

Određivanje termičke stabilnosti vitamina C u jabukama

Ispitivana je termička stabilnost α -askorbinske kiseline (vitamina C) u dve vrste jabuka: Delišeš – crvene i Ililjače – zelenokore. Praćena je promena koncentracije vitamina C u funkciji vremena pri temperaturama od 51°C, 65°C i 80°C u standardnom rastvoru α -askorbinske kiseline u kori i srži jabuka metodom po J. Tillmans-u. Rezultati pokazuju da je vitamin C najstabilniji u kori crvene jabuke gde ga ima i najviše. Utvrđeno je da se mehanizam reakcije razgradnje vitamina menja kod svih uzoraka jabuka između 51°C i 65°C, dok je kod rastvora čiste α -askorbinske kiseline red reakcije na svim temperaturama uvek jedan.

Uvod

Vitamini su složena organska jedinjenja sa različitim funkcionalnim grupama, koji katalitički deluju na procese u ćelijama. Svaki vitamin igra specifičnu ulogu i ne može se zameniti nekom drugom supstancom. Čovekov organizam neke vitamine uopšte ne proizvodi, a neke ne proizvodi u dovoljnim količinama. Askorbinska kiselina je jedno od važnih jedinjenja koje čovek mora obezbediti hranom jer je ne može sintetisati.

Vitamin C ima važnu ulogu u metabolizmu čoveka: pri sintezi nekih jedinjenja, ubrzava zgrušavanje krvi, poboljšava imunološki status organizma i tako štiti od infekcija. Kao biokatalizator i antioksidans javlja se u gotovo svim plodovima. Nakon branja voća i povrća i posle termičke obrade namirnica, sadržaj vitamina C brzo opada, a ako se hrana čuva u nepovoljnim uslovima vitamin C se može čak i potpuno uništiti. Od načina pripremanja hrane (temperature kojoj je namirnica izložena i vreme tretiranja), takođe zavisi sadržaj vitamina C.

Raznim eksperimentima je potvrđeno da slobodni radikali mogu da učestvuju u izazivanju i razvoju preko 100 bolesti ljudi i životinja. Osnovno sredstvo borbe protiv slobodnih radikala su antioksidansi, a vitamin C ima upravo tu osobinu. Stoga se sve intenzivnije sprovode ispitivanja

*Miloš Micić (1982),
Kragujevac, Josifa
Šnerzona 6/II-19,
učenik 2. razreda
Prve kragujevačke
gimnazije*

*MENTOR:
prof. dr Aleksandar
Teodorović, profesor
PMF-a u Kragujevcu*

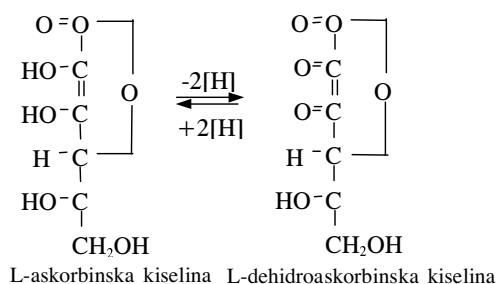
različitih faktora koji mogu uticati na stabilnost askorbinske kiseline. Poznato je da je vitamin C termolabilan i da njegova stabilnost varira od sredine u kojoj se nalazi.

Cilj ovog rada je ispitivanje termičke stabilnosti vitamina C u dve vrste jabuka (*Ililjače i Delišešes*) koje su uzete za ispitivanje zbog česte upotrebe u ishrani. Praćena je promena koncentracije α -askorbinske kiseline u funkciji vremena na različitim temperaturama (51°C, 65°C i 80°C) u rastvoru α -askorbinske kiseline i delovima ploda jabuke (kora i srž).

α -askorbinska kiselina

Postoji više biološki aktivnih askorbinskih kiselina. Njihovo biološko dejstvo uzrokovano je prisustvom endiolne grupe od koje potiče velika redukciona moć i biohemijско dejstvo askorbinske kiseline, kao i od konfiguracije na četvrtom C atomu i broja C atoma. Najveću biološku aktivnost pokazuje α -askorbinska kiselina (100%), zatim 6-dezoksi- α -askorbinska kiselina (33%), pa α -ramnoaskorbinska kiselina (20%) itd. Vitaminsku aktivnost ima i prvi oksidacioni proizvod α -askorbinske kiseline – α -dehidroaskorbinska kiselina, dok neki oblici askorbinske kiseline, kao na primer: D-glukoaskorbinska kiselina, D-galaktoaskorbinska kiselina nemaju biološko dejstvo (Ribić-Zelenović 1998).

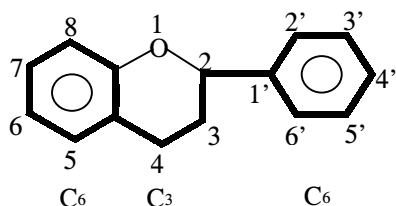
Ustanovljeno je da u normalnim uslovima, u prirodnom biljnom materijalu preovlađuje α -askorbinska kiselina (oko 95%), dok se dehidroaskorbinska kiselina javlja u malim količinama (oko 5%). Nosilac vitaminske aktivnosti u prirodnom materijalu je sistem



koji može učestvovati kao intermedijerni prenosni sistem vodonikovih atoma i elektrona u oksido-redukcijskim procesima u živoj ćeliji biljnih i animalnih tkiva.

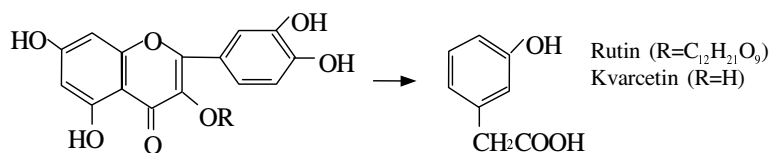
Szent-Györgyi i Rusznyak su ustanovili 1936. godine da se aktivnost askorbinske kiseline (oksidoredukcija) odvija uz učešće nekog predstavnika grupe vitamina P (Džamić 1973). Pod vitaminom P podrazumeva

se grupa jedinjenja biljnih pigmenata koji se nalaze u proizvodima ishrane. To su flavonoidi tipa katehina, flavona i flavonola, koji se nalaze u biljnim tkivima zajedno sa askorbinskom kiselinom. Njihovi molekuli poseduju više hidroksilnih i karbonilnih grupa preko kojih mogu da učestvuju u enzimskim procesima oksido-redukcije. U biljnom svetu je prisutno više stotina raznih tipova flavonoida, koji se nalaze u obliku svojih aglikona, a koje karakteriše molekulsko grupisanje tipa C₆-C₃-C₆:



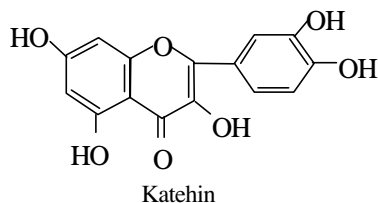
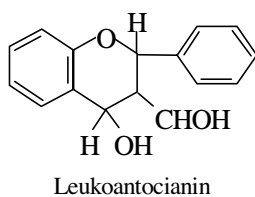
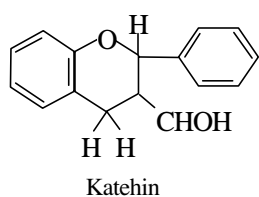
Sposobnost ove grupe vitamina da sačuva α -askorbinsku kiselinu od oksidacije, kao i njihova uzajamna veza dokazana je mnogim istraživanjima. Tako na primer, Vitamini C i P zajedno poseduju mnogo viši terapijski efekat nego pojedinačno i pri tome obrazuju dvostruku kariku u odgovarajućem sistemu u kome učestvuju u oksido-redukciji. Pokazano je da askorbigen predstavlja kompleks vitamina C sa polifenolima (Filipovich 1985).

Pri razjašnjavanju uticaja bioflavonoida (čajnih katehina i rutina) na stabilnost α -askorbinske kiseline u organizmu životinja, u uslovima delovanja visokih i niskih temperatura, pokazalo se da katehini sprečavaju sniženje koncentracije askorbinske kiseline u jetri i nadbubrežnim žlezdama. Smatra se da flavonoidi sprečavaju ireverzibilno razlaganje α -dehidroaskorbinske kiseline, kao i da su oni sposobni da pri pregrevanju organizma obrazuju α -askorbinsku kiselinu iz dehidroaskorbinske kiseline i na taj način omoguće ponovno uključivanje vitamina C u redoks-sisteme i redoks-tokove (Džamić 1973). Na primeru rutina, jednog od veoma rasprostranjenih bioflavonoida, pokušaćemo da objasnimo ovu pojavu. Njegova šematska razgradnja u organizmu izgleda:



U hemijskom pogledu, rutin je glikozid koji se sastoji iz kvarcetina i glukoramnoze. Pri otcepljenju njegovog saharoznog ostatka, obrazuje se rutinov aglikon kvarcetin. Udaljavanjem heterocikličnog prstena kvarcetin prelazi u aromatičnu kiselinu koja sadrži dve OH grupe fenolnog tipa (Harborne 1968). Pretpostavlja se da one imaju ulogu da predaju atome vodonika dehidroaskorbinskoj kiselini i na taj način je prevode u α -askorbinsku kiselinu..

Prisustvo bioflavonoida u jabukama je dokazao L.I. Vigorov 1968 i to: leukoantociana 4.5-6.0 mg/mL, katehina 1.0-1.5 mg/mL, a kvarcetina ima oko 0.6 mg/mL (Džamić 1989). Orto-položaj hidroksilnih grupa u bočnom aromatičnom prstenu na C-3 i C-4 pojačava, prema J. Fragneru i J. Davidenu (1964) antioksidujuće dejstvo flavonoida, dok ista grupa na položaju C-5 i C-7 ima za posledicu smanjenje antioksidantnog dejstva:



Materijal i metode

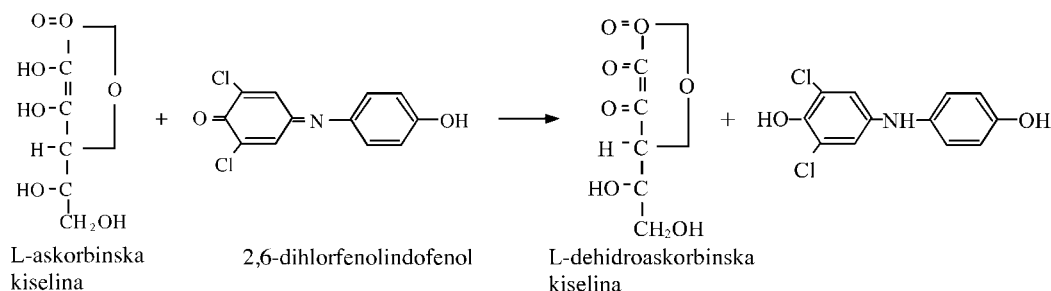
Uzorci 5.678×10^{-3} M rastvora α -askorbinske kiseline i sokova koji su pripremani od kora i pulpi svežih plodova jabuka roda 1999. godine, sa područja Šumadije izlagani su konstantnim temperaturama. Korišćene su crvene (*Delišes*) i zrele zelene (*Ililjače*) jabuke.

Priprema soka kore i pulpe jabuka

Kora je odvojena metalnim nožem. Sok je pripremljen tako što je uzorak preliven mineralnom vodom dvostruke mase jer je rastvor α -askorbinske kiseline stabilan u odsustvu kiseonika u atmosferi ugljenik-IV-oksida, N_2 ili H_2S (Džamić 1973), a zatim mešan i proceden. Ovako dobijeni ekstrakti kora i pulpi zelenih i crvenih jabuka izlagani su konstantnim temperaturama od $51^\circ C$, $65^\circ C$ i $80^\circ C$ maksimalno 4.5 časa, a alikvoti za analizu su određivani posle 30, 60, 120 minuta itd. Uporedo, standardni rastvor α -askorbinske kiseline takođe je izlagan dejstvu pomenutih temperatura.

Određivanje α -askorbinske kiseline u vodenom rastvoru – postupak po J. Tillmans-u (Trajković *et al.* 1983)

Određivanje sadržaja askorbinske kiseline titracijom 2,6-dihlorfenolindofenolom (Tillmans-ov reagens – TR) zasniva se na oksidaciji α -askorbinske kiseline u α -dehidroaskorbinsku kiselinu, 2,6-dihlorfenolindofenolom:



U alikvot od 1 mL rastvora askorbinske kiseline je dodato 2.5 mL rastvora smeše kiselina CH_3COOH i HPO_3 . Titracija se izvodi rastvorom Tillmans-ovog reagensa određenog titra u kiseloj sredini, pri čemu se mora voditi računa o pH vrednosti. Titracija se izvodi na pH 4-6. TR služi kao indikator. Pri reakciji nastaje bezbojno jedinjenje, a višak rastvora TR (plave boje) u kiseloj sredini prelazi u crvenkastu boju. Uporedo sa glavnom probom vrši se i slepa proba. Utrošak TR za slepu probu se oduzima od utroška TR za glavnu probu. Zbog veće tačnosti, za svaku vrednost koncentracije vitamina C su izvedena po dva merenja.

Određivanje α -askorbinske kiseline u sokovima jabuke

Promena boje inikatora nije lako uočljiva pri analizi obojenih uzoraka. Dodatkom di-etil-etra ovaj problem se prevazilazi pošto etarski sloj (gornji) ekstrahuje TR, a ne ekstrahuje crvenu boju jabuke.

Napomena: Pri ovim merenjima određivana je samo koncentracija α -askorbinske kiseline, s obrzirom na pretpostavku da se u biljnom materijalu α -dehidroaskorbinska kiselina nalazi u veoma malim količinama (0-5%), tj. prevladuje α -askorbinska kiselina (95-100%).

Rezultati i diskusija

Dobijene vrednosti za početne koncentracije α -askorbinske kiseline i relativne brzine reakcije razlaganja vitamina na 51°C u odnosu na čist uzorak (100%) prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Početne koncentracije α -askorbinske kiseline u uzorcima neposredno pre termičkog tretiranja i odnos brzina reakcije razlaganja vitamina na 51°C u odnosu na čist uzorak (100%)

Uzorak	Masa vitamina u 100 g svežeg uzorka [mg]	Relativna brzina razlaganja [%]
Crvena kora	0.513	88
Zelena kora	0.486	54
Crvena pulpa	0.363	42
Zelena pulpa	0.174	12

Iz ove tabele se vidi da je koncentracija α -askorbinske kiseline veća u kori nego u pulpi. Takođe se primećuje da kore i pulpe crveno obojenih jabuka imaju veći sadržaj vitamina C nego što je to slučaj kod zelenih.

Rezultati ispitivanja promene koncentracije vitamina C u odnosu na vreme pri konstantnim temperaturama od 51°C, 65°C i 80°C prikazani su na slici 1. Na apscisama se nalazi vreme u minutima, a na ordinatama procenat α -askorbinske kiseline koji je ostao u uzorku. T je oznaka za rastvor čistog vitamina C čiji je pH 2.85; ZP i ZK su oznake za pulpu i koru zrele zelene jabuke čiji je pH 4.6 i 4.2, respektivno, a CP i CK su pulpa i kora crvene jabuke sa pH vrednostima 6.1 i 6.4, respektivno. Brojevi pored ovih oznaka na slikama označavaju temperature kojima su uzorci izlagani.

Kako je za uzorak čistog vitamina C na sve tri temperature dobijena linearna zavisnost između $\ln c$ i vremena, gde je sa c označena koncentracija α -askorbinske kiseline, može se zaključiti da razgradnja vitamina C u ovim uzorcima prati kinetiku reakcije prvog reda u odnosu na vitamin C.

Na isti način je uočeno da razgradnja α -askorbinske kiseline u svim ispitivanim uzorcima na 51°C prati kinetiku reakcije prvog reda u odnosu na vitamin C. Pokazano je da na temperaturama 65°C i 80°C reakcija razgradnje α -askorbinske kiseline nije reakcija prvog reda u odnosu na vitamin C. Na taj način može se pretpostaviti da se mehanizam razgradnje α -askorbinske kiseline menja između 51°C i 65°C. Brzina razgradnje vitamina C na 51°C se može predstaviti na sledeći način:

$$\frac{d c}{d t} = -k c$$

Poređenjem dobijenih vrednosti za k u različitim uzorcima može se zaključiti da je brzina razgradnje najveća u čistom rastvoru α -askorbinske kiseline. U tabeli 1 su prikazane konstante brzina razgradnje vitamina C u različitim uzorcima u odnosu na konstantu brzine razgradnje vitamina C u rastvoru čistog vitamina C sračunato u procentima.

Slika 1 (naspramna strana).

Grafici promene količine

α -askorbinske kiseline u vodenom rastvoru, pulpi i kori crvenih i zelenih jabuka u funkciji vremena.

Figure 1 (opposite page).

The change of α -ascorbic acid amount in pure water (T), in kernel (CP) and bark (CK) of red apples, and in kernel (ZP) and bark (ZK) of green apples as the function of time.

Najmanji gubitak α -askorbinske kiseline je kod crvene kore, dok je najviše vitamina razoreno u čistom uzorku vitamina C. Ovi rezultati važe za sve posmatrane temperature.

Odatle se vidi da je α -askorbinska kiselina najpostojanija u kori crvenih jabuka. Može se pretpostaviti da supstance koje su nosioci boje (bioflavonoidi) ujedno i štite vitamin C od raspadanja. Pretpostavlja se da se u uzorcima jabuke na 51°C odigrava reakcija redukovanja α -dehidroaskorbinske kiseline u α -askorbinsku kiselinu pomoću bioflavonoida, čije hidroksilne grupe predaju vodonikove atome i na taj način regenerišu vitamin C. Međutim, na višim temperaturama je brzina raspadanja α -askorbinske kiseline veća, pa se bioflavonoidi prevode u oblik pogodniji za bržu

redukciju α -dehidroaskorbinske kiseline, a to je aromatična kiselina, koja je produkt raspadanja kvarcetina na višim temperaturama. Sa povećanjem temperature raste broj molekula koji se prevode u aromatičnu kiselinu, a samim tim opada broj molekula bioflavonoida koji učestvuju u regeneraciji vitamina C. Na temperaturi oko 65°C koncentracija vitamina C u jabuci opada približno istom brzinom kao u rastvoru čiste α -askorbinske kiseline, jer nema bioflavonoida koji učestvuju u obnavljanju α -askorbinske kiseline. Na nešto višoj temperaturi počinju da se pojavljuju aktivniji oblici bioflavonoida i oni se obrazuju samo u onoj količini koja je dovoljna da bi se regenerisala α -askorbinska kiselina koja je oksidovala neposredno nakon pojave prvog molekula ove vrste, tj. brzina razgradnje vitamina C se na svakoj sledećoj temperaturi povećava za istu vrednost za koji se povećala brzina stvaranja aromatične kiseline iz bioflavonoida. Na ovaj način se može naći odgovor na pitanje zašto koncentracije vitamina C na 65°C i 80°C opadaju približno istom brzinom.

Sa grafika se takođe vidi da je vitamin C u pulpi crvene jabuke nestabilan što se može objasniti visokom pH vrednošću 6.1, a poznato je da je vitamin C najstabilniji pri pH vrednostima oko 4 (Trajković *et al.* 1983).

Zaključak

Pokazano je da je termička stabilnost α -askorbinske kiseline u crvenoj kori jabuka znatno veća nego u neobojenim delovima. To se može objasniti zaštitnim dejstvom onih supstanci koje daju boju jabuci, odnosno koje se nalaze u kori jabuka.

Utvrđeno je da je razgradnja vitamina C u jabukama na temperaturi od 51°C reakcija prvog reda, dok se između 51°C i 65°C menja mehanizam reakcije što navodi na pretpostavku da supstance koje utiču na stabilnost vitamina C kod jabuka imaju značajnu ulogu u regulaciji koncentracije vitamina C i svojim delovanjem menjaju mehanizam reakcije.

Askorbinska kiselina je takođe stabilnija u zelenim jabukama sa pH vrednošću oko 4 nego u srži crvene jabuke (pH = 6.1). Ovo je u saglasnosti sa teorijskim tvrđenjem o stabilnosti vitamina C na različitim pH vrednostima. Uz to, crvena pulpa nema pigmente kao kora, a brzina razgradnje α -askorbinske kiseline je u njoj veća. Odavde se još jednom može zaključiti da postoji povezanost supstanci koje su nosioci pigmenta u jabuci, a to su bioflavonoidi, sa stabilnošću vitamina C u njima.

Radi dobijanja jasnije slike o uticaju temperature na stabilnost vitamina C u prisustvu bioflavonoida, bilo bi korisno ponoviti istraživanja za uzorke sa sličnim pH vrednostima. Na taj način bi uslovi za razgradnju bioflavonoida do aktivnijeg oblika (fenol-sirćetna kiselina) bili identični. Pored toga, time bi se mogao dati veći značaj praktičnom aspektu istraživanja.

Literatura

- Damanski A. 1951. *Bromatologija II* (praktični i analitički deo). Beograd: Naučna knjiga
- Džamić M. 1973. *Osnovi biohemije*, I deo. Beograd: BIGZ
- Džamić M. 1989. *Praktikum iz biohemije*. Beograd: Naučna knjiga
- Filippovich Yu.V. 1985. *Osnoviya biokhimii*. Moskva: Vysshaya shkola
- Koraćević D., Bjelaković G. 1996. *Biohemija*. Beograd: Savremena administracija
- Ljubisavljević M. 1990. *Životne namirnice – priručnik za proizvođače, trgovinu i inspekcije*. Beograd: Privredni pregled
- Ribić-Zelenović L. 1998. *Askorbinska kiselina – struktura – fiziološka aktivnost*. Čačak: Agronomski fakultet
- Roberts C.J. Jr., Hollenberg J.L. Postma M.J. 1991. *General chemistry in the laboratory*, (third edition). Freeman
- Smirnov I. 1974. *Vitaminy*. Moskva: Medicina
- Trajković J. Mirić M., Baraš J., Šiler S. 1983. *Analize životnih namirnica*. Beograd: Tehnološko–metalurški fakultet
- Veljković S. 1969. *Hemijska kinetika*. Beograd: Građevinska knjiga

Miloš Micić

Determination of Thermal Stability of Vitamin C in Apples

Thermal stability of vitamin C was determined in two species of apples: red *Delišes* and green, *Ilinjače*. Concentration of vitamin C was measured as the function of time at three different temperatures: 51°C, 65°C and 80°C. There were five samples: water solution of α -ascorbic acid, as the standard, and bark and kernel of the apples. The concentration of α -ascorbic acid was determined by the method of J. Tillmans (Trajković *et al.* 1983).

It is shown that the thermal stability of α -ascorbic acid is appreciably higher in red bark than in uncolored components. This can be explained by preserving influence of those substances that give color to the apple on vitamin C stability like those present in apple bark.

The decomposition of vitamin C in apples on 51°C is a first order reaction, while the reaction mechanism changes between 51°C and 65°C. These facts are in accordance with the hypothesis that apple pigments have an important role in controlling vitamin C concentration. They also change the mechanism of decomposition of vitamin C.

Ascorbic acid is more stable in the kernel of green apples with pH value about 4 than in kernels of red apples (pH = 6.1). This is in accordance with a theoretical proposition about the stability of vitamin C on different pH values (the most stable is on pH value 4). Besides, red kernel doesn't have pigments as bark, and alpha-ascorbic acid decomposition rate is higher in red kernel than in bark. From this, it can be once again concluded that there is some coordination between vitamin C stability in apples, and those substances that are carrying color in apples, i.e. bioflavonoids.

In order to clarify ideas about the thermal stability of vitamin C in bioflavonoid environment, it could be useful to repeat the search for samples with the same pH values. In this way the conditions for bioflavonoid destruction to more active form (phenol-acetic acid) would be the same.

