Zadanie 2.

Temat: Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

Wykaz materiałów
- owoc cytryny i papryki, kiszona kapusta
- 2 zlewki o pojemności 100 ml, zlewka do homogenizatora o pojemności 400 – 500 ml, 4 probówki wirówkowe, 3 kolby miarowe o pojemności 25 cm^3, kolba miarowa o pojemności 100 cm^3, skalpel lub nóż, deska do krojenia, folia aluminiowa, nylon
- lejek Büchnera, kolba ssawkowa, sączki bibułowe
- pipety automatyczne nastawne 0,5-5 cm^3, 0,1-1 cm^3 , 20-200 µl i 2-20 µl, strzykawka do HPLC

Sprzęt: wirówka, wytrząsarka, aparat do HPLC, waga elektroniczna, homogenizator mechaniczny, membranowa pompa próżniowa

Stosowane roztwory
- Roztwór standardowy kwasu askorbinowego zawierający 4 mg odczynnika w 100 cm^3 roztworu zawierającego 90 ml 0.2 M wodnego roztworu kwasu mrówkowego i 10 ml metanolu o czystości „do HPLC" (przygotowujemy na świeżo).

- W celu przygotowania roztworu Carreza I do 21,95 g dwuwodnego octanu cynkowego ($Zn(CH_3COO)_2$ x 2 H_2O) dodaje się 3 cm^3 kwasu octowego lodowatego, a następnie dopełnia wodą do 100 cm^3.

- W celu przygotowania roztworu Carreza II 10,6 g trójwodnego sześciocyjano-żelazianu potasowego II $K_4[Fe(CN)_6]$ x 3 H_2O rozpuszcza się w wodzie i dopełnia wodą do 100 cm^3.

Wprowadzenie

Witaminy są to niskocząsteczkowe związki organiczne, o różnorodnej budowie chemicznej, rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. 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, dostarczanymi przez bakterie glebowe roślinom wyższym (witamina B12) i niższym (witamina B1).

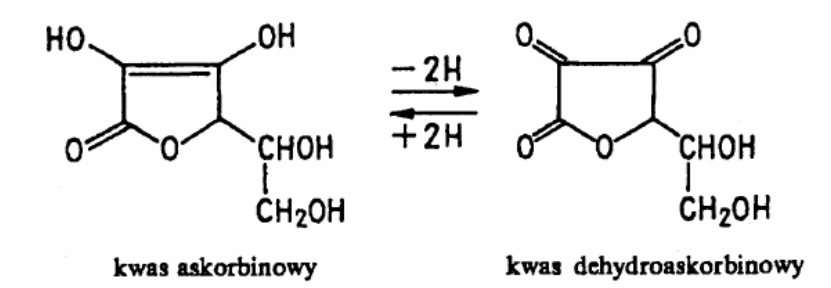
Niektóre witaminy wytwarzane są przez zwierzęta z odpowiednich związków syntetyzowanych przez rośliny. Takie związki nazywane są prowitaminami np. β-karoten. Rzeczywiste zapotrzebowanie ilościowe na poszczególne witaminy jest trudne do określenia min. ze względu na ich działanie synergiczne. Zależy ono 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 gdyż większość witamin to substancje bardzo wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych, dlatego ich straty bywają stosunkowo duże.

Kwas L-askorbinowy (witamina C)

Przed poznaniem budowy chemicznej witamina C była nazywana czynnikiem przeciwgnilcowym. Zapobiegała bowiem szkorbutowi, 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 szkorbutu). Własności 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.



Budowa chemiczna kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego

Kwas L-askorbinowy jest związkiem 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+}. Układ oksydoredukcyjny kwas askorbinowy↔kwas dehydroaskorbinowy uczestniczy w regulowaniu potencjału oksydoredukcyjnego w komórce i bierze 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, 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 cytrynianów 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 wytwarzanie produktów wzbogaconych w witaminę C oraz witaminy syntetycznej.

Tabela. Zawartość witaminy C w wybranych warzywach i owocach

	Zawartość witaminy C [mg/100g]
Dzika róża suszona	1700
Czarna porzeczka	183
Papryka czerwona	144
Brukselka	94
Papryka zielona	91
Kalafior	69
Truskawki	68
Kapusta czerwona	54
Cytryny	50
Pomarańcze	49

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie roztworu standardowego

Do kolby o pojemności 100 ml odważyć na wadze konikowej 4 mg kwasu askorbinowego. Naważkę rozpuścić w 100 ml 10% metanolu w 0.2 M wodnym roztworze kwasu mrówkowego przez uzupełnienie ww roztworem do kreski (roztwór przygotowujemy na świeżo).

2. Przygotowanie ekstraktów

Wycisnąć do zlewek po ok. 10 cm^3 soku z cytryny i kiszonej kapusty. Zważyć z dokładnością do pierwszego miejsca dziesiętnego i zanotować ok. 40 g papryki, pokroić na drobne kawałki i zhomogenizować w porcelanowym moździerzu. Roztartą paprykę przeciskamy przez podwójną warstwę nylonu i sączymy do probówki przez lejek Büchnera. Objętość przesączu zmierzyć za pomocą cylindra i zanotować. Przesączyć należy również dwa pozostałe ekstrakty.

2. Oznaczanie metodą HPLC

Witamina C oznaczana jest w postaci kwasu L-askorbinowego techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem kolumny RP-C_{18} i detektora UV przy λ=254 nm.

W celu dokonania pomiarów należy przenieść po 4 cm^3 uzyskanych ekstraktów do kolb miarowych o poj. 25 cm^3. Następnie dodawać po 1 cm^3 roztworów Carreza I i II, uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski, wymieszać i pozostawić w spokoju na 15 min. Po tym czasie zawartość kolb wymieszać, przenieść po 1 cm^3 roztworu do probówek Eppendorfa i wirować przez 10 min. przy maksymalnej sile odśrodkowej (obsługa wirówki na podstawie osobnej instrukcji). Osobno przygotować roztwór standardowy kwasu askorbinowego zawierający 4 mg odczynnika w 100 cm^3 10 % metanolu w 0,2 M wodnym roztworze kwasu mrówkowego (90 ml 0.2 M wodnego roztworu kwasu mrówkowego plus 10 ml metanolu do HPLC).

Analiza HPLC - Rozdział chromatograficzny prowadzimy w układzie MeOH i 0.2M roztwór HCOOH, (10:90). Prędkość przepływu 1 ml/min. Poczynając od roztworu standardowego, próbki aplikujemy do aparatu (objętości próbek podano w poniższej tabeli) i rejestrujemy chromatogramy. Obsługa wysokociśnieniowego chromatografu cieczowego na podstawie osobnej instrukcji. Czas analizy jednej próbki wynosi ok. 10 min.

Tab.1 Objętości aplikowanych próbek

Materiał	Objętość aplikowanej próbki
Roztwór standardowy wit. C	50 µl
Sok z cytryny	30 µl
Sok z kapusty	40 µl
Ekstrakt z papryki (m= ….. g; V= …... cm^3)	20 µl

Zawartość witaminy C w próbach wyliczamy na podstawie porównania powierzchni pików prób i próby standardowej. Odczytanie powierzchni pików na podstawie osobnej instrukcji.

Arkusz pracy

Imię i nazwisko:..... **Imię i nazwisko:**.....

Imię i nazwisko:..... **Imię i nazwisko:**.....

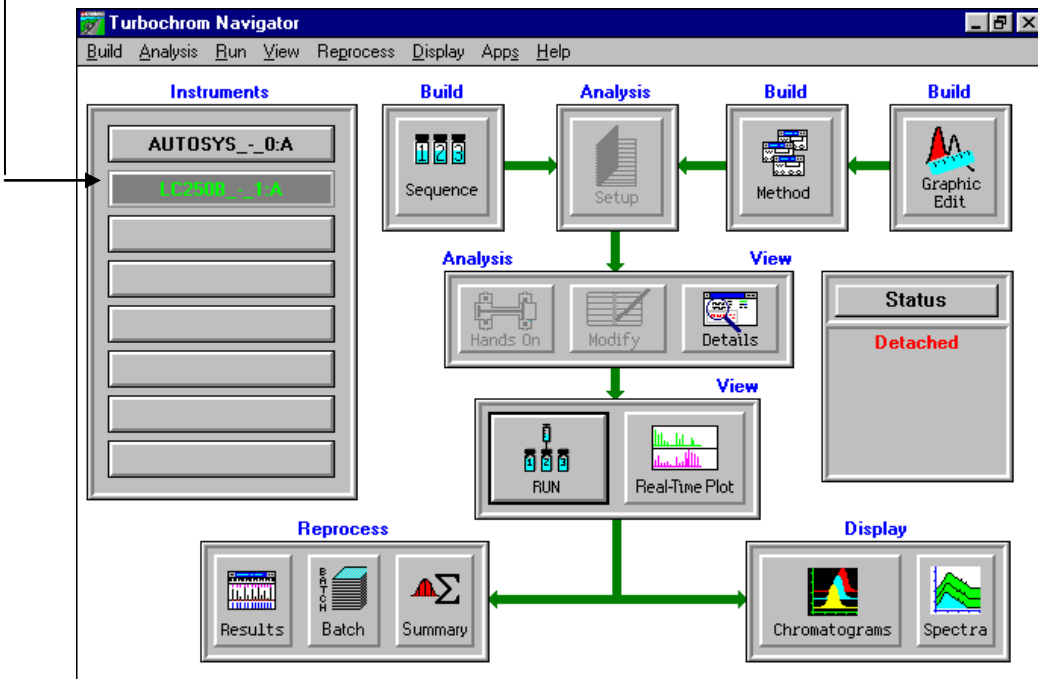
Oznaczanie witaminy C metodą HPLC

Materiał	**Powierzchnia**	**Stężenie**
Roztwór standardowy wit. C		4 mg/100 cm^3
Sok z cytryny		.... mg/100 cm^3
Sok z kapusty		.... mg/100 cm^3
Ekstrakt z papryki (m= ….. g; V= …... cm^3)		.... mg/100 g

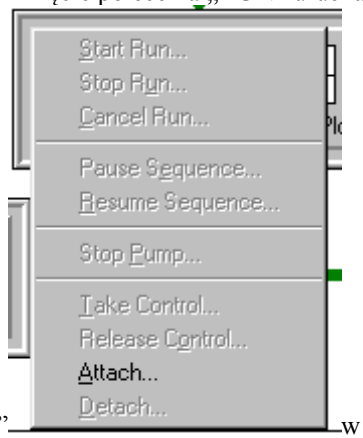
Instrukcja wykonywania analiz na chromatografie cieczowym firmy PerkinElmer.

Do wykonania analizy konieczne jest zaprogramowanie aparatu. W tym celu należy uruchomić komputer oraz program o nazwie TurboChrom obsługujący urządzenie.

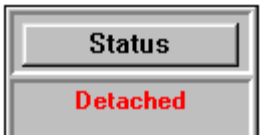
Następnie należy wybrać w programie odpowiednie urządzenie [LC250B_-_1:A]

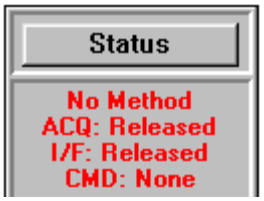


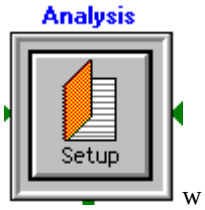
Poprzez kliknięcie polecenia „RUN” uruchamiamy rozwijalne menu z którego wybieramy polecenie



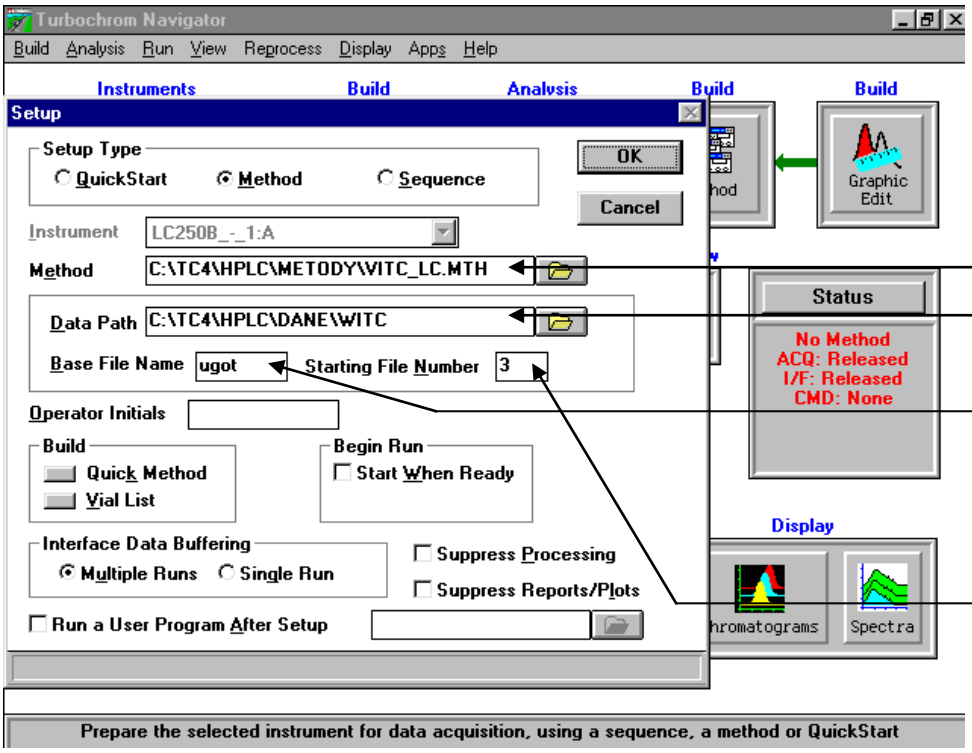
„Attach...” w celu uzyskania połaczenia między komputerem a aparatem HPLC

Wtedy zmieni się „STATUS” z odłączony 

na połączony 

Następnie klikamy 

w celu zadania analizy

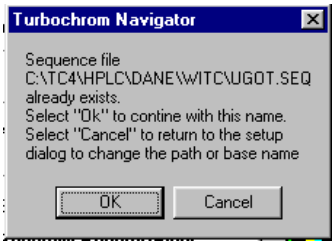


W polu „Method” wybieramy plik definiujący metodę rozdziału

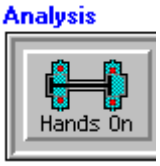
W polu „Data Path” wybieramy folder w którym ma być zapisany wynik

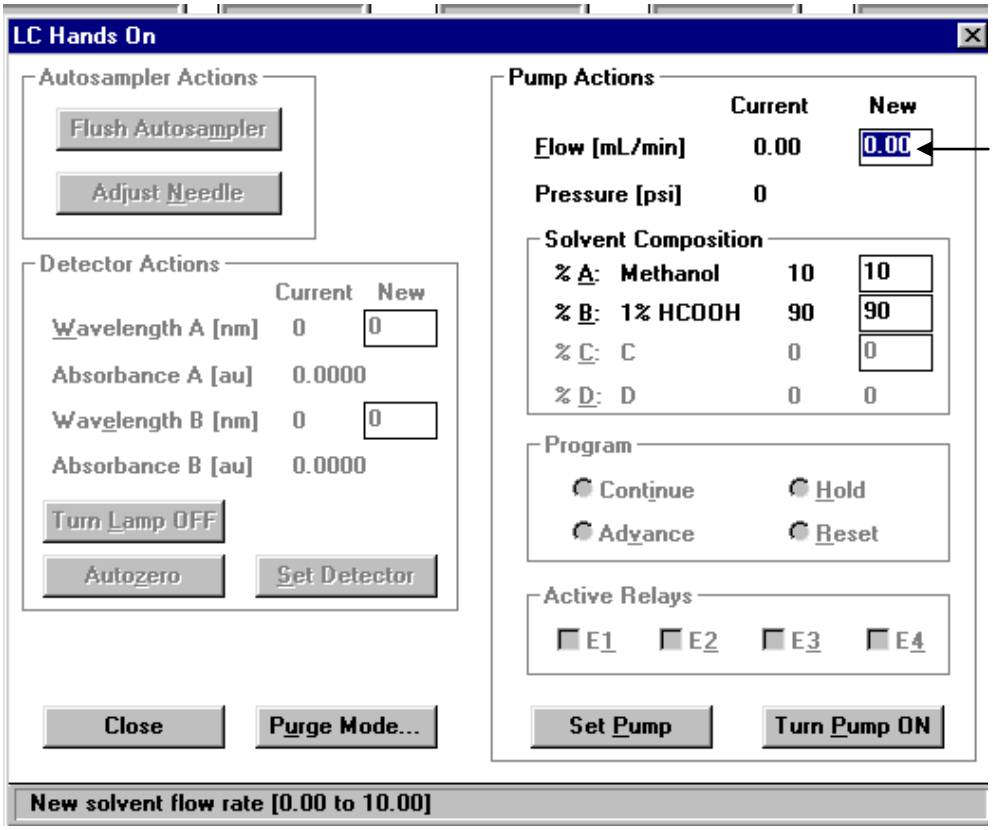
W polu „Base File Name” wpisujemy nazwę pliku pod którą ma być zapisany wynik analizy. Nawa nie może być dłuższa niż 4 znaki

W polu „Strarting Filr Number” wpisujemy numer pliku (przykładowa nazwa pliku witc_001)?

Klikamy „OK” oraz potwierdzamy komunikat 

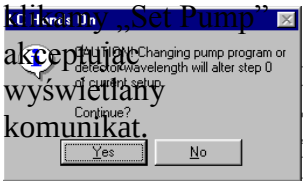
oznaczający że już został zapisany plik o podanej nazwie i plik z analizą będzie miał dopisane oznaczenie literowe (przykładowa nazwa pliku witc_001a).

W celu uruchomienia aparatu klikamy 



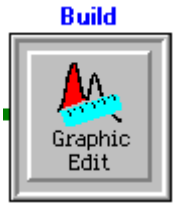
W tym polu wpisujemy wartość przepływu

Wpisujemy 0.1 i klikamy „Set Pump” akceptujemy wyświetlany komunikat.

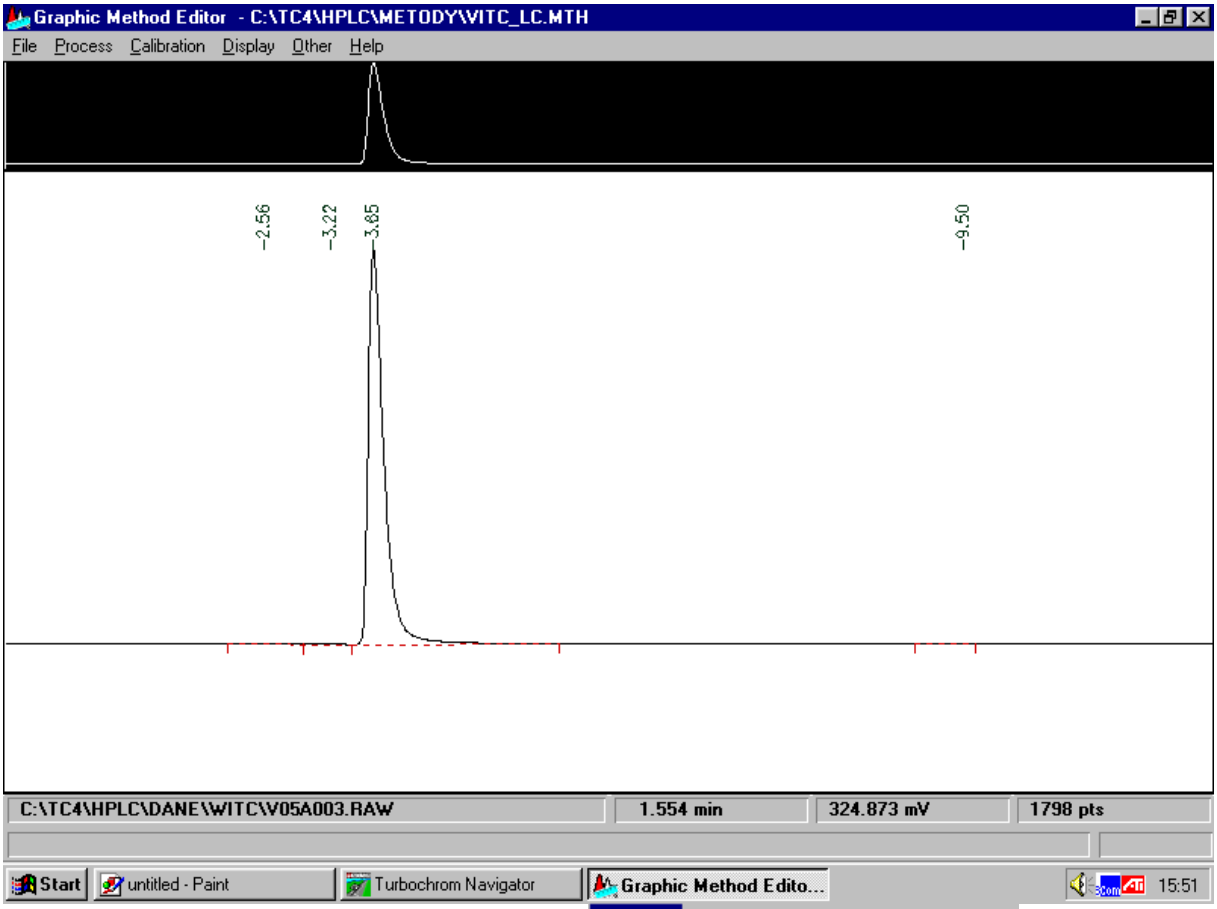


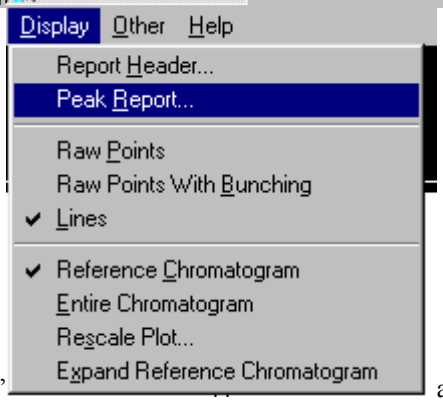
Następnie klikamy „Turn Pump ON” Później zwiększamy przepływ do 0.2 i

Przy pomocy narzędzia „LC Hands On” dokonujemy uruchomienia aparatu. Pompę należy uruchamiać powoli poprzez stopniowe zwiększanie przepływu

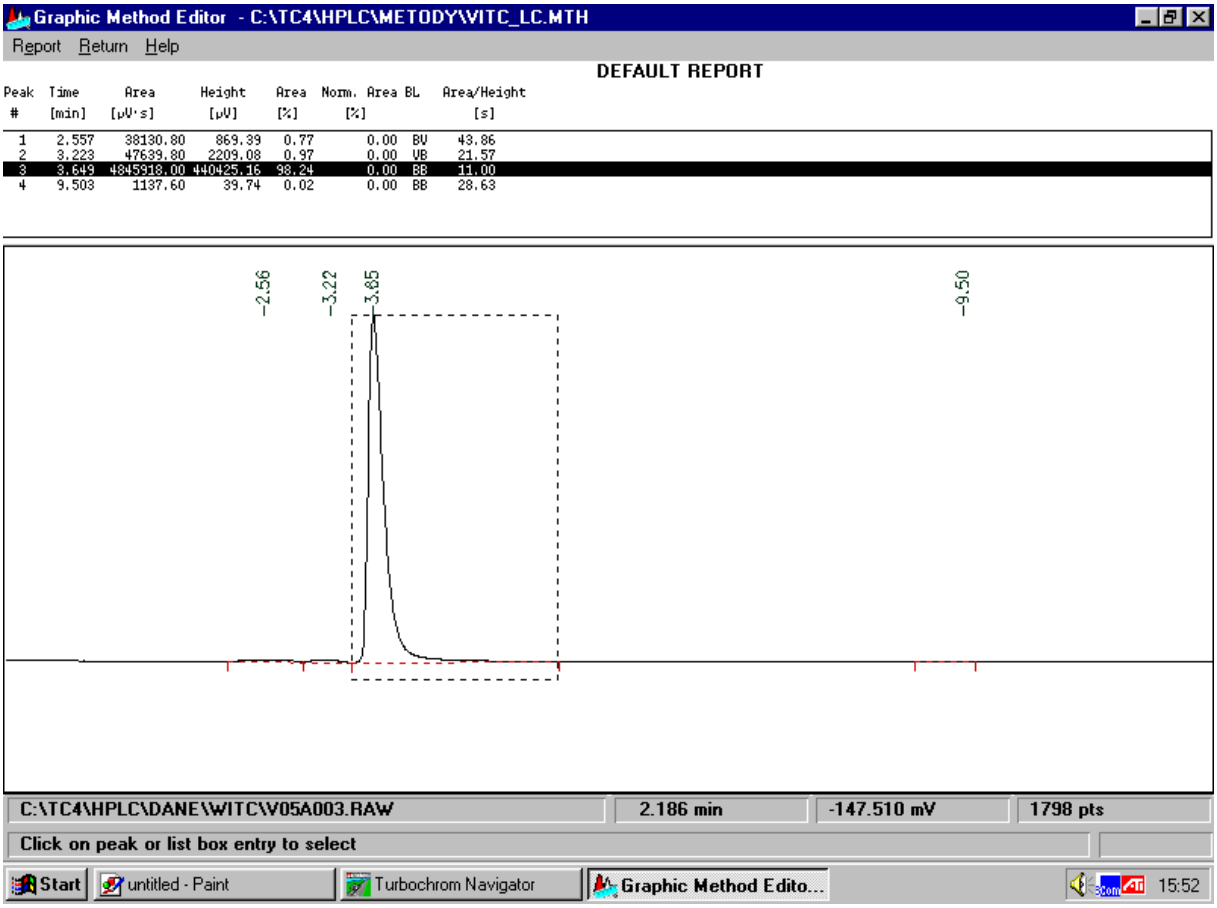
Następnie wstrzykujemy próbkę przy użyciu strzykawki do zaworu dozującego w następujący sposób. Wprowadzamy igłę do dozownika tak żeby doszła do końca (po wyczuciu pierwszego oporu dopychamy igłę jeszcze ok. 3 mm aż do wyczucia kolejnego oporu). Nie zmieniając położenia strzykawki przekręcamy dźwignę zaworu na dół, sprawdzamy czy na wyświetlaczu pompy LC znajduje się komunikat „Ready”, wstrzykujemy próbkę, po czym ponownie przekręcamy dźwignię zaworu do góry i dopiero w tym momencie możemy wyjąć igłę z dozownika. Następnie igłę przepłukujemy 10 krotnie 20% wodnym roztworem metanolu. Po skończonej analizie musimy odczytać wynik. W tym celu klikamy 

i w menagerze plików wybieramy plik zawierający naszą analizę i klikamy OK.





W oknie „Graphic Method Editor” klikamy „Display” a następnie z rozwiniętego menu wybieramy „Peak Report”.



W oknie „DEFAULT REPORT” wybieramy pik o czasie retencji odpowiadający witaminie C i odnotowujemy jego powierzchnię „Area [µV s]”. W identyczny sposób postępujemy z próbką standardu. Poprzez podstawienie tych wartości do proporcji możemy obliczyć stężenie witaminy C w próbie.