίδι	25-45
Σπανάκι	25-35
Αρακάς	45-65

2. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της βιταμίνης C (ασκορβικού οξέος)

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της βιταμίνης C (ασκορβικού οξέος) στα τρόφιμα υπάρχουν πολλές διαθέσιμες τεχνικές. Το ασκορβικό προσδιορίζεται με ογκομετρικές, φθορισμομετρικές, χρωματογραφικές και φωτομετρικές μεθόδους.

α) χημικός/ογκομετρικός προσδιορισμός

Στηρίζεται στις αναγωγικές ιδιότητες του ασκορβικού οξέος που ανάγει ποσοτικά τον δείκτη 2,6-διγλωροφαινόλ-ινδοφαινόλη (DCPIP).

Το δείγμα τεμαχίζεται και εκχυλίζεται σε μπλέντερ με μίγμα μεταφωσφορικού / οξικού οξέος.

Ακολουθεί φυγοκέντρωση και παραλαβή του διαλύματος. Το διάλυμα οξινίζεται με δ/μα οξαλικού οξέος. Ακολουθεί ογκομέτρηση με τη χρωστική που προηγουμένως έχει τιτλοδοτηθεί με πρότυπο ασκορβικό οξύ. Σαν τελικό σημείο της ογκομέτρησης λαμβάνεται το σημείο σχηματισμού ελαφρώς ρόδινης χροιάς, η οποία παραμένει επί 5- 10 sec.

Μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα της μεθόδου

Η μέθοδος έχει ακρίβεια περίπου 3%. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια.

Η μέθοδος έχει τα ακόλουθα μειονεκτήματα:

- δεν προσδιορίζεται το δεϋδρο-ασκορβικό οξύ που συνήθως υπάρχει σε μικρές ποσότητες στους χυμούς και το οποίο έχει ανάλογη βιολογική δράση με το ασκορβικό οξύ,
- μαζί με το ασκορβικό οξύ προσδιορίζεται και το ελεύθερο διοξείδιο του θείου που πιθανώς υπάρχει στο δείγμα ως συντηρητικό. Η δέσμευση του SO₂ μπορεί να γίνει πριν την ογκομέτρηση, με προσθήκη 2-3 mL ακετόνης στο δείγμα.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- είναι απλή και γρήγορη
- το χρωματικό τέλος της αντίδρασης είναι εύκολα διαπιστώσιμο.

β) φθορισμομετρικός προσδιορισμός

Στηρίζεται στη μετατροπή του ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ και εν συνεχεία στην αντίδραση της α-δικετο ομάδας με ο- φαινυλενοδιαμίνη. Η προκύπτουσα κινοξαλίνη μετρείται φθορισμομετρικά στα $\lambda_{ex}=350$ nm και $\lambda_{em}=430$ nm.

γ) χρωματογραφικός/ογκομετρικός προσδιορισμός

Το δείγμα εκχυλίζεται με διάλυμα οξαλικού οξέος. Σε περίπτωση που πρόκειται να προσδιοριστεί το άθροισμα (ασκορβικό + δεϋδροασκορβικό), το εκχύλισμα κατεργάζεται με H₂S σε pH=3,5, για την αναγωγή του δεϋδροασκορβικού σε ασκορβικό οξύ. Το προκύπτον διάλυμα χρωματογραφείται (χρωματογραφία χάρτου ή λεπτής στιβάδας) με διάλυμα οξικού βουτυλεστέρα κορεσμένου με νερό/αιθανάλη. Η κηλίδα του ασκορβικού αποξύνεται και προσδιορίζεται το ασκορβικό ογκομετρικά.

δ) φωτομετρικός προσδιορισμός

Κατ' αρχήν οξειδώνεται το ασκορβικό προς δεϋδροασκορβικό οξύ με ενεργό άνθρακα (Norit) ή 2,6 διγλωροφαινολ-ινδοφαινόλη. Το δεϋδροασκορβικό οξύ αντιδρά με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη και παράγεται 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνη η οποία κατόπιν διάλυσης σε H₂SO₄ 85% δίνει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα που απορροφά σε μήκος κύματος $\lambda=520-525$ nm.

ε) προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία (HPLC)

Εφαρμόζεται σε καθαρά φαρμακευτικά δείγματα αλλά και σε εκχυλίσματα ιστών, βιολογικών υγρών κλπ που έχουν προηγουμένως καθαρισθεί με χρωματογραφία στήλης.

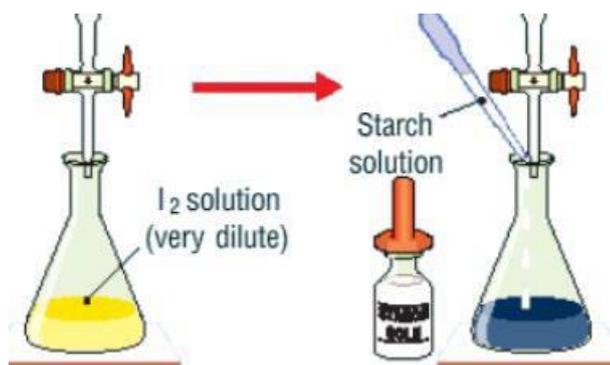
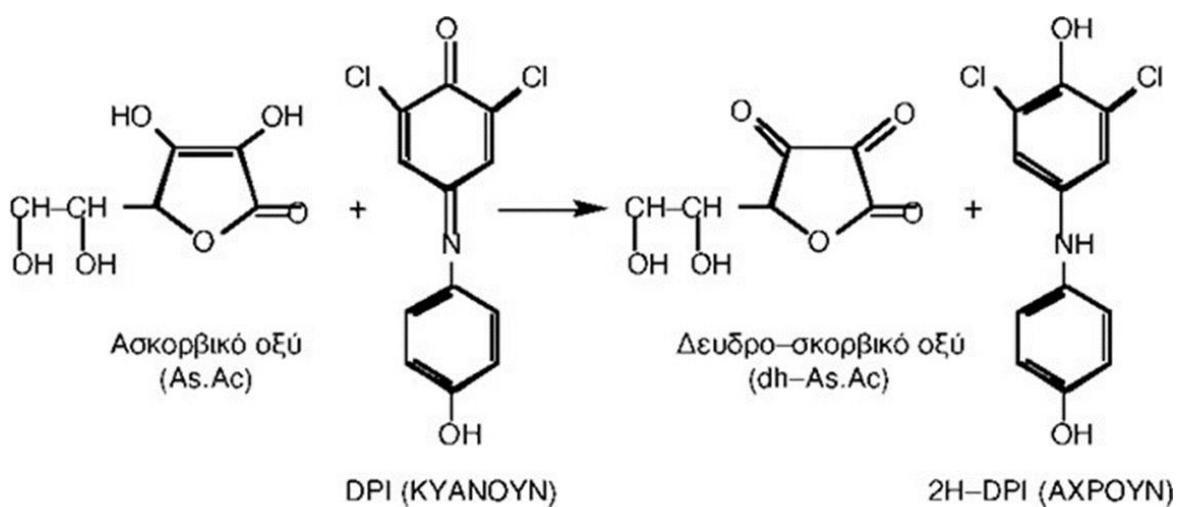
ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C ΣΕ

ΧΥΜΟΥΣ ΦΡΟΥΤΩΝ

Στην άσκηση θα γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιταμίνης C σε δείγματα φρέσκου και εμπορικού χυμού πορτοκαλιού και λεμονιού. Η περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ θα μετρηθεί σε mg/ml δείγματος.

Αρχή της μεθόδου

Στηρίζεται στις αναγωγικές ιδιότητες του ασκορβικού οξέος που ανάγει ποσοτικά τον δείκτη 2,6-διχλωροφαινόλ-ινδοφαινόλη (DCPIP). Κατά την ογκομέτρηση το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ, ενώ ο δείκτης DCPIP ανάγεται προς την άχρωμη λευκοένωσή του, Η-DCPIP. Η αντίδραση είναι:



Πειραματική διαδικασία

1) Παρασκευή διαλυμάτων

- Διάλυμα του μετά νατρίου άλατος της 2,6-διχλωροφαινοϋλινδοφαινόλης (DCPIP) 0,04% w/v (0,04g/100mL)

Παρασκευάζεται με διάλυση 0,1g του μετά νατρίου άλατος της 2,6-διχλωροφαινοϋλινδοφαινόλης σε 100mL νερό. Το διάλυμα διηθείται σε ογκομετρική φιάλη

των 250mL. Τυχόν υπόλειμμα που παραμένει στον ηθμό εκπλένεται με νερό και το διήθημα αραιώνεται έως τη χαραγή. Το διάλυμα παραμένει αναλλοίωτο για μια εβδομάδα υπό ψύξη).

- Κορεσμένο διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI) 50 % w/v
- Διάλυμα HCl 1N
- Πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0, 01N
- Δείκτης αμύλου (παρασκευάζεται με διάλυση 1g αμύλου σε 100mL βραστού νερού)
- Διάλυμα οξαλικού οξέος 0,4 % w/v

2) Τιτλοδότηση διαλύματος 2,6-διγλωροφαινυλινδοφαινόλης

- Σε κωνική φιάλη των 250mL εσφυρισμένου πώματος μεταφέρονται 10mL διαλύματος 2,6-διγλωροφαινυλινδοφαινόλης (DCPIP).
- Στην συνέχεια προστίθενται 5mL διαλύματος ιωδιούχου καλίου (KI) 50% w/v και 10mL διαλύματος HCl 1N..
- Η κωνική φιάλη αφού αφεθεί σε ηρεμία για 2 min, και παραχθεί I_2 από την αντίδραση, ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N παρουσία δείκτη αμύλου.
- Σημειώνεται η κατανάλωση $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ μέχρι να αποκτήσει το διάλυμα ελαφρά ρόδινο χρώμα (α mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

1 mL διαλύματος ινδοφαινόλης αντιστοιχεί με 0,0088 x α mg ασκορβικού οξέος,

όπου α = ο αριθμός των mL του 0,01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που καταναλώθηκαν για την τιτλοδότηση

3) Προετοιμασία του δείγματος χυμού:

- Μεταφέρονται με σιφόνιο 10mL χυμού εμπορίου ή χυμού φρούτων σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με διάλυμα οξαλικού οξέος 0,4% w/v.
- Το διάλυμα ανακινείται και διηθείται με πτυχωτό ηθμό.
- Μεταφέρονται ακριβώς 10mL του διηθήματος με σιφόνιο σε κωνική φιάλη και προστίθενται 15mL διαλύματος οξαλικού οξέος 0,4%.

4) Ογκομέτρηση του ασκορβικού οξέος του δείγματος χυμού:

- Το διάλυμα στην κωνική φιάλη ογκομετρείται με προσθήκη του διαλύματος DCPIP από προχοΐδα μέχρις ότου εμφανιστεί και παραμείνει μια ελαφρά ρόδινη χροιά.
- Η ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 2-3 φορές και εξάγεται ο μέσος όρος καταναλώσεων του DCPIP.
- Σημειώνεται η κατανάλωση DCPIP μέχρι να αποκτήσει το διάλυμα ελαφρά ρόδινο χρώμα (β mL DCPIP).

Έκφραση Αποτελεσμάτων

Από τις καταναλώσεις του θειοθειϊκού νατρίου (α mL) και της DCPIP (β mL) υπολογίζεται η περιεκτικότητα του ασκορβικού οξέος (AsAc) στο αρχικό δείγμα του χυμού σε mg/mL από τον τύπο:

$$\text{mg AsAc/mL χυμού} = \alpha \times \beta \times 0.0088$$

Το αποτέλεσμα του προσδιορισμού του ασκορβικού οξέος στους φρουτοχυμούς εκφράζεται ως mg ασκορβικού οξέος / 100 mL χυμού.

$$\% \text{ ασκορβικό οξύ (mg/100 ml)} = \alpha * 0,88 * \beta$$

Φύλλο Εργασίας

ΟΜΑΔΑ: _____

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΑΡΜ

Πειραματικά Δεδομένα - Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Για κάθε τιτλοδότηση δείγματος που κάνατε συμπληρώστε με τον Μ.Ο. των ενδείξεων τον παρακάτω πίνακα:

No	Δείγμα χυμού	Ετικέτα mgAA/100mL	α mL Na ₂ S ₂ O ₃ *	β mL DCPIP **	mg AsAc/ mL	mgAsAc/ 100mL

AsAc: ασκορβικό οξύ (ascorbic acid)

***: από τιτλοδότηση της DCPIP**

**** : από ογκομέτρηση χυμών**

Άσκηση 1^η

Από τα δεδομένα του πίνακα να υπολογίσετε τα mg ασκορβικού σε 100 mL χυμού.

Άσκηση 2^η

Να υπολογίσετε τα mg ασκορβικού οξέος που υπάρχουν σε ένα ποτήρι (240mL) των χυμών που αναλύσατε. Τι ποσοστό του RDA αντιπροσωπεύουν; (δίνεται RDA=75mg/day)

Βιβλιογραφία

Beran J.A. (2014). Vitamin C analysis. In “Laboratory Manual for Principles of General Chemistry”, 10th Edition, John Wiley & Sons, Inc., NJ, U.S.A.

Benzie IF, Choi SW (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Adv Food Nutr Res.* 71:1-53.

Garrett R., Grisham C. (2005). *Biochemistry*, 3rd ed. W. B. Saunders (Orlando, FL), pp. 566-568. An introduction to vitamin C.

Χίου, Α. (2001). *Μέταλλα, Βιταμίνες και Διατροφή. Σημειώσεις Μαθήματος*, Αθήνα.