

POLITECHNIKA RZESZOWSKA
im. Ignacego Łukasiewicza
WYDZIAŁ CHEMICZNY
**Zakład Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej**

OZNACZENIE WITAMINY C W SOKACH

Opracowanie:
inż. Ewa Iskra
dr inż. Anna Kuźniar
mgr inż. Elżbieta Pieniążek
dr Elżbieta Woźnicka

Spis treści

Literatura.....	2
1. Wstęp [1].....	3
2. Część teoretyczna	3
2.1. Ogólna charakterystyka witamin [2-5].....	3
2.1.1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach.....	4
2.1.2. Witaminy rozpuszczalne w wodzie	7
2.2. Metody oznaczania witaminy C.....	15
2.2.1. Metody fizykochemiczne.....	15
2.2.2. Metody chemiczne	16
3. Część doświadczalna.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
3.1. Odczynniki i aparatura.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
3.2. Oznaczanie witaminy C z wykorzystaniem metody miareczkowania jodometrycznego. Błąd!	Nie zdefiniowano zakładki.
3.2.1. Nastawianie miana roztworu jodu w jodku potasu	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
3.2.2. Redoksymetryczne oznaczenia zawartości witaminy C w soku owocowym	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
3.3. Wykonanie oznaczenia zawartości witaminy C w soku metodą Tillmansa	18
3.3.1. Oznaczenie miana 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu.....	18
3.3.2. Oznaczenia zawartości witaminy C w soku metodą Tillmansa.....	19

Literatura

- [1] <http://www.nutrivitality.pl/witaminy/witamina-c.html>
- [2] Praca zbiorowa pod redakcją prof. dr. hab. Jana Gawęckiego, Witaminy, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2002.
- [3] Praca zbiorowa pod redakcją Zdzisława E. Sikorskiego, Chemia żywności, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 1994.
- [4] Harold A. Harpen Victor W. Rodwell, Peter A. Mayes i współautorzy, Zarys chemii fizjologicznej, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983.
- [5] Praca zbiorowa pod redakcją Włodzimierza Graja, Przeciwoxidacze w żywności, Aspekty zdrowotne technologiczne molekularne i analityczne, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 2007.
- [6] Jolanta Pierzynowska, Aneta Prętka, Małgorzata Drywień, Kinga Ostrowska: Porównanie zawartości witaminy C w wybranych, świeżych i fermentowanych sokach warzywnych, BROMAT. CHEM. TOKSYKOL. 4, 341-344 (2007).
- [7] Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych z analizy żywności, Ćwiczenie nr 7, Pracownia studencka Katedry Analizy Środowiska, Oznaczanie zawartości witaminy C w soku z kiszzonej kapusty i soku z cytryny metodą miareczkową, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Gdańsk 2008.
- [8] Vortal młodego chemika, vmc.org.pl.

[9] Kazimierz Zalewski, Elżbieta Kostyra i in., Ćwiczenia z biochemii, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2003.

1. Wstęp [1]

Historia witaminy C jest związana z dziejami narodów Europy. Gnilec (szkorbut) znali już Wikingowie i zwalczali go za pomocą spożywania cebuli. W końcu XV wieku Vasco da Gama, podczas swej podróży dookoła Przylądka Dobrej Nadziei stracił 2/3 swojej załogi z powodu gnilca. W miarę rozwoju żeglugi dalekomorskiej masowe zachorowania na skorbut na statkach zdarzały się coraz częściej, gdyż do wyżywienia załóg używano głównie takich artykułów, które zajmowały mało miejsca i miały dużą wartość energetyczną, a więc przede wszystkim przetwory zbożowe, konserwowane mięso, tłuszcze, czyli produkty nie zawierające witaminy C. Gnilec występował również wśród ludności cywilnej, szczególnie w okresach wojen i klęsk żywiołowych. Nękał on też pierwszych kolonizatorów Ameryki Północnej. Wielu z nich uratowało się przed tą chorobą stosując, wzorem Indian, wyciągi z igieł sosny. Ponadto, w miarę wzrostu spożycia produktów konserwowanych, choroba ta zaczęła pojawiać się częściej niż przedtem, także wśród osób dorosłych szczególnie w wielkich miastach, w których system aprowizacyjny nie mógł sprostać stojącym przed nim zadaniom. Biorąc pod uwagę sposób odżywiania się ludności na przestrzeni kilku ubiegłych stuleci należy przypuszczać, że obok opisywanych ostrych niedoborów witaminy C rozpowszechnienie utajonego gnilca musiało być bardzo częste.

W 1928 roku Szent-György wyodrębnił kwas heksuronowy z soku pomarańcz, kapusty i z nadnerczy. W tym samym roku Waugh i King wykazali, że kwas ten jest identyczny z czynnikiem przeciwgnilcowym- witaminą C, wyizolowanym z soku z cytryn. W 1833 r. Haworth ustalił budowę chemiczną tego związku, a Reichstein w tym samym roku dokonał syntezy.

Witaminy są katalizatorami ogólnych lub swoistych reakcji biochemicznych, są niezbędne do wzrostu i podtrzymania funkcji życiowych organizmów. Wzmacniają odporność, dodają sił, energii, mają korzystny wpływ na wygląd. Ich brak w pożywieniu objawia się przede wszystkim zahamowaniem wzrostu, zmianami w oczach, skórze, nabłonku, układzie nerwowym itp. Długotrwały brak witamin w pożywieniu prowadzi do poważnych schorzeń kończących się niekiedy śmiercią. Zawartość witamin w surowcach i produktach żywnościowych jest więc jednym z głównych wskaźników ich jakości oraz prawidłowości stosowanych zabiegów technologicznych. Większość witamin to substancje bardzo wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych, dlatego ich straty bywają stosunkowo duże. Analiza składników odżywczych jest ważnym zagadnieniem w związku z dostarczaniem do organizmu człowieka niezbędnych ilości potrzebnych składników odżywczych koniecznych do prawidłowego funkcjonowania i rozwoju organizmu ludzkiego.

Celem ćwiczenia jest wykorzystanie miareczkowych metod oznaczania witaminy C do oceny zawartości tego składnika w sokach owocowych.

Zakres ćwiczenia:

1. Zapoznanie się z literaturą dotyczącą ogólnej charakterystyki witamin oraz metod oznaczania witaminy C.
2. Oznaczenie kwasu askorbinowego w sokach pomarańczowych pochodzących od różnych producentów metodą miareczkowania jodometrycznego i metodą Tillmansa.
3. Porównanie zawartości witaminy C oznaczonej z deklarowaną na opakowaniach produktów.

2. Część teoretyczna

2.1. Ogólna charakterystyka witamin [2-5]

Odkrycie witamin nastąpiło na przełomie XIX i XX wieku. Termin „witamina” wprowadził w 1911 roku polski badacz Kazimierz Funk, który stwierdził, że wyodrębniona przez niego z otrąb ryżowych substancja przywracająca zdrowie chorym na porażenie wielonerwowe jest pod względem chemicznym aminą.

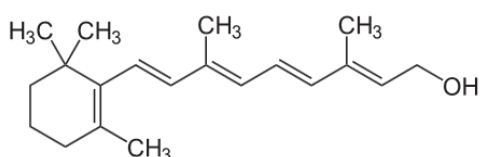
Witaminy są to małowcząsteczkowe związki organiczne o różnorodnej budowie chemicznej rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Nie są one jednak ani źródłem energii, ani materiałem budulcowym; spełniają jednak w komórkach i tkankach funkcje regulacyjne, które decydują o rozwoju, stanie zdrowia i wydajności fizycznej organizmów. Dla człowieka są to związki egzogenne i muszą być dostarczane z pożywieniem. Witaminy mają bardzo zróżnicowaną strukturę, dlatego też trudno ich sklasyfikować wg budowy chemicznej. Zostały więc podzielone na rozpuszczalne w tłuszczach i rozpuszczalne w wodzie.

Źródłem witamin w przyrodzie są głównie rośliny, a w mniejszej ilości mikroorganizmy. Duże znaczenie w zaspokajaniu zapotrzebowania ludzi i zwierząt na witaminy odgrywa mikroflora przewodu pokarmowego.

Witaminy są produkowane metodami syntezy chemicznej oraz w małym stopniu metodami biotechnologicznymi.

2.1.1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

Witamina A – zbiorcza nazwa organicznych związków chemicznych z grupy retinoidów (z których najważniejszy jest retinol), pełniących w organizmie funkcję niezbędnego składnika pokarmowego, rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy. Witamina A została odkryta w tranie w roku 1913 przez amerykańskich badaczy, Elmera McColluma i Marguerite Davis, zaś nazwę "witamina A" nadano jej w latach 20. XX wieku. W pożywieniu pochodzenia zwierzęcego, podstawową formą w jakiej występuje witamina A jest ester – palmitynian retinolu, który w jelicie cienkim ulega deestryfikacji do alkoholu – retinolu. Inne ważne pochodne związane z aktywnością witaminy A to: retinal (aldehyd) i kwas retinowy (tretynoina).



Rys. 1. Wzór strukturalny retinolu.

Źródłem witaminy A są zarówno produkty pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. W produktach zwierzęcych występuje ona w postaci retinolu i jego pochodnych, natomiast w roślinnych w postaci karotenoidów (prowitaminy A). Najważniejszym źródłem retinolu są podroby, ryby, jaja, masło, wzbogacane margaryny oraz sery dojrzewające.

Ważnym z punktu widzenia żywieniowego źródłem karotenoidów są warzywa, szczególnie zielone części roślin, gdyż karotenoidy towarzyszą zielonemu barwnikowi- chlorofilowi. Bogatym źródłem prowitaminy A jest marchew, sałata, zielony groszek, brokuły, brukselka.

Tabela. 1. Źródła witaminy A w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Zawartość w 100 g lub ml produktu	µg
Tran	18000
Wątróbka drobiowa	9700
Wątroba wołowa	7280
Wątroba wieprzowa	3090
Olej z wątroby dorsza	1800
Masło śmietankowe	887
Żółtka jaj	770
Śmietana 18 %	150

Ważnym z punktu widzenia żywieniowego źródłem karotenoidów są warzywa, szczególnie zielone części roślin, gdyż karotenoidy towarzyszą zielonemu barwnikowi - chlorofilowi. Bogatym źródłem prowitaminy A jest marchew, sałata, zielony groszek, brokuły, brukselka.

Tabela. 2. Źródła karotenów w żywności.

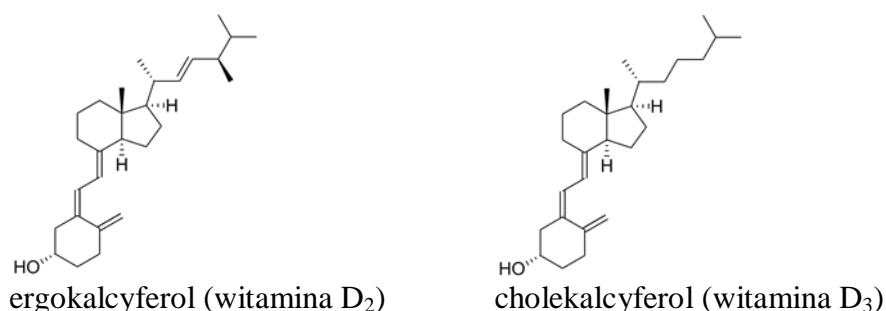
Zawartość w 100 g lub ml produktu	µg
Marchew	1650
Natka pietruszki	990
Szpinak	707
Dynia	472
Mango	300
Morele	231
Koperek	209
Sałata	144
Pomidor	123

Witamina A spełnia wiele ważnych fizjologicznych funkcji:

- odgrywa istotną rolę w odbieraniu bodźców wzrokowych w siatkówce oka,
- odpowiada za integralność błon komórkowych,
- odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie komórek tkanki nabłonkowej, zarówno pokrywających jak wydzielniczych i czuciowych,
- reguluje wzrost tkanki nabłonkowej i innych komórek organizmu,
- utrzymuje prawidłowy stan skóry, włosów i paznokci,
- zapewnia normalny wzrost kości i zębów przez regulację aktywności komórek tkanki kostnej,
- chroni nabłonek układu oddechowego przed drobnoustrojami.

Witamina D – grupa rozpuszczalnych w tłuszczach steroidowych organicznych związków chemicznych, które wywierają wielostronne działanie fizjologiczne, przede wszystkim w gospodarce wapniowo-fosforanowej oraz utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji kośćca. Podstawowe znaczenie mają dwie formy witaminy D, różniące się budową łańcucha bocznego:

- ergokalcyferol (witamina D₂), naturalnie występujący w organizmach roślinnych/drożdżach,
- cholekalcyferol (witamina D₃), naturalnie występujący w organizmach zwierzęcych.



Rys. 2. Wzory strukturalne witamin D₂ i D₃.

Witamina D jest odporna na działanie podwyższonej temperatury i nie zmienia się w czasie długotrwałego przechowywania. Jest również trwała w środowisku zasadowym, natomiast jest wrażliwa na działanie kwasów. Pod wpływem silnego promieniowania UV ulega zniszczeniu. Roztwory tłuszczu

stabilizują witaminę D, w środowisku beztłuszczowym w obecności tlenu witamina D łatwo ulega autooksydacji.

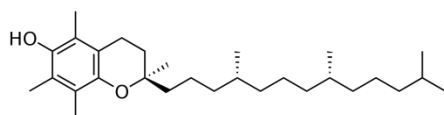
Zasadniczą funkcją witaminy D jest zwiększenie wchłaniania wapnia i fosforanów z jelita. Witamina D ma również bezpośredni wpływ na proces zwapniania kości. Niedobór tej witaminy wywołuje u dzieci krzywicę, a u dorosłych rozmięczenie kości, porowatość i kruchość układu kostnego. W przypadku jej przedawkowania może dojść do zatrucia. Przy odpowiednim nasłonecznieniu ilość witaminy D, która jest wytwarzana w skórze, jest na tyle wystarczająca, że nie trzeba czerpać jej dodatkowo ze źródeł pokarmowych (nie jest więc do końca witaminą). Ilość wytwarzanej witaminy D u ludzi podlega wahaniom sezonowym i zazwyczaj spada, im dalej na północ lub południe od strefy okołorównikowej teren jest położony. W strefie klimatu umiarkowanego ilość światła słonecznego dostarczana przez około połowę roku jest za mała, aby skóra człowieka mogła sama wytworzyć dostateczną ilość tej witaminy

Witamina D jest zawarta w nielicznych produktach żywnościowych, głównie pochodzenia zwierzęcego. Najbogatszym źródłem witaminy D są oleje z wątrób niektórych ryb. Mniejsze ilości znajdują się w mleku, jajach, wątrobie wołowej i wieprzowej. Produkty roślinne, poza produktami wzbogaconymi w tę witaminę, na ogół nie zawierają witaminy D.

Tabela. 3. Źródła witaminy D w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Zawartość w 100 g lub ml produktu	µg
Tran (2 łyżeczki)	242
Sledź	25
Makrela	24
Łosoś	12
Tuńczyk	6
Mleko	3
Mąka pełnoziarnista	3
Żółtko	1

Witamina E – grupa organicznych związków chemicznych, w skład której wchodzi **tokoferole** i **tokotrienole**. Stwierdzono występowanie w przyrodzie co najmniej 8 związków należących do tych dwóch grup. Ich wspólną cechą jest dwupierścieniowy szkielet 6-chromanolu oraz łańcuch boczny zbudowany z 3 jednostek izoprenowych. Tokoferole i tokotrienole są w temperaturze pokojowej substancjami olejowymi, nierozpuszczalnymi w wodzie, odpornymi na działanie kwasów i zasad. W środowisku beztlenowym są odporne na działanie wysokiej temperatury, nawet do 200 °C.

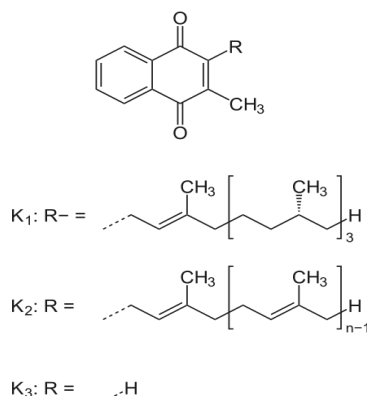


Rys. 3. Wzór strukturalny α -tokoferolu.

Witamina E jest antyoksydantem, który chroni komórki przed utleniaczami. Bierze udział w dostarczaniu składników odżywczych do komórek. Wzmacnia ścianę naczyń krwionośnych oraz chroni czerwone krwinki przed przedwczesnym rozpadem. Wykorzystywana jest też do leczenia męskiej niepłodności, zaburzeń mięśniowych, miażdżycy oraz chorób serca. Zapotrzebowanie człowieka wynosi 8–13 mg na dobę.

Bogatym źródłem tej witaminy są oleje roślinne, zwłaszcza oleje z kielków pszenicznych, olej słonecznikowy, sojowy i szafranowy. Do naturalnych źródeł witaminy E należą również: nasiona słonecznika, migdały, orzechy laskowe, orzeszki ziemne, pomidory, botwina, suszone morele, szpinak.

Witamina K- grupa związków chemicznych, będących pochodnymi 2-metylo-1,4-naftochinonu. Naturalnie występujące witaminy K mają w położeniu 3 długi węglowodorowy łańcuch boczny fitolowy lub poliprenylowy. Do grupy tej j należą: witamina K1 (filochinon), witamina K2 (menachinon), witamina K3 (menadion), rys 4.



Rys. 4. Struktura chemiczna K₁, K₂, K₃.

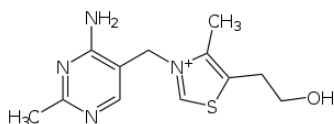
Filochinon w temperaturze pokojowej jest cieczą oleistą, nierozpuszczalną w wodzie. W temperaturze powyżej 100 °C ulega rozkładowi. Jest wrażliwy na światło, na promieniowanie UV oraz na działanie zasad i mocniejszych kwasów. Występuje głównie w produktach roślinnych. Menachinony są związkami krystalicznymi o temperaturze topnienia powyżej 35 °C, nierozpuszczalnymi w wodzie. Ich wrażliwość na światło, kwasy i zasady jest podobna do właściwości filochinonu. Pod działaniem substancji utleniających ulegają rozkładowi. Menachinony znajdują się głównie w tkankach zwierzęcych i drobnoustrojach. Menadion jest związkiem syntetycznym, wykazującym większą aktywność biologiczną niż witaminy naturalne, lepiej rozpuszcza się w wodzie i jest łatwiej przyswajany przez organizm.

Witamina K jest niezbędna organizmom zwierzęcym do tworzenia czynników zapewniających prawidłową krzepliwość krwi. Jej zasadniczą funkcją jest katalizowanie syntezy protrombiny przez wątrobę. Niedobór witamin K jest przyczyną choroby krwotocznej noworodków, której zapobiega się podawaniem witaminy K.

Zasadniczym źródłem tej witaminy są zwłaszcza zielone liście roślin, a jej ilość jest proporcjonalna do zawartości w liściach chlorofilu. Największe ilości witaminy K koncentrują się w brokułach, jarmużu, sałacie, szpinaku, brukselce oraz zielonej herbacie. Jej ubogim źródłem są owoce, przetwory mleczne i mięso. Witaminę K można także wykryć we florze bakteryjnej przewodu pokarmowego, która wykazuje zdolność syntezy witaminy.

2.1.2. **Witaminy rozpuszczalne w wodzie**

Witamina B₁ (tiamina) – heterocykliczny związek chemiczny, złożony z pierścieni tiazolowego i pirymidynowego, połączonych mostkiem metinowym. Z uwagi na funkcję azotu w pierścieniu tiazolowym (forma amoniowa) cała cząsteczka przejawia charakter dodatni – soli tiazoliniowych.



Rys. 5. Wzór strukturalny tiaminy.

Tiamina jest stosunkowo termostabilna, zwłaszcza w środowisku kwaśnym. W środowisku zbliżonym do obojętnego lub w zasadowym ulega rozkładowi na pojedyncze układy pierścieniowe, tracąc aktywność biologiczną. Destrukcyjnie działa na nią również SO_2 . Straty witaminy podczas zabiegów kulinarnych i technologicznych są zatem najmniejsze w środowisku kwaśnym i przy ograniczonym dostępie tlenu.

Rozpuszczalna w wodzie, odgrywa zasadniczą rolę w procesach oddychania tkankowego, głównie w przemianie węglowodanów, jest częścią składową koenzymu karboksylazy (pirofosforanu tiaminy). Wzmaga czynność acetylocholiny, hamuje esterazę cholinową, działa synergicznie z tyroksyną i insuliną, pobudza wydzielanie hormonów gonadotropowych. Tiamina przyspiesza gojenie się ran i wykazuje działanie uśmierzające ból. Skutki niedoboru witaminy B_1 to zaburzenia czynności centralnego układu nerwowego: osłabienie, zmęczenie, oczopląs, zaburzenia pamięci, koncentracji, depresja. Silna awitaminoza witaminy B_1 prowadzi do choroby zwanej *beri-beri*. Objawami tej choroby są zaburzenia układu nerwowego i czynności serca.

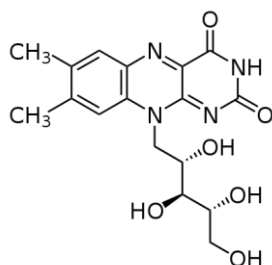
Dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę B_1 wynosi 1,1 mg dla kobiet i 1,2 mg dla mężczyzn.

Tiamina jest bardzo rozpowszechniona zarówno w tkankach roślinnych jak i zwierzęcych. Najobfitszym jej źródłem są nieoczyszczone ziarna zbóż, drożdże, chude mięso wieprzowe. Witamina B_1 bez trudności jest wchłaniana z jelita, jednakże nie może być magazynowana w organizmie ludzkim w większych ilościach. Jej nadmiar jest wydalany z moczem.

Tabela. 4. Źródła witaminy B_1 w żywności.

Zawartość w 100 g produktu	mg
Drożdże	4,1
Pestki słonecznika	1,95
Kiełki pszenicy	1,76
Groch – suche nasiona	0,77
Szynka wieprzowa	0,68
Kasza gryczana	0,58
Mąka pełnoziarnista	0,54
Wątroba	0,26
Chleb graham	0,24

Witamina B_2 - ryboflawina, organiczny związek chemiczny, połączenie rybitolu i flawiny, jest częścią składową wielu enzymów i występuje w tkankach prawie zawsze w formie związanej jako tzw. flawoproteina, tak więc organizm pobiera z pożywieniem na ogół flawoproteiny i fosforany flawinowe. Ryboflawina wchodzi w skład dwóch koenzymów: mononukleotydu flawinowego i dinukleotydu flawoadeninowego współdziałających z licznymi oksydoreduktazami



Rys. 6. Wzór strukturalny ryboflawiny.

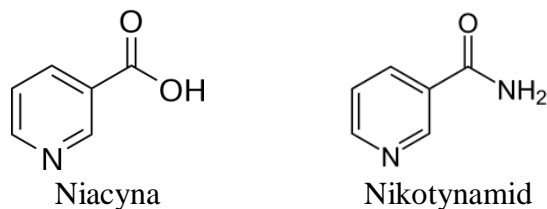
Ryboflawina jest obecna w żywności jest dość stabilna w normalnych warunkach, natomiast, podobnie jak w przypadku innych witamin rozpuszczalnych w wodzie, występują straty witaminy B₂ podczas procesu rozdrabniania i płukania. W środowisku kwaśnym jest bardziej stabilna niż w środowisku zasadowym. Pod wpływem światła ulega rozkładowi na związki nieaktywne biologicznie. Ryboflawina bierze udział w procesach utleniania i redukcji, współdziała w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, współuczestniczy z witaminą A w prawidłowym funkcjonowaniu błon śluzowych, dróg oddechowych, śluzówki przewodu pokarmowego, nabłonka naczyń krwionośnych i skóry, uczestniczy w przemianach aminokwasów i lipidów. Brak witaminy B₂ w organizmie człowieka objawia się opóźnieniem wzrostu, uszkodzeniem gałek ocznych i rogówki, pogorszeniem ostrości wzroku, światłowstrętem, łzawieniem, łatwym męczenie się oczu i okołorogówkowym wrastaniem naczyń, wypadaniem włosów, kłopotami z koncentracją, zawrotami głowy, bezsennością, zaburzeniem oddychania, obrzmieniem lub pękaniem błony śluzowej jamy ustnej, zapaleniem czerwieni warg, języka lub błon śluzowych, pleśniawkami, zajadami jamy ustnej, łojotokiem, chorobami układu nerwowego, łuszczącymi się zmiany skórne okolic nosa, ust, czoła i uszu.

Witamina B₂ występuje zarówno w świecie roślinnym jak i zwierzęcym, a szczególnie bogatym jej źródłem są beztlenowe bakterie fermentacyjne. Największe jej zawartości koncentrują się w mleku, wątrobie, nerkach, sercu oraz suchych nasionach roślin strączkowych. Dzielne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę B₂ wynosi od 1,5 do 3 mg.

Tabela. 5. Źródła witaminy B₂ w żywności.

Zawartość w 100 g produktu	mg
Drożdże	11,9
Wątroba wieprzowa	2,98
Migdały	0,78
Jajko	0,54
Ser twarogowy tłusty	0,45
Łosoś	0,37
Groch – suche nasiona	0,28
Szpinak	0,18

Witamina B₃/witamina PP – wspólna nazwa na określenie dwóch związków: kwasu nikotynowego (niacyny, czyli kwasu 3-pirydynokarboksyłowego, pochodnej pirydyny) i jego amidu (nikotynamidu), które dla człowieka są witaminą.

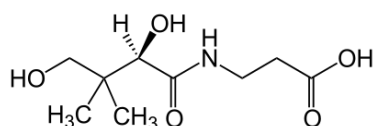


Rys. 7. Wzór strukturalny niacyny i nikotynamidu.

Zarówno kwas nikotynowy, jak i jego amid są równocenne pod względem aktywności biologicznej; każda z tych substancji może łatwo ulegać przemianie w drugą. Oba związki powstają w organizmie z tryptofanu. Witamina PP jest termostabilna i niewrażliwa na odczyn środowiska oraz utlenianie. Największe straty tych związków następują w wyniku rozdrabniania i wypłukiwania wodą. Witamina ta uczestniczy w regulacji poziomu cukru we krwi (produkcja związków energetycznych), regulacji poziomu cholesterolu, w procesach utleniania i redukcji w organizmie. Wpływa też na odpowiedni stan skóry, uczestniczy w regulacji przepływu krwi w naczyniach oraz współdziała w syntezie hormonów płciowych. Niedobór tej witaminy wywołuje biegunkę i majaczenia. Zalecane dzienne zapotrzebowanie niacyny to 2–12 mg/dzień dla dzieci, 14 mg/dzień dla kobiet, 16 mg/dzień dla mężczyzn oraz 17–18 mg/dzień dla kobiet w ciąży czy też karmiących.

Do bogatych źródeł witaminy PP należą: wątroba, mięso, ryby, niektóre jarzyny, ziarno zbóż, głównie w warstwach zewnętrznych oraz drożdże. Niacyna może powstawać w organizmie człowieka z tryptofanu; także produkty bogate w tryptofan zapobiegają niedoborowi witaminy PP.

Witamina B₅ (kwas pantotenowy) zbudowany jest z reszt kwasu 2,4-dihydroksy-3,3-dimetylo-masłowego i β-alaniny, połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym.



Rys. 8. Wzór strukturalny kwasu R-pantotenowego.

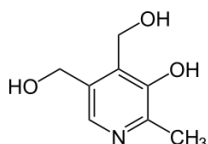
Kwas pantotenowy jest syntetyzowana przez florę jelitową, lecz brakuje danych o stopniu jej wykorzystania z tego źródła. W czasie gotowania straty tej witaminy mogą dochodzić do 50%, a do 80% w czasie przetwarzania produktów żywnościowych. Kwas pantotenowy należy do najbardziej wrażliwych na czynniki zewnętrzne spośród witamin z grupy B. Bardzo szybko ulega zniszczeniu pod wpływem promieni słonecznych.

Kwas pantotenowy jest głównym składnikiem koenzymu A, dlatego też jest niezbędny do prawidłowego metabolizmu białek, cukrów i tłuszczów oraz do syntezy niektórych hormonów, przyspiesza gojenie ran, warunkuje prawidłowy przebieg procesu uwalniania energii, zapobiega przemęczeniu i usprawnia układ sercowo-naczyniowy, nerwowy i pokarmowy, bierze udział w wytwarzaniu tłuszczów, cholesterolu, hormonów i przekazników nerwowych, uczestniczy w regeneracji tkanek, poprawia pigmentację i stan włosów.

Witamina B₅ jest znacznie rozpowszechniona w artykułach spożywczych, z tego względu nie obserwuje się u ludzi objawów wynikających z braku tej witaminy. Zalecane dzienne zapotrzebowanie to około 7 mg na dobę.

Do doskonałym źródłem pokarmowym tej witaminy są żółtka jaj, nerka, wątroba i drożdże. Pewne jej ilości można również zaobserwować w mleku i jego przetworach, grochu, brukselce oraz całych ziarnach zbóż.

Witamina B₆ – grupa 6 organicznych związków chemicznych, pochodnych pirydyny: pirydoksyny, pirydoksalu i pirydoksaminy oraz ich 5'-fosforanów. Formą aktywną biologicznie jest fosforan pirydoksalu, do którego pozostałe formy są przekształcane enzymatycznie, w wyniku działania kinaz i oksydaz.



Rys. 9. Wzór strukturalny pirydoksyny.

Witamina B₆ bierze udział w przemianie aminokwasów, ułatwia ich rozkład, przemianę tłuszczów i węglowodanów, umożliwia magazynowanie energii, uczestniczy w tworzeniu enzymów, hormonów, hemoglobiny, uczestniczy w powstawaniu prostaglandyn, ma wpływ na ciśnienie krwi, skurcze mięśni, pracę serca, prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego, zwiększa odporność organizmu, łagodzi skutki uboczne leków, wspomaga leczenie nerek, zmniejsza nadmierne wydalanie kwasu szczawowego z moczem, zapobiega tworzeniu się kamieni nerkowych, pomaga zwalczać ból i zeszywnienia nadgarstka i dłoni. Odnotowano korzystny wpływ połączenia magnez + witamina B₆ na zachowanie dzieci z autyzmem.

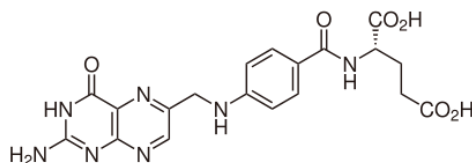
Niedobór witaminy B₆ może wywoływać objawy ze strony układu nerwowego, takie jak: drgawki, depresja, apatia, bezsenność, ogólne pogorszenie samopoczucia, obniżenie sprawności procesów myślowych, zapalenie nerwów.

Zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę B₆ wynosi około 1–2 mg na dobę.

Do najbogatszych źródeł należą: groch włoski, ryby, mięso, ziemniaki i inne warzywa skrobiowe, a także niektóre owoce np. banany.

Witamina B₉ (kwas foliowy, folacyna, witamina M) wchodzi w skład kompleksu witamin B rozpuszczalnych w wodzie. W zasadzie to nie jeden związek chemiczny, ale cała grupa obejmująca około 20 pochodnych pteryny – substancji, która m.in. barwi skrzydła motyli. Jego nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *folium*, oznaczającego „liść”.

Kwas foliowy bierze udział, jako koenzym F w układach enzymatycznych przemiany i przenoszenia fragmentów jednowęglowych.

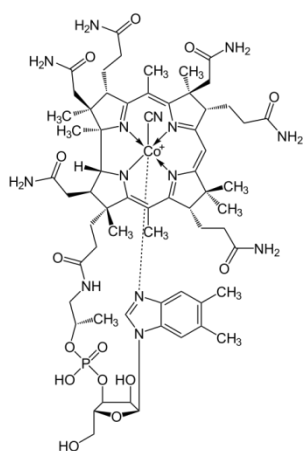


Rys. 10. Wzór strukturalny kwasu foliowego.

W organizmie człowieka jest syntezowany przez bakterie jelitowe, a jego biologicznie aktywną formą jest kwas lewomefoliowy. Kwas foliowy reguluje wzrost i funkcjonowanie komórek; wpływa dodatnio na układ nerwowy i mózg, decyduje o dobrym samopoczuciu psychicznym; zapobiega uszkodzeniom cewy nerwowej u płodu, ma pozytywny wpływ na wagę i rozwój noworodków; bierze udział w zachowaniu materiału genetycznego i przekazywaniu cech dziedzicznych komórek, reguluje ich podział; usprawnia funkcjonowanie układu pokarmowego, uczestniczy w tworzeniu soku żołądkowego, zapewnia sprawne działanie wątroby, żołądka i jelit; jest czynnikiem antyanemicznym, pobudza procesy krwiotwórcze, czyli powstawanie czerwonych krwinek; chroni organizm przed nowotworami. Prawidłowa podaż kwasu foliowego jest niezwykle istotna u kobiet w ciąży. Suplementacja kwasu foliowego w trakcie ciąży między innymi redukuje prawdopodobieństwo wystąpienia rozszczepu kręgosłupa u płodu – poważnej wady rozwojowej mogącej powstać około trzeciego tygodnia ciąży. Dzielne zapotrzebowanie wynosi 0,1–0,2 mg.

Do produktów żywnościowych bogatych w witaminę B₉ zaliczamy głównie: zielone części roślin. Znajduje się w warzywach liściowych głównie w szpinaku, ale także w sałacie, kapuście, brokule, szparagu, kalafiorze, brukselce, oraz w mniejszych ilościach w pomidorach, grochu, fasoli, soczewicy, soi, buraku, słoneczniku, orzechach, drożdżach piwowskich, wątrobie, żółtku jaja, pszenicy, pomarańczach, bananach i awokado. W wielu krajach (nie w Polsce) kwasem foliowym wzbogaca się chleb.

Witamina B₁₂ (kobalamina) – z chemicznego punktu widzenia witamina B₁₂ jest złożonym związkiem kompleksowym, w którym centralny atom kobaltu na III stopniu utlenienia jest koordynowany do atomów azotu sprzężonych pierścieni pirolowych tworzących makrocykliczny układ korynowy (będący zredukowaną formą porfiny). Jedno wiązanie koordynacyjne azot-kobalt występuje prostopadłe do płaszczyzny korynu. Drugie wiązanie prostopadłe do tej płaszczyzny jest labilne, tzn. mogą być w tym miejscu przyłączone różne ligandy, które stosunkowo łatwo się odrywają od całej cząsteczki. W organizmach żywych pełni rolę regulatora produkcji erytrocytów (czerwonych ciałek krwi). Zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę B₁₂ wynosi 2,4 µg na dobę.



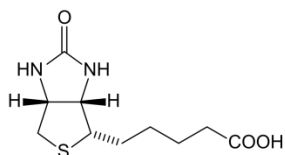
Rys. 11. Wzór strukturalny witaminy B₁₂.

Niedobory witaminy B₁₂ powodują sporo dolegliwości. Najważniejsze z nich to: opóźnienie wzrostu, bóle mięśniowe, biegunki lub zaparcia, wypadanie włosów, trądzik, zapalenie skóry, wysypki, pieczenie języka.

Obecność witaminy B₁₂ w przyrodzie jest znacznie ograniczona; nie występuje w produktach roślinnych. Witamina B₁₂ produkowana jest głównie przez bakterie żyjące w układzie pokarmowym zwierząt. U człowieka powstaje w symbiozie z bakteriami układu pokarmowego. Następuje to dopiero w dystalnych częściach układu trawiennego, to jest w jelicie grubym. Ma to znaczące konsekwencje, gdyż w tej części jelit witaminy nie podlegają wchłanianiu i wszystko co wyprodukują bakterie, zostaje wydalone. Witamina B₁₂ występuje głównie w produktach pochodzenia zwierzęcego. Do źródeł witaminy B₁₂ w pożywieniu człowieka należą produkty mięsne, ryby, jajka, mleko i jego przetwory, pieczarki. W witaminę tę często są wzbogacane płatki śniadaniowe.

Biotyna (witamina H, witamina B₇) – heterocykliczny organiczny związek chemiczny z grupy witamin rozpuszczalnych w wodzie. Zawiera układ skondensowanych pierścieni tiofenu imidazolidyny oraz boczny łańcuch zakończony grupą karboksylową. Występuje w organizmach zwierzęcych i roślinnych. Stanowi ona koenzym kilku różnych enzymów. Jest niezbędnym składnikiem karboksylaz biotynozależnych.

Uczestniczy w przenoszeniu grupy karboksylowej ($-\text{COO}^-$) z anionu wodorowęglanu na różne związki organiczne, zależnie od rodzaju danej karboksylazy.



Rys. 12. Wzór strukturalny biotyny.

Biotyna działa jako koenzym karboksylaz - enzymów katalizujących reakcje wiązania ditlenku węgla. W wielu naturalnych produktach roślinnych i zwierzęcych witamina H występuje w stanie wolnym lub w formie związanej z białkiem. Jej niedobory występują dość rzadko i objawiają się m.in. bólem mięśniowym, osłabieniem i halucynacjami. Znakomitym źródłem biotyny są: żółtka jaj, pomidory, kalafior, orzechy, wątroba i nerki.

Witamina C- kwas askorbinowy

Kwas L-askorbinowy jest związkiem krystalicznym o dobrej rozpuszczalności w wodzie i właściwościach redukujących, które są wykorzystywane do jego oznaczenia. Jego budowa jest bardzo podobna do budowy monosacharydu. Witamina C łatwo ulega reakcji utleniania do kwasu dehydroaskorbinowego. Jest ona jedynym związkiem, który działa jako reduktor w środowisku kwaśnym. Obecność witaminy C w gruczołach nadnercza świadczy o jej udziale w syntezie hormonów sterydowych. Jej główną rolą jest utrzymanie prawidłowego stanu substancji międzykomórkowych w tkance chrzęstnej, kostnej i zębiny. Niedobór witaminy C może być konsekwencją powstawania gnilca, co objawia się krwawieniem, wypadaniem zębów oraz powolnym gojeniem się ran.

Z powodu dobrej rozpuszczalności w wodzie witamina C z łatwością wchłania się w jelicie cienkim, skąd przechodzi bezpośrednio do krwi, żyły zwrotnej i do wątroby, a następnie rozprzestrzenia się w całym organizmie. Witamina C jest głównie magazynowana w przysadce, korze nadnerczy oraz grasicy.

Jej źródłem są głównie owoce cytrusowe, jagody i melony, liście pietruszki, zielona papryka, kapusta biała, owoce czarnej róży, czarna porzeczka i ziemniaki. Straty witaminy C występują podczas gotowania i miazdżenia świeżych warzyw.

Tabela 6. Źródła witaminy C w żywności.

Zawartość w 100 g lub ml produktu	mg
Dzika róża suszona	1700
Guawa	230
Czarna porzeczka	183
Papryka czerwona	144
Brukselka	94
Papryka zielona	91
Kalafior	69
Szpinak	68
Truskawki	68
Poziomki	60
Papaja	60
Kiwi	59
Kapusta czerwona	54
Cytryny	50
Pomarańcze	49

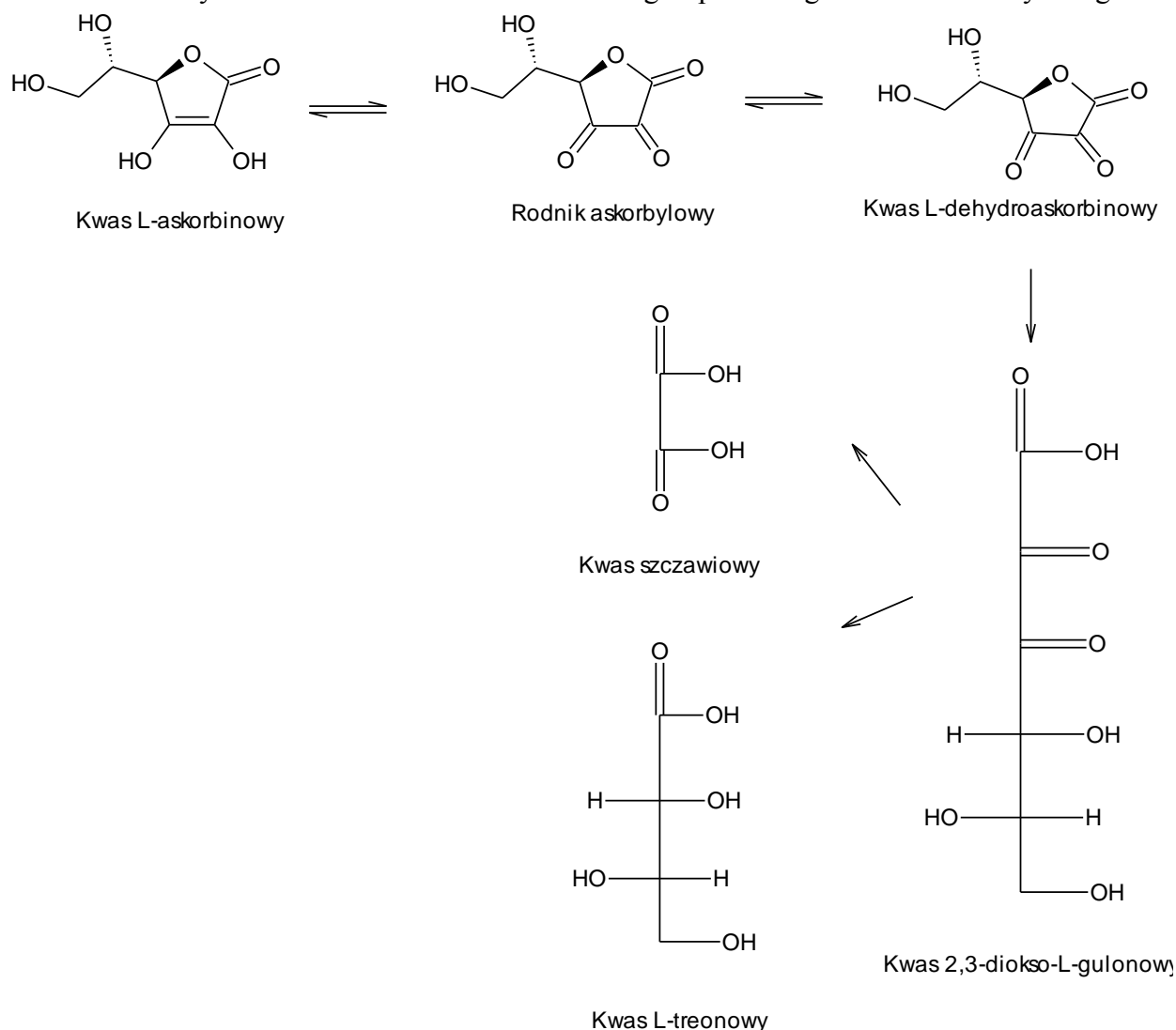
Witamina C w postaci ciała stałego jest stabilna, jednak jej wodne roztwory wykazują niewielką trwałość głównie w pH niższym niż 4 oraz wyższym niż 6.

Na szybkość utleniania witaminy C ma wpływ: temperatura, obecność tlenu, zawartość metali katalizujących reakcję utleniania, istnienie pozostałych składników żywności.

W pierwszym etapie utleniania kwasu L-askorbinowego powstaje stabilny rodnik askorbylowy (schemat 1), który może ulec redukcji do kwasu L-askorbinowego w obecności enzymów NADP- zależnych bądź też w reakcjach przenoszenia elektronów. Obecność dwóch cząsteczek rodnika askorbylowego może prowadzić do spontanicznej reakcji dysproporcjonacji w wyniku której powstaje kwas L-askorbinowy lub kwas L-dehydroaskorbinowy. Rezultatem hydrolizy i otwarcia pierścienia laktozowego niestabilnego kwasu L-dehydroaskorbinowego jest nieaktywny witaminowo kwas 2,3-diokso-L-gulonowy. Dalsze etapy utleniania wiążą ze sobą powstanie nieaktywnych kwasów tj. szczawiowego i L-treonowego.

Wraz ze wzrostem temperatury maleje rola utleniania, a rośnie rola beztlenowej degradacji kwasu askorbinowego, której głównymi produktami w pH < 2 są: furfural i CO₂.

Witamina C jest znakomitym zmiataczem reaktywnych postaci tlenu oraz jest postrzegana, jako najważniejszy przeciwutleniacz płynów poza komórkowych. W przypadku małych stężeń witaminy C mamy do czynienia z wysoką aktywnością antyoksydacyjną, ponieważ przeważają reakcje redukcji rodników nadtlenkowych w obecności kwasu askorbinowego i powstałego rodnika askorbylowego.



Schemat 1. Reakcje utleniania kwasu askorbinowego.

2.2. Metody oznaczania witaminy C

Kwas askorbinowy można oznaczać różnymi metodami fizykochemicznymi i chemicznymi. Niektóre z nich zostały opisane poniżej.

2.2.1. Metody fizykochemiczne

Chromatografia cieczowa [6, 7]

Przy wykorzystaniu tej metody można oznaczyć łączną zawartość kwasu L-askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego. Kwas dehydroaskorbinowy jest redukowany do kwasu askorbinowego przy użyciu ditiotreitolu (DTT). Obecna w próbce witamina C oznaczana jest z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Wykonanie oznaczenia

W kolbie miarowej o pojemności 25 cm³ odważyć 0,025 g DTT, po czym rozpuścić go w 10 cm³ wody dejonizowanej. Po dokładnym rozpuszczeniu przenieść próbkę soku do kolby i wytrząsać zawartość przez 30 minut na wytrząsarce mechanicznej. Należy zabezpieczyć kolbę przed dostępem światła. Następnie dodać 0,1 cm³ roztworu Carreza i uzupełnić kolbę do kreski wodą dejonizowaną. Próbkę odstawić na 2 godziny bez dostępu światła, po czym przesączyć przez bibułę. Fazę rozwijającą stanowi 0,5 % roztwór wodny KH₂PO₄ z dodatkiem 0,1 % DTT. Zawartość witaminy C należy wyznaczyć z krzywej wzorcowej. Roztwór Carreza stanowi mieszanina soli cynku i heksacyjanożelazianu(II) potasu – jest to roztwór wykorzystywany do denaturacji białek i usuwania ich z analizowanych układów.

Metoda fluorymetryczna [6, 7]

Oznaczenie z wykorzystaniem tej metody polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego do kwasu L-dehydroaskorbinowego i powstaniu fluoryzującego kompleksu z o-fenylendiaminą. Mierzy się natężenie fluorescencji tego kompleksu przy długości fali światła wzbudzającego $\lambda_{\text{Ex}}=365$ nm oraz długości fali światła emitowanego $\lambda_{\text{Ex}}=430$ nm.

Wykonanie oznaczenia

Próbkę soku należy przenieść do kolby miarowej o pojemność 100 cm³ i przepłukać mieszaniną ekstrahującą składającą się z kwasu metafosforowego rozpuszczonego w lodowatym kwasie octowym i wodzie dejonizowanej. Po uzyskaniu pH roztworu 1,2 dodać ok. 2 g węgla aktywnego ułatwiającego utlenianie kwasu L-askorbinowego. Po czym wytrząsnąć i przesączyć. Zawartość witaminy C zmierzyć w przesączu.

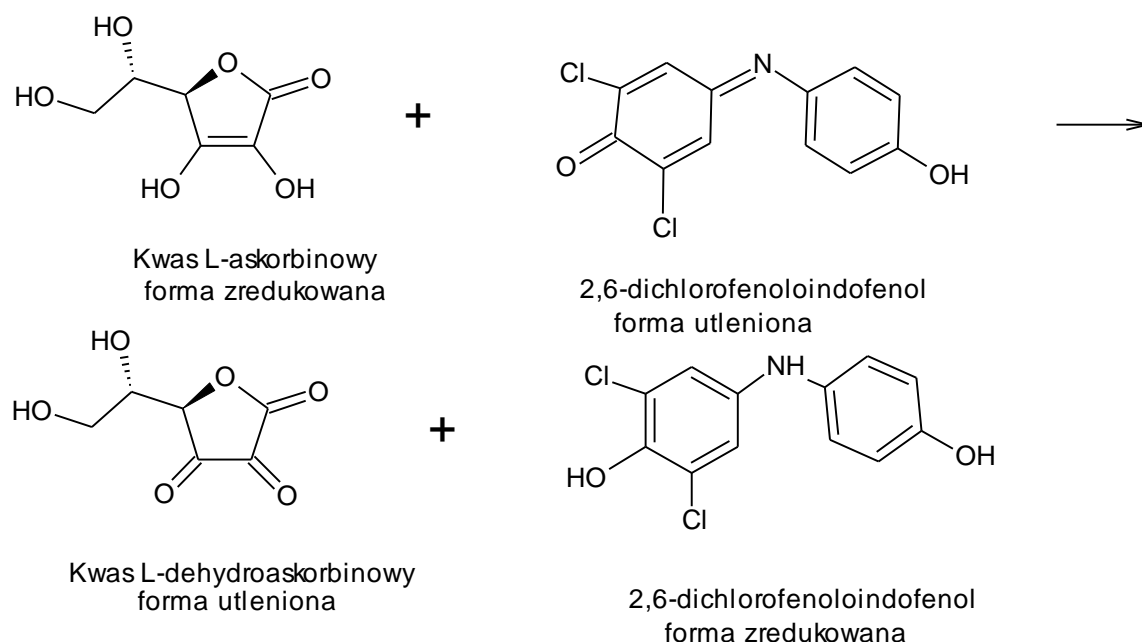
Metoda spektrofotometryczna [7]

Próbkę przeznaczoną do oznaczenia zawieszają w rozcieńczonym kwasie metafosforowym(V), po czym ekstrahuje chloroformem. Aby nastąpiło przejście kwasu askorbinowego w dehydroaskorbinowy do fazy wodnej zostaje dodany roztwór 2,6-dichlorofenoloindofenolu oraz roztwór 2,4-dinitrofenylohydrazyny. Powstały hydrazon zostaje poddany ekstrakcji przy użyciu mieszaniny octanu etylu, lodowatego kwasu octowego oraz acetonu (96:2:2). Otrzymany ekstrakt oczyszcza się metodą chromatografii adsorpcyjnej na kolumnie z wypełnieniem stanowiącym żel krzemionkowy. Fazą ruchomą jest mieszanina dichlorometanu i lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 97:3. Po odparowaniu eluatu do sucha pozostałość zostaje rozpuszczona w rozcieńczonym kwasie siarkowym. Absorbancję roztworu mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=509$ nm. Pomiarów są wykonywane w odniesieniu do rozcieńczonego kwasu siarkowego.

2.2.2. Metody chemiczne

Metoda Tillmansa i jej modyfikacje [7]

Metoda ta oparta jest na redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas L-askorbinowy (schemat 2).



Schemat 2. Redukcja 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas L-askorbinowy.

Polega ona na miareczkowaniu roztworu kwasu L-askorbinowego barwnikiem Tillmansa do chwili pojawienia się jasnoróżowego zabarwienia. Oznaczenie wykonuje się tylko w przypadku roztworów bezbarwnych i nie zawierających innych związków powodujących redukcję odczynnika. W przypadku oznaczania witaminy C w owocach, warzywach oraz ich przetworach obecne są reduktory białkowe, czyli aminokwasy lub białka zawierające grupy sulfhydrylowe, które są utleniane do wiązań disulfidowych. Obecne są również reduktory cukrowe, pochodne cukrów, które tworzą się podczas obróbki termicznej. Związki te należy usunąć przed wykonaniem oznaczenia.

W przypadku roztworów silnie zabarwionych stosuje się modyfikację tej metody. Wówczas miareczkowanie 2,6-dichlorofenoloindofenolem prowadzi się w obecności rozpuszczalnika organicznego (chloroform, ksylen) wykorzystując fakt różnicowanej rozpuszczalności. Barwniki antocyjanowe obecne w produktach roślinnych, w odróżnieniu od barwnika Tillmansa, nie rozpuszczają się w rozpuszczalniku organicznym. Tak więc nadmiarowa kropla 2,6-dichlorofenoloindofenolu przechodzi do warstwy rozpuszczalnika organicznego barwiąc go na różowo.

W celu oznaczenia całkowitej zawartości witaminy C prowadzi się redukcję kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego przy użyciu siarkowodoru, którego nadmiar usuwa się za pomocą sublimatu. Wówczas dochodzi również do wytrącenia reduktonów białkowych. Rezultatem miareczkowania jest oznaczenie kwasu L-dehydroaskorbinowego, kwasu L-askorbinowego i reduktonów cukrowych.

W celu oznaczenia witaminy C metodą Tillmansa w surowcach roślinnych należy wykonać cztery miareczkowania:

- bezpośrednio miareczkowanie roztworu witaminy C,
- miareczkowanie badanego wyciągu po przeprowadzonej uprzednio redukcji kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego,

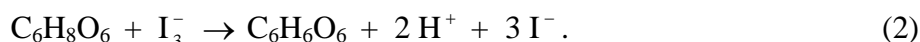
- miareczkowanie roztworu po uprzednim wytrąceniu kwasu L-askorbinowego i reduktorów białkowych,
- miareczkowanie po wytrąceniu reduktonów białkowych.

Wyniki tych miareczkowań pozwalają na obliczenie całkowitej zawartości witaminy C po wyeliminowaniu wpływu obecności reduktonów białkowych i cukrowych.

Metoda miareczkowania jodometrycznego [8]

Podstawowa metoda redoksymetrycznej analizy objętościowej.

W przypadku oznaczania witaminy C, która jest silnym reduktorem, titrantami mogą być utleniacze w środowisku kwaśnym np. roztwór jodu w jodku potasu. Zachodzą wówczas reakcje:



W przypadku, gdy w roztworze znajduje się nadmiar jodku potasu, to liczba moli jonów wielojodkowych jest równa liczbie moli jodu użytych do sporządzenia roztworu. Wskaźnikiem wykorzystywanym w oznaczeniu jest skrobia. Po przereagowaniu całości kwasu askorbinowego nadmiar jodu, tworząc addukt ze skrobią, barwi roztwór oznaczany na granatowo.

Ćwiczenie

Wykonanie oznaczenia zawartości witaminy C w soku metodą Tillmansa

Odczynniki:

- jodek potasu, KI, cz. d. a.,
- skrobia, $(C_6H_{10}O_5)_n$, wskaźnik,
- kwas szczawiowy, cz.d.a.,
- kwas siarkowy(VI), H_2SO_4 , $d=1,84\text{ g/cm}^3$,
- 2,6- dichlorofenoloindofenol, sól sodowa 98%, wskaźnik,
- tiosiarczan sodowy krystaliczny, $Na_2S_2O_3$, cz.d.a.
- Materiał do badań: soki pomarańczowe różnych producentów, świeże owoce, sok z kiszanej kapusty.

Sprzęt:

- waga techniczna WPT 2, RADWAG,
- waga analityczna AS 220/C/2, RADWAG,
- drobny sprzęt laboratoryjny (biurety, zlewki, kolba miarowa, pipety, lejki, szalki Petriego, cylinder miarowy).

1. Oznaczenie miana 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu.

Przygotowanie roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu

W zlewce o pojemności 25 cm^3 odważyć na wadze analitycznej $0,04\text{ g}$ barwnika i rozpuścić w $25\text{-}30\text{ cm}^3$ gorącej wody destylowanej. Zawartość zlewki oziębć wodą wodociągową, po czym przenieść do kolby miarowej o pojemności 50 cm^3 i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Bezpośrednio przed użyciem roztwór rozcieńczyć wodą destylowaną 1:5.

Sporządzenie roztworu tiosiarczanu sodu o stężeniu $0,001\text{ mol/dm}^3$

Odważyć na wadze analitycznej $0,0158\text{ g}$ tiosiarczanu sodu, przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 i rozpuścić w wodzie destylowanej.

Nastawianie miana roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu

W kolbie stożkowej o pojemności 50 lub 100 cm^3 z doszlifowanym korkiem odważyć $0,1\text{ g}$ jodku potasu, rozpuścić go w 5 cm^3 kwasu siarkowego(VI) o stężeniu 1 mol/dm^3 i dodać szybko 10 cm^3 roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu. Zawartość kolby zamknąć i pozostawić na 10 minut w ciemnym miejscu. Następnie wydzielony jod odmiareczkować roztworem tiosiarczanu sodu w obecności 1 cm^3 roztworu skrobi do odbarwienia roztworu. Miareczkowanie powtórzyć dwukrotnie.

Korzystając ze wzoru (5) obliczyć stężenie barwnika:

$$C_b = \frac{\bar{V}_{Na_2S_2O_3} \cdot C_{Na_2S_2O_3}}{2 \cdot V_b} \quad (5)$$

gdzie: $\bar{V}_{Na_2S_2O_3}$ - średnia objętość zużytego roztworu $Na_2S_2O_3$ (cm^3),

$C_{Na_2S_2O_3}$ - stężenie roztworu $Na_2S_2O_3$ (mol/dm^3),

V_b - objętość roztworu barwnika (cm^3).

2. Oznaczenia zawartości witaminy C w soku z kiszonej kapusty i soku z cytryny metodą Tillmansa

20 cm^3 soku z kapusty lub 20 cm^3 soku z cytryny umieścić w probówkach wirówkowych i odwirować. 10 cm^3 odwirowanego soku z cytryny rozcieńczyć 2% kwasem szczawiowym w kolbie miarowej o pojemności 50 cm^3 . Do trzech kolb stożkowych o pojemności 25 cm^3 pobrać po 10 cm^3 rozcieńzonego soku z cytryny, i miareczkować barwnikiem Tillmansa do barwy lekko różowej utrzymującej się 10 s. Oznaczenie powtórzyć dwukrotnie. Wykonać również ślełą próbę, gdzie do miareczkowania zamiast rozcieńzonego soku należy pobrać wodę destylowaną.

Zawartość witaminy C obliczyć ze wzoru (6):

$$m_{wit.C} = C_b \cdot \bar{V}_b \cdot M_{C_6H_8O_6} \quad (6)$$

gdzie: C_b - stężenie roztworu barwnika (mol/dm^3),

\bar{V}_b - średnia objętość zużytego roztworu barwnika (dm^3),

$M_{C_6H_8O_6}$ - masa molowa $C_6H_8O_6$ (g/mol).