

*Anna Lebedzińska, Jakub Czaja, Małgorzata Najmowicz,
Karolina Petrykowska, Piotr Szefer*

OZNACZANIE WITAMINY C W SOKACH I SUPLEMENTACH DIETY Z WYKORZYSTANIEM HPLC

Katedra i Zakład Bromatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. P. Szefer

Oznaczono zawartość witaminy C w sokach owocowych oraz w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV-VIS. Wykazano różnice pomiędzy zawartością deklarowaną a zawartością oznaczoną w przypadku oznaczeń witaminy C w sokach owocowych. Zawartość witaminy C w badanych preparatach w niewielkim stopniu różniła się od wartości deklarowanych przez producentów poszczególnych suplementów diety i produktów leczniczych.

Hasła kluczowe: witamina C, soki, suplementy diety, HPLC.
Key words: vitamin C, juices, dietary supplements, HPLC.

Witamina C, poprzez zdolność przenoszenia elektronów stymuluje różne procesy biochemiczne. Reguluje cykl oddechowy w mitochondriach, uczestniczy w reakcjach antyoksydacyjnych. Pozwala na utrzymanie żelaza i miedzi w postaci aktywnych form w organizmie. Bierze udział w biosyntezie kolagenu, który jest najbardziej powszechnym białkiem zwierzęcym budującym wiele struktur. Pełni również rolę kofaktora w procesie powstawania noradrenaliny dzięki zdolności do oddawania elektronów (1–3). Poza pełnieniem roli przeciwutleniacza witamina C jest modylatorem odpornościowym, gdyż bierze udział w produkcji immunoglobulin. Ponadto, zwiększa wchłanianie wapnia i żelaza. Działa synergistycznie z witaminą E, hamując powstawanie związków kancerogennych. Wpływa korzystnie na funkcję śródbłonna naczyń, hamuje powstawanie blaszki miażdżycowej poprzez podwyższenie poziomu HDL (3). Człowiek nie posiada w organizmie oksydazy *L*-gulono- γ -laktonowej, enzymu niezbędnego do syntetyzowania kwasu *L*-askorbinowego. Dlatego też aby zapewnić właściwy poziom witaminy C w organizmie niezbędne jest dostarczenie jej wraz z pożywieniem (1, 2, 3).

Głównym źródłem witaminy C w diecie człowieka są produkty roślinne, przede wszystkim surowe owoce i warzywa oraz w mniejszym stopniu otrzymane z nich przetwory. W celu uzupełnienia ewentualnych niedoborów kwasu askorbinowego w pożywieniu stosuje się wzbogacanie produktów spożywczych oraz suplementację diety. Zawartość kwasu *L*-askorbinowego w pożywieniu może ulegać zmianom, ze względu na jego wrażliwość na działanie zewnętrznych czynników środowisko-

wych, dlatego też istnieje potrzeba kontrolowania zawartości witaminy C w produktach spożywczych oraz suplementach diety (4, 5).

W oznaczaniu witaminy C w żywności i suplementach diety powszechnie znajduje zastosowanie rekomendowana przez AOAC metoda *Tillmansa*, odznaczająca się dobrą czułością oraz dokładnością oznaczeń. Oznaczenia oparte o miareczkowanie kolorymetryczne posiadają jednak ograniczenia związane z brakiem możliwości oznaczeń witaminy C w produktach barwnych oraz w przypadku obecności innych substancji o właściwościach oksydo-redukcyjnych, które mogą wpływać na wynik oznaczenia (6). Alternatywę dla metody *Tillmansa* stanowią metody oparte o technikę HPLC (7–13).

Celem pracy było oznaczenie zawartości witaminy C w sokach i suplementach diety oraz porównanie uzyskanych danych z deklaracją producenta.

MATERIAŁ I METODY

Oznaczono zawartość kwasu *L*-askorbinowego w trzynastu rodzajach soków owocowych oraz dwunastu suplementach diety zakupionych w gdańskiej sieci placówek handlowych i aptek.

Ze względu na dużą wrażliwość witaminy C na czynniki zewnętrzne, tj. tlen, czy światło słoneczne, badane próbki przygotowywano bezpośrednio przed oznaczeniem, z zachowaniem warunków chroniących labilną witaminę.

W celu stabilizacji ekstrahowanej witaminy C zastosowano roztwór o pH 3 uzyskany poprzez zakwaszenie wody dejonizowanej stężonym kwasem ortofosforowym, jednocześnie kwas dehydroaskorbinowy jest redukowany do kwasu *L*-askorbinowego.

W przypadku oznaczeń witaminy C w suplementach diety pobierano do analizy od 3 do 10 tabletek, które rozcierano w moździerzu. Następnie odważano po trzy równoległe naważki o masie 0,1 g z dokładnością $\pm 0,0001$ g i przenoszono ilościowo do kolby miarowej poj. 100 cm³ i uzupełniano za pomocą roztworu ekstrakcyjnego. Przygotowując próbki preparatów płynnych i soków pobierano za pomocą pipety 0,5 cm³ roztworu i uzupełniano do 100 cm³ w kolbie miarowej. Uzyskane roztwory wirowano w ultrawirówce MPW-55, a roztwór do dalszych badań pobierano z nad supernatantu.

Analizę chromatograficzną prowadzono w temp. 25°C stosując chromatograf UltiMate 3000 firmy Dionex-ESA. Zawartość witaminy C oznaczano za pomocą detektora UV typu Ulti Mate 3000 Photodiode Array Detector przy długości fali $\lambda = 243$ nm. Optymalne warunki chromatograficzne uzyskano stosując izokratyczny rozdział przy zastosowaniu kolumny chromatograficznej Supelco RP-18 3 μm o wymiarach 75 mm \times 4,6 mm, przy prędkości przepływu fazy ruchomej 0,8 cm³/min. Fazę ruchomą stanowił bufor fosforanowy o stęż. 40 mmol/dm³ o pH 3,65; acetonitryl (90:10, v/v) z dodatkiem (1,5 mmol/dm³) bromku cetylotrimetyloamoniowego jako czynnika stabilizującego.

Metodę oznaczania witaminy C w sokach owocowych i suplementach diety sprawdzono wykonując oznaczenia fortyfikowanych produktów w zakresie stężeń krzywej kalibracji (od 0,6 do 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Dokładność metody sprawdzono poprzez

oznaczenie zawartości witaminy C w próbkach soków i suplementów diety wzbogaconych kwasem *L*-askorbinowym. Uzyskano satysfakcjonującą dokładność i precyzję oznaczeń, które zostały przedstawione w tab. I.

Tabela I. Odzysk witaminy C i odchylenie standardowe zastosowanej metody

Table I. Recovery and standard deviation estimated for analytical determinations of vitamin C

Produkt badany	Wielkość próbki	Ilość dodana (mg/próbkę)	Średni odzysk (%)	Błąd względny (%)	RSD (%)
Rutinoscorbin	0,1 g	10,0	104,3	+ 4,3	2,20
Rutinoscorbin	0,1 g	20,0	100,4	+ 0,4	2,54
Rutinoscorbin	0, 1 g	40,0	95,9	- 4,1	0,49
Rutinacea Complete	0,1 g	10,0	99,2	- 0,8	0,71
Rutinacea Complete	0,1 g	20,0	95,0	- 5,0	0,36
Rutinacea Complete	0,1 g	40,0	98,1	- 1,9	2,53
Sok gruszkowy	100 cm ³	5,0	106,5	+ 6,5	8,32
Sok gruszkowy	100 cm ³	10,0	96,4	- 3,6	3,85

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zawartość witaminy C w badanych sokach i suplementach diety przedstawiono w tab. II i III. Badane soki odznaczały się zróżnicowaną zawartością witaminy C. Najwyższą zawartość tej witaminy oznaczono w fortyfikowanym soku Tymbark multiwitamina, ok. dwukrotnie wyższą niż w pozostałych badanych sokach. Wykazano znacznie wyższą zawartość kwasu *L*-askorbinowego w sokach w stosunku do wartości deklarowanej przez producenta (od 108 do 199%). Najwyższą różnicą odznaczały się soki Tymbark multiwitaminowy oraz Bobovita (gruszkowo-jabłkowy), w których zawartość wynosiła odpowiednio: 199,2% i 171,9% wartości deklarowanej. Podobnie, w badaniach prowadzonych przez *Przygońskiego* i współpr. (14) wykazano, iż w próbkach deserów i napojów sproszkowanych zawartość witaminy C w części próbek była niezgodna w stosunku do deklarowanej przez producenta.

Kwas askorbinowy jest dodawany do wielu produktów, w tym także soków i napojów, w celu zwiększenia ich wartości odżywczej, a także ochrony przed niepożądanymi reakcjami enzymatycznymi, co jest możliwe dzięki jego właściwościom antyoksydacyjnym. Podczas produkcji soków w hermetycznie zamkniętych opakowaniach, w procesie sterylizacji i zamykania opakowań stosuje się nadtlenek wodoru (15). Proces ten ma przedłużyć trwałość przechowywanych produktów. Jednak pozostałość nadtlenu wodoru w opakowaniach powoduje utlenianie kwasu askorbinowego, a tym samym jego rozkład. Na zmniejszenie się jego zawartości wpływa również obecność tlenu, a także temperatura. Fortyfikacja soków powoduje zwiększenie stężenia witaminy C, chroniąc ją przed rozkładem i zapewniając jej odpowiednią zawartość w końcowym produkcie (15, 16).

Tabela II. Zawartość witaminy C w badanych sokach

Table II. Vitamin C concentrations in analysed juices

Nazwa soku	Zawartość oznaczona (mg/100 cm ³) (x ± SD)	Zawartość deklarowana (mg/100 cm ³)	Stosunek zawartości oznaczonej do deklarowanej (x 100%)
Gerber gruszkowy	29,66 ± 0,70 (28,86 – 30,11)	25	118,6
Gerber winogronowo-jabłkowy	27,18 ± 0,56 (26,46 – 27,79)	25	108,7
Tymbark multiwitaminowy	59,76 ± 1,43 (58,16 – 61,46)	30	199,2
Tymbark pomarańczowy	30,37 ± 1,25 (29,05 – 32,16)	bd	–
Tymbark czerwony grejpfrut	18,07 ± 0,45 (17,53 – 18,74)	bd	–
Tymbark czarna porzeczka	10,49 ± 0,61 (9,96 – 11,45)	bd	–
Hortex multiwitaminowy	24,51 ± 0,76 (23,66 – 25,33)	20	122,6
Hortex żółty grejpfrut	36,44 ± 0,91 (35,73 – 38,05)	bd	–
Toma pomarańczowy	35,43 ± 0,53 (34,66 – 36,24)	min. 27	131,2
Toma czerwony grejpfrut	10,69 ± 0,29 (10,24 – 11,03)	min. 10	106,9
Bobovita gruszkowo-jabłkowa	25,78 ± 0,25 (25,47 – 25,07)	15	171,9
Fortuna brzoskwinowy	1,65 ± 0,05 (1,59 – 1,70)	bd	–
Fortuna winogronowy	nd	–	–

nd – zawartość poniżej granicy wykrywalności metody; bd – brak deklarowanej zawartości przez producenta.

W przypadku soków i napojów owocowych celowe wydaje się dodawanie witaminy C do produktów, które zawierają jej niewielkie ilości. Jednak jej zawartość musi być zgodna z normami zawartymi w wymienionych rozporządzeniach. Ponadto, zawartość podana na etykiecie musi być sumą składników naturalnie występujących w produkcie oraz tych dodanych (17). Jednak często zdarzają się niezgodności opisu na etykiecie z faktyczną zawartością składników mineralnych w sokach i napojach wzbogaconych.

W przypadku oznaczeń kwasu *L*-askorbinowego w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety (tab. III) wartość oznaczona w niewielkim stopniu odbiegała od wartości deklarowanej w sześciu analizowanych produktach, a różnica nie przekraczała 7%. Najwyższy stopień zgodności wykazano w preparatach Multivita-

minum Forte, Vitaminum C 600 mg Active oraz Cetebe i wynosił on odpowiednio: 99,9%, 100,1% oraz 101,1% wartości deklarowanej.

Tabela III. Zawartość witaminy C w badanych preparatach farmaceutycznych

Table III. Vitamin C content in analysed medicinal products

Nazwa preparatu	Zawartość oznaczona (mg/tabł.) (mg/cm ³ , krople) (x ± SD)	Zawartość deklarowana (mg/tabł.) (mg/ml, krople)	Stosunek zawartości oznaczonej do deklarowanej (x 100%)
Produkty lecznicze			
Vitaminum C Teva	95,68 ± 0,394 (95,24 – 96,00)	100	95,7
Cerutin	96,51 ± 2,010 (95,32 – 99,48)	100	96,5
Monovitan C	204,48 ± 2,712 (202,90 – 207,62)	200	102,2
Cetebe	502,61 ± 3,018 (492,24 – 513,44)	500	101,1
Rutinoscorbin	105,55 ± 1,600 (103,95 – 107,15)	100	105,5
Multivitaminum	28,19 ± 0,390 (27,81 – 28,59)	25	106,3
Multivitaminum forte	99,90 ± 1,730 (98,05 – 101,49)	100	99,9
Juvit	102,70 ± 0,770 (101,82 – 103,21)	100	102,7
Suplementy diety			
Witamina C 600 mg Activ	600,34 ± 1,064 (595,58 – 604,59)	600	100,1
Rutinacea Complete	62,30 ± 2,024 (60,00 – 63,83)	60	103,8
Calcium z vit. C	57,08 ± 1,912 (55,73 – 59,27)	60	95,1
Falvit	61,73 ± 1,391 (60,50 – 63,24)	60	102,8

WNIOSKI

1. Analiza soków wykazała różnice pomiędzy oznaczoną zawartością witaminy C, a zawartością deklarowaną przez producenta.

2. Zawartość witaminy C w preparatach farmaceutycznych i w suplementach diety była zgodna z deklarowaną lub w niewielkim stopniu odbiegała od deklaracji producenta.

A. Lebedzińska, J. Czaja, M. Najmowicz, K. Petrykowska, P. Szefer

ESTIMATION OF VITAMIN C CONTENT IN JUICES
AND PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY HPLC

Summary

The aim of the study was to apply HPLC for quantification of vitamin C in juices and pharmaceutical preparations. The results indicate that little difference exists between the estimated and declared vitamin C concentrations in pharmaceutical preparations, while considerable difference were observed in the analysed juices.

PIŚMIENICTWO

1. *Gasińska A., Pilka B.*: Antyoksydanty w żywności a stres oksydacyjny. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2008; 41: 555-561. – 2. *Gawęcki J., Hryniewiecki L.* /red./: *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003. – 3. *Grajka W.* /red./: *Przeciwutleniacze w żywności.* Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007. – 4. *Wechtersbach, L., Cigic B.*: Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007; 70: 767-772. – 5. *Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., Guidi, L.*: Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 2008; 107: 282-288. – 6. AOAC International (2003), *Official Methods of Analysis*, AOAC International, Arlington, VA. – 7. *Eitenmiller R., Landen W.*: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sci.* SRC Press LLC 2008; 240-280. – 8. *Czerwiecki L., Wilczyńska G.*: Oznaczanie witaminy C w wybranych produktach owocowych i warzywnych. *Roczn. PZH*, 1999; 50(1): 77-87. – 9. *Barril C., Clark A.C., Scollary G.R.*: Understanding the contribution of ascorbic acid to the pigment development in model white wine systems using liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection techniques. *Anal. Chim. Acta*, 2008; 621: 44-51. – 10. *Franke A.A., Custer L.J., Arakaki Ch., Murphy S.P.*: Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *J. Food Compos Anal*, 2004; 17: 1-35. – 11. *Heudi O., Kilinc T., Fontannaz P.*: Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *J. Chromatogr. A*, 2005; 1070: 49-56. – 12. *Hernández Y., Lobo G.M., González M.*: A comparative evaluation of methods on determination of vitamin C in tropical fruits. *Food Chemistry* 2006; 96: 654-664. – 13. PN-EN 14130:2004 *Artykuły żywnościowe. Oznaczanie witaminy C metoda HPLC.* – 14. *Przygoński K., Zaborowska Z., Wojtowicz E.*: Zawartość witaminy C w wybranych deserach i napojach w proszku. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009; 3: 299-303. – 15. *Ozkan M., Kirca A., Cemeroglu B.*: Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food Chemistry*, 2004; 88: 591-597. – 16. *Gardner P.T., White T., McPhail D., Duthie G.*: The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 2000; 68: 471-474. – 17. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 roku w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych i niektórych innych substancji (D. Urz. WE L 404), <http://eur-lex.europa.eu>.

Adres: 80-216 Gdańsk, Al. Gen. Hallera 107.