

Příspěvek k enzymovému stanovení vitamínu C v nealkoholických nápojích

663.1 663.8 579

Ing. ZDENEK ZLOCH, CSc., Hygienický ústav lékařské fakulty UK, Plzeň

Klíčová slova: vitamín C, kyselina askorbová, enzym, stanovení, analýza, nealkoholický nápoj, oxidace, kolorimetrie, redukce, železnatá sůl, železitá sůl, extrakt

Předneseno na 7. konferenci o technologii a hodnocení výrobků nápojového průmyslu, Domažlice, 28.—29. května 1986

UVOD

I při narůstajícím počtu informací o biologické hodnotě nealkoholických nápojů obsahujících ovocnou nebo zeleninovou složku se posuzuje obsah vitamínu C stále jako stěžejní část jejich výživové kvality. Proto je i relativně nízká hodnota vitamínu C v nápojích, např. 20 až 50 mg.l⁻¹, značně cenná a její kontrola by se měla provádět jednoduchými, avšak spolehlivými metodami.

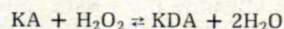
V oblasti analytiky vitamínu C aplikované na potravinový materiál byla v posledním desetiletí vyvinuta a zavedena řada původních nebo nově modifikovaných metod. Pozoruhodného rozvoje doznaly metody elektrochemické [1, 2]. Nově inovované kolorimetrické postupy využívají nových typů činidel a dosahují tak větší specifity a citlivosti; např. pro reakci askorbátu (dále KA) s Cu²⁺ se používá 2,2'-bichinolinu [3], pro reakci KA a Fe³⁺ ferrozinu [4] nebo bathofenatrolinu [5]. Stále aktuální metody fluorimetrické byly zdokonaleny vypracováním semiautomatické analýzy na základě tvorby a detekce chinoxalinu [6] a chromatografickou separací s následnou oxidací KA a její kondenzací s o-fenylendiaminem [7].

Také kapalinová chromatografie patří k základním metodám separace a stanovení KA a často i její oxidované formy kyseliny dehydroaskorbové (dále KDA). Kromě iontové výměnné se zde v poslední době neobyčejně rozšířilo uplatnění vysoce účinné kapalinové chromatografie. Jednotlivé postupy se liší druhem sorbentu a zejména způsobem detekce KA, která je obvykle elektrochemická [8], spektrofotometrická [9–11], popř. fluorimetrická [12, 13].

Největšího pokroku v úsilí o vypracování jednoduché a spolehlivé metody se dosáhlo při využití enzymové oxidace KA, a to nejčastěji enzymem askorbát oxidoreduktasou, izolovaným z okurek nebo z tykve. Po uvedení čistého preparátu tohoto enzymu firmou Boehringer koncem 70. let na trh bylo vyzkoušeno a navrženo více než deset různých metodických postupů, při kterých se enzymová, tzn. vysoce specifická oxidace KA monitoruje elektrochemicky, nejčastěji Clarkovou elektrodou, která indikuje úbytek kyslíku z prostředí [14, 15]. Enzym se již podařilo stabilně vázat na sorbent a využívat ho jako enzymového reaktoru průtokovým způsobem [16, 17]. V odlišné modifikaci se měří změna absorbance roztoku v UV oblasti před a po enzymové oxidaci KA [18]. V jiném provedení je enzymu použito k oxidačnímu odstranění KA z roztoku; v původním i enzymově oxidovaném prostředí se uskutečnil nespecifická oxidace KA aj. redukujících látek, např. solí železitou nebo měďnatou [19], popř. tetrazoliovou solí [20] a redukovaný produkt se hodnotí fotometricky jako barevný komplex. Výsledky získané při použití této metody jsme měli možnost prověřit při práci se soupravou pro enzymové sta-

novení vitamínu C v potravinách firmy Boehringer (Mannheim).

V r. 1979 byla poprvé publikována zpráva o jiném oxidoreduktasovém enzymu, jehož substrátem je KA — o askorbátperoxidase, která údajně specificky v přítomnosti askorbátu rozkládá peroxid vodíku a přenosem elektronů z molekuly askorbátu jej redukuje na vodu [21]; oxidačním produktem KA je KDA:



V dalším sdělení týchž autorů [22] byla prezentována jednoduchá aplikace tohoto enzymu ke stanovení KA v ovoci a zelenině, založená na měření absorbance extraktu vzorku při 265 nm, a to v původním stavu a po enzymovém rozkladu KA.

Tento enzym jsme opakovaně preparovali, stanovili jsme jeho základní charakteristiky a prověřili jsme několika způsoby možnosti jeho analytického využití.

MATERIÁL A METODY

Příprava enzymu: hrachové výhonky (10–15 cm) se homogenizují s vychlazeným fosfátovým pufrům (0,05 mol.l⁻¹, pH 7,1). Po hrubé filtraci se homogenát odstředí při 10 000 g a vysoluje se síranem amonným na stupeň nasycení 55 a 80 %. Odstřeďuje se vždy 30 min při 40 000 g a snížené teplotě. Čištění bílkovinného preparátu dialýzou a na sloupci DEAE-celulose, jež autoři doporučují, se příliš neosvědčilo.

Biochemické parametry enzymu: optimální teplota 22 až 24 °C, optimální pH prostředí 6,0–7,0, hodnota Michaelisovy konstanty při 22 °C a pH 6,5, 1,9 · 10⁻⁴ mol.l⁻¹, aktivita enzymu se měnila v rozmezí 3,8–4,5 μmol KA · min⁻¹ a 1 mg bílkovin při 22 °C a pH 6,9. Enzym není stereospecifický, neboť kyselina D-isoaskorbová je jím oxidována o 22 % účinněji než L-KA.

Vliv některých enzymových stimulatorů a inhibitorů: ATP zvyšuje aktivitu o 6 %, NAD⁺ o 4 % a NADP⁺ o 10 %. Kyselina monojódová snižuje aktivitu enzymu o 86 %, p-nitrofenol o 75 % a azid sodný aktivitu neovlivňuje. Reakce enzymu s pyrogallolem je silně pozitivní, a ukazuje tak na obecnější charakter peroxidasové aktivity preparátu.

Provedení enzymové reakce: K 10 ml pufru (Na-fosfátový, 0,1 mol.l⁻¹, pH 6,9) se přidá 0,05–1 μmol KA (10–200 μg) nebo odpovídající množství extraktu nápoje v pufru a 0,3 ml roztoku enzymu v pufru (odpovídá 1 mg bílkoviny); reakce se odstartuje přidáním 6 μmol H₂O₂ a inkubuje se při pokojové teplotě po dobu 10 min při pravidelném protřepávání. Paralelně se provádí zkouška na chemickou oxidaci KA peroxidem (tj. v roztoku o stejném složení, avšak bez přítomnosti enzymu), jejíž výsledek se od enzymového testu odečítá. Reakce se zastavuje

přidáním 10 ml 10% kyseliny trichlóroctové nebo metafosforečné.

Stanovení úbytku KA po enzymové oxidaci, jež je klíčovou částí analýzy, bylo prováděno několika způsoby; 1. Titrací 2,6-dichlorfenolindofenolem (podle ČSN 56 0050).

2. Reakcí KA (aj. redukujících látek) s Fe^{3+} a kondenzací Fe^{2+} s 1,1'-dipyridylem nebo o-fenantrolinem (vzniká červené zbarvení) [5].

3. Po oxidaci KA na KDA enzymem kondenzací KDA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem [23].

4. Měřením změny absorpce roztoku v UV oblasti (240–270 nm) [21].

Uvedená stanovení byla prováděna s použitým roztokem KA, s extrakty různých nealkoholických nápojů a dále s nápoji obohacenými o standardní přísadku KA. Některé výsledky těchto analýz byly srovnávány s výsledky dosaženými při použití setu firmy Boehringer (Ascorbic acid — colorimetric method, Cat. NO. 409 677). KA se oxiduje oxidoreduktasou, redukující látky jsou v původním a v enzymově oxidovaném vzorku stanoveny reakcí s tetrazoliovou solí při spolupůsobení přenašeče elektronů methylfenaziniamethylsulfátu: měří se intenzita červeného formazanového zbarvení.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V pokusech bylo zpracováno celkem 30 různých vzorků, převážně mošty, ovocné džusy, zeleninové šťávy a práškové přípravky.

Při prověřování vhodnosti aplikace enzymu při titraci KA 2,6-dichlorfenolindofenolem (paralelně byl titrován původní extrakt nápoje a tentýž extrakt po enzymovém odstranění KA) se ukázalo, že pracovní postup je zatížen systematickou chybou, jejíž velikost vzrůstá s klesajícím obsahem vitamínu C v nápoji. Tato chyba je zřejmě důsledkem poměrně malé citlivosti titrační metody, takže množství KA, jež bylo možno tímto způsobem spolehlivě stanovit, přesahovalo oxidační kapacitu enzymu.

Mnohem úspěšněji se ověřila metoda stanovení KA (aj. redukujících látek) po oxidaci železitou solí s následnou barevnou reakcí vzniklého železnatého iontu; paralelně byly stanoveny interferenty po enzymové oxidaci KA v roztoku. Protože lze v tomto případě dosáhnout dobré relace mezi optimální koncentrací KA pro její enzymovou oxidaci i pro její reakci se železem a komplexotvorným činidlem, a protože je tato reakce zároveň značně citlivá (lze určit 0,05 μmol , tj. 9 μg KA), umožňuje zmíněná metoda spolehlivé stanovení KA v nápojích (recovery standardního přísadku KA $101,2 \pm 4,5\%$) ještě při koncentraci 2,5 mg na 100 g nápoje. Vážným úskalím této metody je neodstranitelný rušivý vliv přirozeného i umělého, zpravidla červeného zbarvení některých nápojů.

Relativně nejlepších výsledků se dosáhlo při stanovení obsahu pozitivních látek ve vzorcích 2,4-dinitrofenylhydrazinem, a to v jejich původním extraktu a v extraktu oxidovaném KA peroxidasou (tzn. po převedení KA na KDA, která dává s uvedeným činidlem červené zbarvení osazon). Recovery standardního přísadku i shoda výsledků s paralelní analýzou použitím setu Boehringer jsou uspokojivé ($101,5\% \pm 3,2$, korelační koeficient 0,88), nezbytnou podmínkou však je odstranění stop peroxidu vodíku ve slepém (enzymem neoxidovaném) vzorku. Metoda je značně citlivá, neboť dovoluje analyzovat s přijatelnou spolehlivostí nápoje s obsahem 2 mg KA ve 100 g; po zařazení dalšího kroku — redukce původní kyseliny dehydroaskorbové na KA (např. homocysteinem [24]) — je možno určit separátní obsah obou těchto složek vitamínu C.

Stanovení obsahu KA spektrofotometricky měřením extinkcí roztoků v UV oblasti (např. při 265 nm ve vodném roztoku a při 254 nm v roztoku 5% kyseliny metafosforečné) je značně citlivé, avšak spektrální měření složitějších systémů, obsahujících složky enzymu, peroxidu, pufru, event. též některé přirozené i umělé látky, jako flavonoidy, indoly, chinin apod., je komplikováno nepravdivými posuny vlnové délky pro maximální absorpční a různými interferujícími vlivy. Spektrálně enzymová metoda analýzy proto vyžaduje dodržování určitých pracovních podmínek specifických pro různé

druhy nápojů, a její použitelnost pro tento typ potravinového materiálu není tedy univerzální.

Literatura

- [1] PACHLA, L. A., PEYNOLD, D. L., KISSINGER, P. T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 1, 1985, s. 1–12
- [2] SAUBERLICH, H. E., GREEN, M. D., OMAE, S. T.: Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses. Advances in Chemistry, Ser. 200, Am. Chem. Soc., Washington, 1982, s. 199–221
- [3] SHIEH, H. H., SWEET, T. R.: Anal. Biochem. **98**, 1979, s. 1–5
- [4] MCGOWN, E. L., RUSNAK, M. G., LEWIS, C. M., TILLOTSON, J. A.: Anal. Biochem. **119**, 1982, s. 55–61
- [5] ARAKAWA, N., TSUSUMI, K., SANCEDA, N. G., KURATA, T., INAGAKI, CH.: Agric. Biol. Chem. **45**, 5, 1981, s. 1289–1290
- [6] DEVRIES, J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 6, 1983, s. 1371–1376
- [7] WILLS, R. B. H., WIMALASIRI, P., GRIENFIELD, H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 6, 1983, s. 1377–1387
- [8] TSAO, C. S., YOUNG, M. J.: Chromatog. **330**, 1985, s. 408–411
- [9] FLORIDI, A., COLI, R., FIDANZA, A. A., BOURGEOIS, C. F., WIGGINS, R. A.: Int. J. Vit. - Nutr. Res. **52**, 2, 1982, s. 194–197
- [10] ASHOOR, S. H., MONTE, W. C., WELTY, J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67**, 1, 1984, s. 78–80
- [11] WIMALASIRI, P., WILLS, R. B. H.: J. Chromatog. **256**, 1983, s. 368–371
- [12] VANDERSLICE, J. T., HIGGS, D. J.: J. Chromat. Sci. **22**, 1984, s. 485–489
- [13] KACEM, B., MARSHALL, M. R., MATTHEWS, R. F., GREGORY, J. F.: J. Agric. Food Chem. **34**, 1986, s. 271–274
- [14] MARCHESINI, A., MANITTO, P.: Inst. Sperim. Valor. Technol. Prod. Agr., Annali 1971, Vol. II, s. 1–14
- [15] POSÁDKA, P., MACHOLÁN, L.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **44**, 1979, s. 3395–3404
- [16] STEVANATO, R., ARIGLIANO, L., FINAZZI-AGRÒ, A., RIGO, A.: Anal. Biochem. **149**, 1985, s. 537–542
- [17] NAGY, G., RICE, M. E., ADAMS, R. N.: Life Sci. **31**, 1982, s. 2811–2816
- [18] TONO, T., FUJITA, S.: Agric. Biol. Chem. **45**, 12, 1981, s. 2947–2949
- [19] LIU, T. Z., CHIN, N., KISER, M. D., BIGLER, W. N.: Clin. Chem. **28**, 1982, s. 2225–2230
- [20] BEUTLER, H. O., BEISTINGEL, G.: Dtsche Lebensm.-Rundsch. **76**, 3, 1980, s. 69–75
- [21] KELLY, G. J., LATZKO, E.: Naturwissenschaften **66**, 1979, s. 617–618
- [22] KELLY, G. J., LATZKO, E.: J. Agric. Food Chem. **28**, 1980, s. 1320–1321
- [23] VAN BOEKEL, M. A. J. S., MEEUWISSEN, C. A. J. M.: J. Chromatog. **261**, 1983, s. 176–180
- [24] HOWARD, A. N., CONSTABLE, B. J.: Clin. Chim. Acta **13**, 1966, s. 387–399

Zloch, Z.: Příspěvek k enzymovému stanovení vitamínu C v nealkoholických nápojích. Kvas. prům., 32, 1986, č. 10, s. 239–241.

V práci je stručný popis přípravy enzymu askorbátperoxidasy a přehled optimálních podmínek pro jeho aplikaci ke specifické a kvantitativní oxidaci kyseliny askorbové v extraktech různých nealkoholických nápojů. Spojením této oxidace s běžnými způsoby stanovení vitamínu C se zachovává jednoduchost provedení analýzy, avšak zvyšuje se specifita metody. Na základě hodnocení několika analytických způsobů a srovnání jejich výsledků s výsledky dosaženými použitím renomovaného setu firmy Boehringer (Mannheim) se doporučují dvě různé modifikace stanovení vitamínu C v nápojích: redukce železitě soli v původním a v enzymově oxidovaném vzorku a kolorimetrické stanovení železnaté soli (pro málo barevné nápoje) a kolorimetrické stanovení 2,4-dinitrofenylosazonů v původním a v enzymově oxidovaném vzorku. Oběma metodami lze spolehlivě určit vitamín C v množství 3 mg na 100 g nápoje.

Злох, З.: К энзимному определению витамина С в безалкогольных напитках. Квас. прум. 32, 1986, № 10, стр. 239–241.

В работе вкратце описан способ получения энзима аскорбатпероксидазы и дан краткий обзор по оптимальным условиям для его применения в целях специфичного и количественного окисления аскорбиновой кислоты в экстрактах разных безалкогольных напитков. Объединением этого окисления с обычно применяемыми способами определения витамина С сохраняется несложность проведения анализа, однако повышается специфичность метода. На основе оценки нескольких аналитических способов и сопоставления их результатов с результатами, полученными с применением известного

устройства ф-ы Бэрингер (Манхайм) рекомендуются две разные модификации определения витамина С в напитках: восстановление солей трехвалентного железа в исходном и в ферментативно окисленном образцах и колориметрическое определение соли дивалентного железа (для мало окрашенных напитков) и колориметрическое измерение 2,4-динитрофенилосазонов в исходном и в ферментативно окисленном образцах. При помощи обоих методов можно надежно определить витамин С в количестве 3 мг/г напитка.

Zloch, Z.: Contribution to Enzymatic Determination of Vitamin C in Non-Alcoholic Beverages. Kvas. prům. 32, 1968, No. 10, pp. 239—241.

A brief description of the ascorbat peroxidase preparation and the optimum conditions for its application for specific and quantitative oxidation of ascorbic acid in extracts of various non-alcoholic beverages is made in the article. This oxidation in connection with usual methods of the vitamin C determination results in the simplicity of this analysis while its specificity is increased. Some analytical procedures were tested. A comparison of these results with those obtained by the Boehringer (Mannheim) test two different modification for the vitamin C determination in beverages are recommended: the reduction of ferric salt in the original and in the enzyme-oxidized samples and the colorimetric determination of ferrous salt (for slightly coloured beverages) and the colorimetric measurement of 2,4-dinitrophenylosazones in the original and in the en-

zymeoxidized samples. Both the methods can be used for the determination of about 3 mg of vitamin C in 100 g of the beverage.

Zloch, Z.: Beitrag zu der enzymatischen Bestimmung des C-Vitamins in alkoholfreien Getränken. Kvas. prům. 32, 1968, Nr. 10, S. 239—241.

In dem Artikel wird zusammenfassend die Zubereitung des Enzyms Ascorbatperoxidase beschrieben und die Übersicht der optimalen Bedingungen für seine Applikation zur Spezifischen und quantitativen Oxidation der Askorbinsäure in Extrakten verschiedener alkoholfreier Getränke gegeben. Durch die Verbindung dieser Oxidation mit den geläufigen Methoden der Bestimmung des C-Vitamins wird die Einfachheit der Analysedurchführung eingehalten, aber es erhöht sich die Spezifität der Methode. Aufgrund der Auswertung mehrerer analytischer Verfahren und des Vergleichs ihrer Ergebnisse mit den Ergebnissen, die bei Anwendung des renommierten Sets der Firma Boehringer (Mannheim) erzielt wurden, werden zwei verschiedene Modifikationen der Vitamin-C-Bestimmung in Getränken vorgeschlagen: die Reduktion des Eisensalzes in der ursprünglichen und in der enzymatisch oxidierten Probe und die kolorimetrische Bestimmung des Eisensalzes (für wenig farbige Getränke) und kolorimetrische Messung der 2,4-Dinitrophenylosazone in der ursprünglichen und in der enzymatische oxidierten Probe. Mittels beider Methoden kann das C-Vitamin in Mengen von 3 mg pro 100 g des Getränkes verlässlich bestimmt werden.