

Príspevok k štúdiu sledovania skutočného obsahu vitamínu C v tepelne spracovaných potravinách

M. KAPUSNÍKOVÁ — B. KRKOŠKOVÁ

V predchádzajúcej práci sme uviedli spôsoby oxidatívneho odbúrania kyseliny L-askorbovej, pričom sme venovali osobitnú pozornosť enzymatickému odbúraniu kyseliny L-askorbovej. Uviedli sme tiež, že na stanovenie kyseliny L-askorbovej chýba špecifické chemické činidlo. Nevýhodou väčšiny používaných postupov je, že sú nešpecifické a najmä to, že neumožňujú stanovenie kyseliny L-dehydroaskorbovej, ktorá je súčasťou vitamínu C.

Na stanovenie kyseliny L-askorbovej, L-dehydroaskorbovej a reduktónov sme experimentálne použili metódu podľa Timberlaka a Bridla, ktorú sme aplikovali na čerstvú surovinu (grapefruity, zemiaky), ďalej na surovinu po tepelnom ošetrení (zemiaky) a mraziarsky skladovaný polotovár (miešaná zelenina). V týchto pokusoch sa nám nepodarilo kyselinu L-dehydroaskorbovú za daných podmienok uspokojivo stanoviť [1].

Východiskovým bodom Španyarových pokusov [2] bolo pozorovanie, že reduktóny (R) a dehydroreduktóny (DHR) prítomné v potravinách sa za istých podmienok rozkladajú ťažšie ako kyselina L-askorbová (KA), resp. kyselina L-dehydroaskorbová (DHA). Ak sa v časti extraktu rozloží KA a v druhej časti DHA, môžeme potom stanoviť hodnotu R a DHR. Po stanovení R, resp. DHR, môžeme pri známych hodnotách KA a R resp. DHA a DHR, vypočítať skutočné hodnoty KA a DHA.

Aby sme mohli kvantitatívne sledovať obsah vitamínu C (KA a DHA), stanovili sme KA metódou podľa Schuleka a Floderera s Fe^{+2} -z, α' -dipyridylom a DHA metódou podľa Roa s 2,4-dinitrofenylhydrazínom. Tie redukujúce látky, ktoré sa pri stanovení správajú ako KA, môžeme stanoviť modifikovanou α , α' -dipyridylovou metódou, tie, ktoré pri stanovení DHA pôsobia rušivo, stanovíme modifikovanou 2,4-dinitrofenylhydrazínovou metódou. Takto získané hodnoty odpočítame od výsledkov získaných pôvodnými postupmi. Obsah vitamínu C sa vypočíta podľa vzťahu

$$\text{vit. C} = (\text{KA}_{zd} - R) + (\text{DHA}_{zd} - \text{DHR})$$

(zd = zdanlivá). Vylúčením vplyvu R na stanovenie vitamínu C sa zaoberal Vámos [3]. Použil postup stanovenia pomocou berlínskej modrej. Normálny

potenciál redoxného systému feroxyanid—ferikyanid je za rovnakých podmienok blízky redoxnému potenciálu DHA—KA. Reakcia medzi KA a ferikyanidom celkom prebehne za krátky čas, čím vzniká možnosť znížiť vplyv R a iných rušivých látok. Pri tomto postupe sa najprv vykoná reakcia KA s ferikyanidom, ktorý sa stechiometricky redukuje na dvojmocnú zlúčeninu. Rušivý vplyv prebytku ferikyanidu sa eliminuje prídavkom fluoridových iónov. Potom sa k reakčnej zmesi pridá chlorid železitý a feroxyanid sa prevedie na intenzívne sfarbenie berlínsku modrú.



Aplikáciou Timberlakovej a Bridlovej metódy sa nám nepodarilo uspokojivým spôsobom stanoviť DHA. Prikláňame sa k názoru von Hughesa [4], ktorý skonštatoval, že Tillmansova metóda je rušená prítomným prebytkom cysteínu. Hľadali sme preto možnosť aplikovať iné metódy stanovenia. Výhodný sa nám javil Spanyarov postup, a to preto, že táto metóda udáva podmienky, za ktorých možno zistiť v potravinárskom materiáli obsah KA, DHA, R a DHR. Redukcia DHA sa uskutočňuje pomocou DL-hemocysteínu. Nasledujúca reakcia stanovenia KA pomocou α , α' -dipyridylu nie je však rušená prebytkom DL-homocysteínu. Redukcia pomocou DL-homocysteínu neovplyvňuje množstvo R. Keď teda sledujeme jednu časť extraktu po redukcii a ďalšiu časť pred redukciou potom diferenciaciou obidvoch zistených hodnôt udáva skutočný obsah DHA.

R sa zväčša stanoví v potravinách ktoré boli podrobené tepelnému zákroku. Vyskytujú sa však aj prípady, že v niektorých zahrievaných výrobkoch s obsahom vitamínu C sa nedajú dokázať nijaké R. Pri tepelne spracovaných vzorkách sa stáva, že v dôsledku silného tepelného zákroku sa množstvo R významne zvýši, čím sa získajú falošné hodnoty vitamínu C. Je to preto, lebo rozdiel medzi KA a zlúčeninami označovanými R nie je podstatný. R pozostávajú z polyfenolderivátov, z produktov Maillardovej reakcie a karamelizácie. Zlúčeniny obidvoch posledných reakcií sa KA zvlášť podobajú. Všetky tieto zlúčeniny obsahujú skupinu $\text{HO}-\text{C}=\text{C}-\text{OH}$ ako KA. Ich molekulová váha môže byť vyššia alebo nižšia ako KA a môžu byť v potravine prítomné vedľa seba v rôznych pomeroch. Všetky tieto fakty poukazujú na to, že nemožno celkom oddeliť R od KA, a to ani chromatograficky ani rozložením jednej z týchto zložiek. Reakcia rozkladu nemôže, vzhľadom na podobnosť týchto látok, prebiehať tak, že sa v zmesi rozloží iba KA, a R nie. Podmienky, za ktorých sa R rozkladajú iba v takej miere, ktorá zodpovedá množstvu nerozloženej KA, nemôžu sa uskutočniť, keď sa pokusy robia bezprostredne po vzniku R. Redukčná schopnosť R sa najmä v prvých 10—12 dňoch po ich vzniku znižuje. Pri potravinách, ktoré prichádzajú do úvahy, je tento úbytok po prvých 3—4 dňoch bezvýznamný. Keď dosiahne premena R túto fázu, tvoria sa vo veľkej miere z R vysokomolekulové látky a množstvo ľahko rozložiteľných R sa znižuje. R prítomné v potravinách sa počas sledovania nachádzajú zväčša v tejto fáze. V tomto štádiu je pomerne ľahké nájsť také podmienky rozkladu, za ktorých sa rozloží prevažná časť KA, a iba relatívne malé množstvo R. V tomto prípade sa dá proces rozkladu KA usmerniť do tej miery, že množstvo rozkladajúcich sa R v reakčnej zmesi a množstvo nepremenenej KA sú takmer vyrovnané [2].

Ako vzorku sme použili bielu kapustu, ktorú sme pokrájali na drobné rezy, veľké asi $3 \times 0,2$ cm. Rezky sme tepelne ošetrili vo vriacej vode 1, 2, 3 a 4 min. a skladovali pri -24°C . Sledovali sme aj tepelne neošetrenú vzorku. V čerstvej vzorke a v tepelne ošetrovaných vzorkách hneď po tepelnom zásahu sme stanovili vitamín C podľa Spanyolara [2]. Na porovnanie sme v prvom pokuse sledovali KA Tillmansovou metódou [5]. Stanovovali sme aj sušinu vzoriek. V prvom pokuse sme vzorky mraziarsky skladovali počas troch mesiacov a v mesačných intervaloch sme sledovali vitamín C a sušinu. V druhom pokuse sme vzorky skladovali iba dva mesiace.

a) *Príprava vzorky.* Navážime podľa očakávaného obsahu KA 2,5 — 5 — 10 — 20 g homogenizovanej vzorky s presnosťou na 0,01 g. Pridáme polovičné množstvo morského piesku (vypratý s HCl a vyžíhaný) a 0,5 ml ľadovej kyseliny octovej. Rozotierame v porcelánovej miske na jemnú kašu. Vodou vypláchneme do 100 ml odmernej banky a doplníme po značku. Dôkladne premiešame a zmes filtrujeme cez filtračný papier.

b) *Metóda stanovenia.* Vlastné stanovenie pozostáva z troch postupov. V prvom postupe sme stanovovali v časti extraktu zdanlivú kyselinu L-askorbovú (KA a R) po reakcii s α, α' -dipyridylom (α, α' -DPD).

Do 100 ml odmernej banky sme pipetovali podľa predpokladaného obsahu KA 10 ml extraktu, 10 ml vody a H_3PO_4 na úpravu pH na 1,7. Potom sme pridali 2,5 ml α, α' -dipyridylu a 1 ml FeCl_3 . Banku sme nechali 30 min v tme a po doplnení vodou po značku sme merali intenzitu sfarbenia na prístroji Spekol pri 500 nm. Ako porovnávací roztok sme pri všetkých meraniach použili zmes obsahujúcu všetky reagencie okrem α, α' -dipyridylu v rovnakom množstve ako pri analyzovanej vzorke.

Výpočet:

$$\text{KA} + \text{R} = \frac{E \cdot K_1 \cdot 10}{k \cdot v \cdot g},$$

pričom K_1 je extinkčný faktor, k — hrúbka kyvety, v — objem použitého extraktu, g — navážka v gramoch.

Druhým postupom sme stanovili v ďalšej časti extraktu celkový zdanlivý vitamín C (KA, DHA, R) po redukcii DL-homocysteínom.

Do 50 ml odmernej banky sme pipetovali 3 ml extraktu a 2 ml roztoku DL-homocysteínu. Pomocou 45% K_2POH_4 sme upravili pH na 7—7,5. Banku sme temperovali 30 min pri 37°C . Potom sme pridali 3 ml 8% kyseliny trichlóroctovej a upravili pH s H_3PO_4 na 1,7. V ďalšom postupe sme pridali 2,5 ml α, α' -dipyridylu a 1 ml FeCl_3 a po 60-minútovom státi v tme sme merali intenzitu sfarbenia na Spekole obdobne ako v prvom postupe.

Výpočet:

$$\text{KA} + \text{DHA} + \text{R} = \frac{E \cdot K_2 \cdot 10}{k \cdot v \cdot g}$$

Tretím postupom v ďalšej časti extraktu sme stanovili R.

Do 100 ml odmernej banky sme pipetovali 5 ml extraktu a 10 ml vody a prídavkom 10% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ sme upravili pH na 6. Banku sme temperovali 30 min pri 52°C . Potom sme okyslili roztok asi 20 ml kyseliny trichlóroctovej

a upravili sme pH pomocou H_3PO_4 na 1,7. Prídavok 2,5 ml α, α' -dipyridylu a 1 ml $FeCl_3$ a meranie farebnej intenzity sme vykonali podobne ako v prvom postupe.
Výpočet:

$$R = \frac{E \cdot K_3 \cdot 10}{k \cdot v \cdot g}$$

Extinkčné faktory K_1 , K_2 , K_3 sme vypočítali na základe kalibračnej krivky v závislosti extinkcie roztoku od koncentrácie KA. Zo získaných hodnôt sa vypočíta KA, DHA a celkový vitamín C (KA, DHA) podľa vzorcov:

$$KA = I - III,$$

$$KA + DHA = II - III,$$

$$DHA = II - I.$$

Výsledky pokusov a diskusia

Z výsledkov uvedených v tab. 1 možno sledovať vplyv tepelného ošetrovania na hladinu vitamínu C i na pomer jeho zložiek (KA, DHA) v celkovom obsahu.

Tab. 1. Vplyv tepelného ošetrovania na zloženie vitamínu C

Čas ohrevu (min)	mg % KA	mg % DHA	mg % vit. C	mg % R	Zloženie vit. C	
					% KA	% DHA
čerstvá	618,8	53,9	672,7	196,5	91,9	8,1
1	820,1	0	820,1	50,9	100,0	0
2	994,1	0	994,1	52,7	100,0	0
3	926,1	0	926,1	50,6	100,0	0
4	271,1	447,1	718,3	50,6	37,7	62,3

V čerstvej vzorke kapusty sme našli 672,7 mg% vitamínu C. Po tepelnom spracovaní, ktoré trvalo 1, 2 a 3 min., sa množstvo vitamínu C v porovnaní s pôvodnou vzorkou zvyšuje. Tento jav vysvetľujeme uvoľnením viazanej formy vitamínu C teplom na stanoviteľnú formu. Tepelné spracovanie trvajúce 4 min vedie už k čiastočnej premene KA na DHA. Zloženie vitamínu C v tejto vzorke je 38% KA a 62% DHA, kým vo vzorkách s kratším tepelným ošetrením je vitamín C prítomný iba vo forme KA.

Množstvo R sa v priebehu tepelného ošetrovania v porovnaní s čerstvou vzorkou znižuje vo všetkých vzorkách približne rovnakou mierou. V paralelnom pokuse sme sa okrem sledovania vplyvu tepelného ošetrovania zamerali na

porovnanie stanovenia vitamínu C metódou α , α' -DPD a klasickou metódou DFIF.

V tab. 2 sú zistené hodnoty sledovaných ukazovateľov v čerstvej vzorke a v tepelne ošetrovaných vzorkách po jednomesačnom skladovaní pri -24°C . V čerstvej a tepelne neošetrovanej vzorke po jednomesačnom skladovaní sú hodnoty vitamínu C, stanovené metódou DFIF, v zhode s hodnotami zdanlivého vitamínu C stanovenými metódou α , α' -DPD. Vo vzorkách po tepelnom ošetrovaní hodnoty vitamínu C, stanovené metódou DFIF, kolíšu.

Tab. 2. Vplyv tepelného ošetrovania na obsah vitamínu C vo vzorke skladovanej 1 mesiac pri -24°C

Čas ohrevu (min)	Čas skladovania (mes.)	Metóda α , α' -DPD			Metóda DFIF
		mg % zdanl.	mg % R	mg % skut. vit. C	mg % vit. C
čerstvá	0	54,7	16,6	38,1	72,2
neblanš.	1	23,8	23,8	0	18,5
1	1	299,8	141,1	158,7	152,0
3	1	326,1	119,0	269,1	185,9
4	1	298,1	20,9	277,2	136,2

Metódou α , α' -DPD sme zistili v tepelne ošetrovaných vzorkách po skladovaní oveľa vyššie hodnoty vitamínu C ako v čerstvej vzorke. I keď sme bezprostredne po tepelnom spracovaní rozbery nerobili, vysvetľujeme si tento úkaz podobne ako v prvom pokuse, t. j. uvoľnením viazanej formy vitamínu C.

Na základe zistených priemerných hodnôt v ďalších pokusoch so sledovaním vplyvu tepelného ošetrovania na obsah vitamínu C sme zistili, že sa obsah vitamínu C zvyšuje po 1 a 2 min o 38—47%, po 3 min o 21% a po 4 min o 7%. Klesajúci trend obsahu vitamínu C s predlžovaním tepelného ošetrovania je spôsobený zrejme stratou vitamínu C vylúhovaním do blanširovacej vody (tab. 3, 4).

Množstvo R po jednomesačnom skladovaní v porovnaní s čerstvou vzorkou sa značne zvýšilo v tepelne ošetrovaných vzorkách. Porovnanie preskúšaných metód na zistenie obsahu vitamínu C vyznieva na prospech metódy α , α' -DPD, pretože táto metóda umožňuje stanoviť obidve zložky vitamínu C, t. j. KA a DHA, bez ovplyvnenia výsledku prítomnými R.

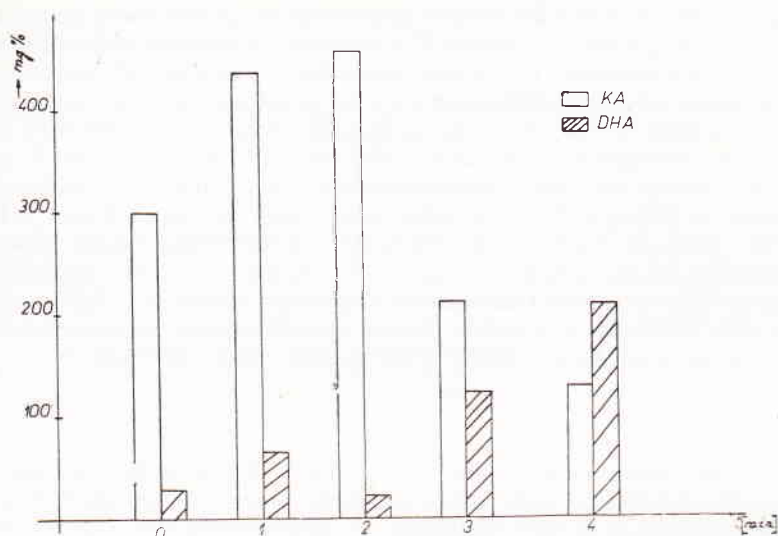
Vplyv tepelného ošetrovania na zloženie vitamínu C je zrejмый z grafu 1. V tepelne neošetrovanej vzorke a vo vzorke tepelne ošetrovanej 1 a 2 min je takmer všetok vitamín C prítomný vo forme KA (92—94%). S predlžovaním ohrevu sa zvyšuje podiel DHA na celkovom obsahu vitamínu C. Po 3 min je vo forme DHA 36,5% a po 4 min 62% vitamínu C. Pri sledovaní vplyvu

Tab. 3. *Vplyv mraziarskeho skladovania na zloženie vitamínu C a na množstvo reduktónov*

Čas ohrevu (min)	Čas skladovania (mes.)	mg % KA	mg % DHA	mg % vit. C	mg % R	Zloženie vit. C	
						% KA	% DHA
čerstvá	0	618,8	53,9	672,7	196,5	91,9	8,1
1	0	820,1	0	820,1	50,9	100,0	0
3	0	926,1	0	926,1	50,6	100,0	0
4	0	271,1	447,1	718,3	50,6	37,7	62,3
neblanš.	2	0	457,2	457,2	5,7	0	100,0
1	2	0	535,1	535,1	36,1	0	100,0
3	2	19,1	373,4	392,6	3,5	4,9	95,1
4	2	10,0	400,2	410,2	0	2,4	97,6

Tab. 4. *Paralelné výsledky*

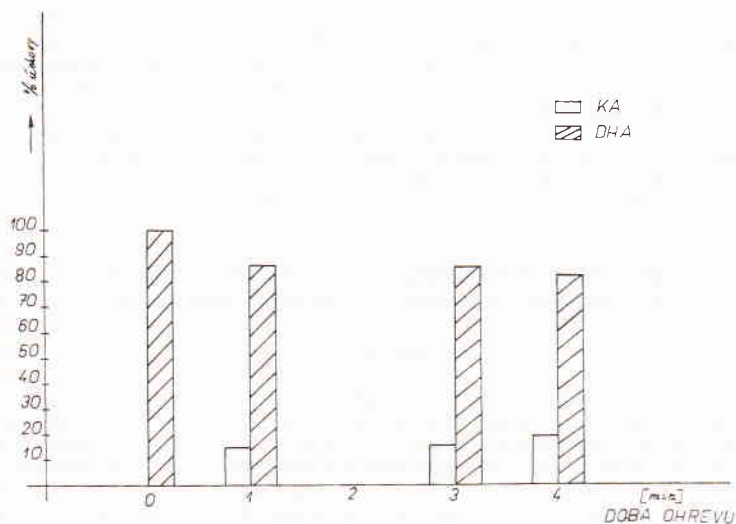
Čas ohrevu (min)	Čas skladovania (mes.)	mg % KA	mg % DHA	mg % vit. C	mg % R	Zloženie vit. C	
						% KA	% DKA
čerstvá	0	295,5	28,1	323,6	64,0	91,3	8,7
1	0	436,8	62,9	499,8	31,3	87,4	12,6
2	0	456,7	20,4	477,1	0	95,7	4,3
3	0	211,8	121,9	333,7	0	63,5	36,5
1	3	48,1	290,3	338,4	268,3	14,2	85,8
3	3	30,8	173,9	204,7	20,8	15,0	85,0
4	3	177,2	339,8	517,1	23,3	34,3	65,7



Graf 1. Vplyv dĺžky tepelného ošetrenia na zloženie vitamínu C.

skladovania na uchovanie vitamínu C sme zistili po 2—3-mesačnom skladovaní pri -24°C priemerné uchovanie pôvodného množstva vitamínu C v jednotlivých vzorkách v rozmedzí 68—57%. Vplyv tepelného ošetrenia sa výrazne neprejavil.

Keď porovnávame zistené množstvá vitamínu C v skladovaných vzorkách s pôvodnými množstvami vitamínu C v čerstvej vzorke, je percento uchovania



Graf 2. Vplyv mraziarskeho skladovania na percento uchovania KA a DHA v tepelne ošetrených vzorkách.

в тепелне оšetrených vzorkách vyššie (priemerne 87%) vzhľadom na spomenuté uvoľnenie viazanej formy vitamínu C v dôsledku tepelného ošetrenia. Na hlbšie poznanie problematiky uchovania jednotlivých zložiek vitamínu C, ako aj problému zmien obsahu reduktónov by boli potrebné dlhodobé pokusy (skladovanie v priebehu 9—12 mes.), ako aj sledovanie väčšieho sortimentu vzoriek.

Zaujímavé výsledky sme získali pri sledovaní zloženia vitamínu C po skladovaní. Bez ohľadu na dĺžku tepelného ošetrenia je vitamín C prítomný takmer výlučne vo forme DHA. V tepelne neošetrenej vzorke po 1 min je to priemerne 100—93%, po 3 a 4 min 90—82% DHA z celkového obsahu vitamínu C. Tieto výsledky sú znázornené na grafe 2. Záverom možno konštatovať, že aplikácia metódy α , α' -DPD sa ukázala vhodná na sledovanie zloženia vitamínu C tepelne ošetrených vzoriek. Treba ešte preskúšať reprodukovateľnosť výsledkov a možnosti širšej aplikácie na väčšom súbore vzoriek.

Сúhrn

DPD metódu sledovania obsahu KA, DHA a R sme aplikovali na vzorky bielej kapusty, ktoré sme podrobili tepelnému ošetreniu v trvaní 1, 3 a 4 min. Obsah vitamínu C a R sme sledovali za skladovania pri teplote -24°C počas 2—3 mesiacov. Zistené hodnoty vitamínu C metódou α , α' -DPD sme v časti vzoriek porovnávali s hodnotami získanými metódou DFIF. Aplikácia metódy α , α' -DPD nám umožnila sledovať obsah a zloženie vitamínu C v tepelne ošetrených vzorkách bezprostredne po ohreve i počas mraziarskeho skladovania. Možnosť stanovenia obidvoch zložiek vitamínu C (KA, DHA) je výhodou tejto metódy v porovnaní s metódou DFIF.

Literatúra

1. KAPUSNÍKOVÁ, M.: Štúdium možnosti stanovenia kyseliny L-askorbovej, kyseliny L-dehydroaskorbovej a reduktónov. Bulletin VÚP SPA, 12, 1973, č. 3/4.
2. SPANYÁR, P. — KEVEL, E. — BLAZOVICH, M.: Bestimmung des tatsächlichen Gehaltes an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in Lebensmitteln. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 123, 1963, č. 2, s. 93—102.
3. VAMOS, É. — GÁBOR, E. SZ.: Quantitative Vitamin C Bestimmung mit Hilfe der Berlinerblau-Reaktion und photometrischer Auswertung. Nahrung, 17, 1973, č. 4.
4. HUGHES, R. E.: Biochem. J., 64, 1956, s. 203.
5. PRÍBELA, A.: Rozbory potravín. Bratislava, SVŠT 1969.

К исследованию действительного содержания витамина С в пищевых продуктах, переработанных с помощью тепловой обработки

Выводы

Мы наблюдали за содержанием л-аскорбиновой кислоты, л-дегидроаскорбиновой кислоты и редуктонов α - α' -дипиридиловым методом у образцов белокочанной капусты, применяя тепловую обработку в течение 1', 3' и 4'. Содержание витамина С и редуктонов мы исследовали до время хранения при температуре -24°C в течение 2—3 месяцев. Полученные величины витамина С α - α' -дипиридиловым методом мы сравнивали у одной части образцов с величинами, полученными методом Тильманса. Применение α , α' -дипиридилового метода нам предоставило возможность наблюдать за содержанием и структурой витамина С у теплообработанных образцов непосредственно после нагрева и во время морозильного хранения. Возможность определения обеих составных частей

витамина С (л-аскорбиновой и л-дегидроаскорбиновой кислоты) является выгодной по сравнению с методом Тильманса.

Contribution to the study of the real C vitamin content following in heat treated foods

Summary

The DPD (α , α' -dipyridil) method for following the content of KA (ascorbic acid), DHA (dehydroascorbic acid) and R (reductions) was applied on white cabbage samples, which were than submitted to heat treatment during 1', 3' and 4'. The content of C vitamin was followed during 2—3 month storage at the — 24 °C. The ascertained values of vitamin C, by means of the DPD. Method were in part of the samples compared with the values gained by means of the DFIF (dichlorofenolindofenol) method. The α , α' DPD method enabled the following of the vitamin content and its composition. The advantage of this method in comparison with the DFIF method is the possibility of ascertaining of both C vitamin components (KA, DHA).