

adsorbujúce srážadlo antocyanidných a karotinoidných farbív v smesi oxalátu sódného a zásaditého octanu olovnatého, dávajúca veľmi dobré výsledky.

Literatúra:

1. Gigena i Sanit: 12, č. 10, 30-2 (1947)
2. Rosenberg: Chemistry and Physiology of the Vitamins.
3. Dr. Ing. Majer: Polarografie.
4. Dr Lunde: Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln.
5. Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse. Spezielle Analyse II. Teil — Organische Stoffe II.
6. Analytical chemistry (1949)
7. Chem. Abstract: 43, 1822, (1949)

Vitamíny vo výžive a ich analytické stanovenie

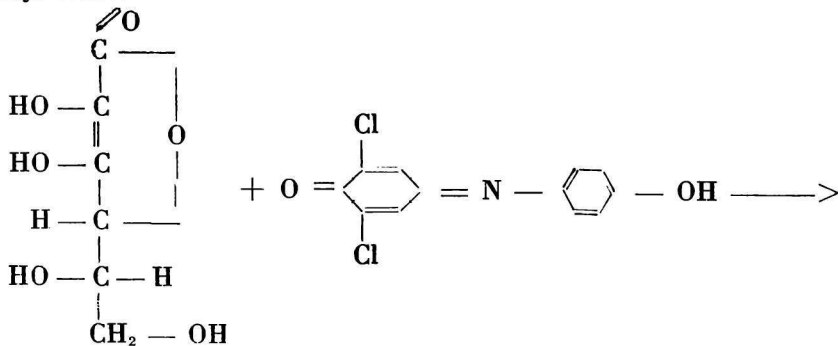
DANICA ZUFFOVA

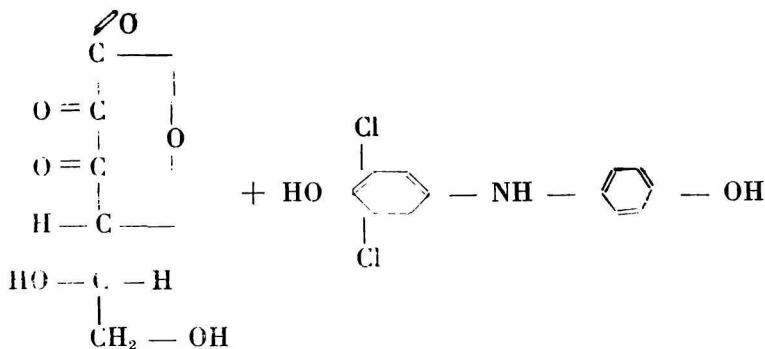
(Pokračovanie)

Metóda jodometrická (titruje sa n/10 jódom) hodí sa len na stanovenie čistých preparátov, nie však pre rastlinný a živočíšny materiál, obsahujúci mnoho iných oxydovateľných látok.

Z chemických metód je najrozšírenejšia metóda Tillmansonova, ktorú pokladáme za konvenčnú. Táto metóda používa na stanovenie vitamínu C 2,6-dichlórfenol-indofenol. Indofenolové farbivo redukuje však okrem askorbovej kyseliny aj sulfhydrylové slúčeniny, tiosulfát, pyridínové slúčeniny, redukovaná forma nikotínovej kyseliny a riboflavínu atď. Aj anorganické ferro- a ferri- slúčeniny interferujú so stanovením. V pive, slade, droždí a inde našli organické redukujúce látky, ktoré reagujú celkom rovnako s indofenolom ako askorbová kyselina. Väčšinou sú to cukorné deriváty, ktoré vznikly účinkom alkálií. Označujeme ich ako reduktóny.

Pri tejto reakcii sa vit. C oxyduje a 2,6-dichlórfenol-indofenol redukuje takto:





Určité množstvo askorbovej kyseliny v roztoku, najmä keď dlhšie stojí, prejde na dehydrokyselinu. Aby sme aj toto množstvo mohli stanoviť, treba uskutočniť najskôr redukciu, obyčajne sírovodíkom pri pH 4–7, s nasledujúcim odstránením jeho prebytku prehánaním inertného plynu cez roztok. Rozdiel stanovení pred a po redukcii udáva množstvo dehydrokyseliny. Stanovenie po redukcii udáva celkové množstvo biologicky účinnej askorbovej kyseliny. Pri stanovení vit. C v čerstvom rastlinnom materiáli môžeme redukciu zanedbať pre nepatrné množstvo dehydroaskorbovej kyseliny (jej množstvo stúpa až pri spracovaní alebo uskladnení). Autori King a Smitha úplne zavrhujú použitie redukcie. Udvávajú, že niektoré v extrakte prítomné látky, ako sú aldehydy, ketóny a chinóny, dávajú so sírovodíkom slúčeniny, reagujúce podobne ako vitamín C. Čerstvý materiál musí sa hneď extrahovať organickými kyselinami, ako je octová, trichlóroctová, oxalová a iné, aby sa snížili straty vit. C. Je prípustné z anorganických kyselín použiť i kys. metafosforečnú. Aj titráciu musíme uskutočniť ihneď, keďže stáťím vo vodnom roztoku, i keď je kyslý, vit. C sa oxyduje. Mieru tejto oxydácie sme si overili týmto pokusom:

Prípravili sme citrónový výluh v octovej kyseline a sledovali sme klesanie obsahu vit. C vždy po 24 hod.:

v čerstvých plodoch	54,77 mg/100 g
po jednom dni	42,39 mg/100 g
po 2 dňoch	26,71 mg/100 g
po 3 dňoch	8,72 mg/100 g
po 4 dňoch	1,77 mg/100 g

Citlivosť 2,6-dichlórfenol-indofenolovej metódy je uspokojivo dobrá. V niektorých prípadoch je však jej použitie obmedzené, alebo sa musí pracovný postup upraviť. Je to u farebných roztokov červených čerešní, jahôd, malín, cvikly, červenej kapusty a i.

Pre tieto roztoky vypracoval Bessey (1948) kolorimetrickú metódu, založenú na stanovení nadbytku indofenolu. Postupuje tak, že k farebnému roztoku pridá známe, ale prebytočné množstvo 2,6-dichlór-fenol-indofenolu, ktoré sa potom vytrepe do xylénu alebo iného organického rozpúšťadla a stanoví sa kolorimetricky. Metóda je založená na skutočnosti, že prirodzené farbivo rastlinného materiálu okrem karotínu ostáva vo vodnej vrstve a len 2,6-dichlór-fenol-indofenol prejde do extrahovadla. Ani v tomto prípade sa však nevyhneme vplyvu reduktónov.

M a p s o n (1943) odporúča metódu, pri ktorej oddeľuje reduktóny od askorbovej kyseliny pomocou formaldehydu. Princíp je založený na kondenzácii askorbovej kyseliny s formaldehydom. Tento autor tvrdí, že nenašiel látky reduktónového typu ani v čerstvom rastlinnom materiáli ani v pokrmoch, varených pri miernej teplote, ak pH neprekročilo 8.5.

R o b i n s o n a S t o c zistili rušivý účinok reduktónov v potravinárskych výrobkoch len ak boli vystavené vysokej teplote alebo dlhodobému uskladneniu. Pravda, kým nie je známa presná povaha reduktónov u rôznych druhov potravín, formaldehydová metóda nemôže sa uvádzať ako všeobecná metóda na stanovenie vitamínu C vedľa reduktónov. Dosiaľ sa osvedčila len pri niektorých druhoch rastlinného materiálu. Často sa stáva, že látky reduktónového typu, napr. aj hydrochinón, reaguje s formaldehydom rovnako ako askorbová kyselina (brusnice). V týchto prípadoch môžeme pozorovať zaujímavý zjav, ako by obsah vitamínu C uskladnením stúpal.

Iné metódy vypracovali Reo, Mills, Darmon a Oesterling, ktorí stanovujú vedľa seba askorbovú kyselinu, dehydroaskorbovú kyselinu a diketogulónovú kyselinu. Metóda je založená na tomto princípe: Diketogulónová kyselina je druhým oxydačným stupňom askorbovej kyseliny a nie je redukovateľná sírovodíkom. Kopuluje sa však s dinitrofenylhydrazínom. Dehydroaskorbová kyselina sa redukuje sírovodíkom a askorbová kyselina sa s dinitrofenylhydrazínom nesráža, len po oxydácii brómom na diketogulónovú.

Tento postup má poukázať na najužšiu možnú súvislosť medzi jednotlivými oxydačnými stupňami vitamínu C. Kyselina diketogulónová nemá biologický účinok

Táto metóda by mala určitú prednosť, keďže dáva možnosť kontrolovať zmeny obsahu askorbovej kyseliny v čerstvých produktoch, konzervách a za uskladnenia, lebo súčet jednotlivých oxydačných produktov s askorbovou kyselinou by mal byť konštantný a mal by sa meniť len pomer jednotlivých složiek s postupom oxydácie. Avšak kým hodnoty vitamínu C, nájdené metódou Tillmansovou, s časom uskladnenia klesajú (čo je v súhlase s jeho extrémnou citlivosťou voči vzdušnému kyslíku vo vodnom roztoku), hodnoty, nájdené metódou dinitrofenylhydrazínovou, buď ostávajú konštantné alebo s časom uskladnenia stúpajú. Tak nájdeme v tabuľke:

Druh	% askorbovej kys.	% d. a. k.	% d. g. k.	súčet
broccoli				
čerstvé plody	84,5	10,5	3,5	98,5
mrazené	105,0	7,3	1,0	113,3
paradajky				
čerstvé plody	5,75	1,9	0,6	8,25
konzervované	11,0	0,7	—	11,7
konzervované	17,0	—	—	17,0
sušené	1,23	28,0	12,3	41,53
šťava	8,0	10,0	6,0	24,0
špenát				
čerstvý	26,0	2,9	—	28,9
konzervovaný	17,6	1,9	0,5	20

Cellkový súčet by sa pri tejto metóde nemal meniť a rozhodne by nemal stúpať. Tu však vidíme stúpanie obsahu samej askorbovej kyseliny počas mrazenia, respektíve po ňom.

Nedostatok vitamínu C zapríčiňuje v organizme značné poruchy. Dnes sa pociťuje viac-menej len na jar a prejavuje sa pocitom malátnosti a únavy ako takzvaná jarná únava.

Organizmus, pri ktorom nie je dostatočne postarané o dodávanie vitamínu C, je málo odolný voči chorobám.

Rozoznávame tri druhy hypovitaminózy:

1. exogenného pôvodu, kde strava neobsahuje nijaké alebo len minimálne množstvo askorbovej kyseliny;

2. endogenného pôvodu, kde sa kladie zvýšená požiadavka na prívod vitamínu C pre chorobný stav, telesný vzrast, vysoký vek, ťažkú telesnú prácu;

3. enterogenného pôvodu, kde veľké kvantá vitamínu C, podaného organizmu, hynú pre chybnú resorpciu alebo pôsobením patologickej flóry bakteriálnej zažívacieho traktu.

Keďže ľudský organizmus nie je schopný syntetizovať vitamín C, celá spotreba musí sa dodať v potravinách, zvlášť zeleninou a ovocím v čerstvom stave. Táto spotreba je u priemerného človeka 50 až 60 mg denne.

Z týchto čísel vidíme, že vitamín C je vlastne potravou ľudského organizmu a jeho minimálna potreba je 100 až tisíckrát väčšia než u iných vitamínov. Treba zdôrazniť, že vitamín C sa má dodávať ľudskému organizmu v prvom rade v podobe čerstvého ovocia a zeleniny a len ak to chorobný stav organizmu vyžaduje, podávať syntetický vitamín. Totiž vitamín C v rastlinách prináša so sebou aktivátor, ktorý ho robí fyziologicky účinným a ktorý syntetický vitamín neobsahuje.

Skupina B — vitamínov.

Do skupiny vo vode rozpustných vitamínov patria ďalej vitamíny skupiny B. Z nich sa budeme v ďalšom zaoberať len vitamínom B₁, tiamínom čiže aneurínom.

Vitamín B₁ vyskytuje sa v mnohých druhoch produktov rastlinného i živočíšneho materiálu. Zvlášť bohatým zdrojom je zelený hrášok a bôb. V hojnom množstve je aj v obilných klíčkoch a kvasniciach.

Niektoré mikroorganizmy sú schopné syntetizovať aneurín, napr. istý druh baktérií v zažívacom trakte potkanov.

V živočíšnom organizme sa tiamín vyskytuje prevažne v pečeni, v obličkách a v hladkom svalstve.

Keďže je vitamín B₁ rozpustný vo vode, izoluje sa z ryže alebo kvasníc studenou vodou, okyslenou minerálnou kyselinou na pH asi 4,5. Z vodného roztoku sa vitamín adsorbuje na aktívnom uhlí pri pH 6,5; za týchto podmienok súčasne prítomný riboflavín zostáva v roztoku. Z aktívneho uhlia sa extrahuje zriedenými kyselinami. Pri tomto postupe sa veľa aneurínu stráca. Ak však použijeme na extrakciu roztoky chinínových solí alebo solí iných organických báz, získa sa asi pätnásobok, t. j. 90% celkového vitamínu.

Riboflavín môžeme oddeliť od tiamínu aj srážaním neutrálneho alebo slaboo alkalického roztoku octanom olovnatým, pričom aneurín zostáva v roztoku. Najčastejšie sa získaný vitamín B₁ prevádza na hydrochlorid (bežne predajný), ktorý je veľmi dobre rozpustný vo vode a v alkohole, nerozpustný v chloroforme, étere, benzéne a acetóne. Opticky je inaktívny. Kryštalizuje z alkoholických roztokov ako semihydrát. Voľná báza sa dá získať účinkom kyslíčnika striebra z chlórhydrátu. Kryštálčky vitamínu B₁, ako aj roztok, majú slabú vôňu kvasníc.

Spektrum v ultrafialovom svetle pri pH 7 má dve čiary pri 235 a 267 milimikrónoch, kým pri pH 5,5 len 1 medzi 245 a 247 milimikrónoch vlnovej dĺžky. Z toho vidíme, že spektrum aneurínu je funkciou koncentrácie vodíkových iónov. Toto je zavinené pyrimidínovým kruhom v molekule.

Vitamín B₁ je celkom stály v silne kyslom prostredí. Čistý aneurínhydrochlorid vo vodnom roztoku pri pH 3,5 môže byť zahrievaný až na 120° bez rozkladu. V neutrálnom alebo v alkalickom prostredí je veľmi citlivý vôči teplote. Jeho antineuritická účinnosť sa varením potravín len málo ničí. To sa vysvetľuje tým, že viazaný aneurín nie je taký citlivý ako voľný.

Inak vitamín B₁ je rovnako citlivý na oxydáciu i redukcii. Slabou oxydáciou sa tvorí tiochróm, miernou redukciiou prechádza na dihydroformu.

Priemyselne sa získava buď úplnou syntézou alebo z prirodzených prameňov, čo je síce drahšie, ale priemyselne sa ešte prevádza.

Prvá syntéza aneurínu sa uskutočnila kondenzáciou 4-metyl-5-beta-oxetyl-tiazolu a 2-metyl-4-amino-5-brómmetyl-pyrimidínu.

Vznik tiamínu v rastlinnom organizme nie je známy. Súdi sa, že tiazolový kruh v molekule vitamínu B₁ vzniká fermentáciou β -amino- β -propiónovej kyseliny, ktorá môže vzniknúť z metyonínu, acetaldehydu a amoniaku. Kvasnice majú schopnosť previesť derivát aminopropiónovej kyseliny tiazolu na 4-metyl-5-tiazol vitamínu B₁.

Rastliny, rastúce v tme, majú malý obsah tiamínu. Účinkom svetla jeho obsah značne stúpa. Všetky vyššie rastliny sú schopné syntetizovať tiamín (paradažky vo výhonkoch).

Oxydáciou prechádza vitamín B_1 na tiochróm, žltú látku intenzívne modrej fluorescencie. Vzniká aj stáťím z vitamínu B_1 v alkoholickom roztoku pri obyčajnej teplote, ale až po niekoľkých mesiacoch. Pri pH 2 vzniká málo tiochrómu, pri pH 7 je oxydácia veľmi rýchla. Vzniká aj účinkom manganistanu draselného alebo oxydov mangánu, potom oxydáciou alkalických roztokov ferrikyanidom draselným, peroxydom vodíka a podobne. Rovnakú látku izoloval Kuhn z kvasníc.

Absorpčné spektrum tiochrómu je pri vlnovej dĺžke 358 a 375. Mechanizmus oxydácie aneurínu nie je presne známy. Je pravdepodobné, že vzniká najprv medziprodukt.

Synteticky pripravili veľa slúčenín málo odlišnej štruktúry ako má vitamín B_1 . Len jedna z nich je biologicky účinná, aj to len vo väčších dávkach. Je to 6-metyl derivát.

Nedostatok vitamínu B_1 v organizme sa prejavuje nechúťou k jedlu, únavou, nervozitou a klopaním srdca. U potkanov vyvoláva aj sinusbradykardiu, prejavujúcu sa snížením tepu až na polovicu normálu.

Metódy na stanovenie tiamínu sú chemické, biochemické, biologické a fyzikálne. Najmodernejšia je metóda polarografická. Zakladá sa na katódickej redukcii vitamínu pri pH 7,35 v prostredí fosfátového regulátora. Vylučovanie sa začína od — 1,6 V, pH musí sa presne dodržať, lebo výška vlny závisí aj od koncentrácie vodíkových iónov v roztoku. Pri pH 8.3 je vlna aneurínu približne 100-krát menšia. Chemické metódy sú založené väčšinou na oxydácii vitamínu na tiochróm a nasledujúcom meraní intenzity fluorescencie. Najbežnejšia je metóda Jansenova. Aneurín sa oxyduje ferrikyanidom v alkalickom prostredí na tiochróm, ktorý sa extrahuje do izobutylalkoholu za vzniku modrej fluorescencie. Intenzita fluorescencie sa stanoví buď kolorimetricky, t. j. v predchádzajúcom svetle, alebo fluorimetricky, t. j. v odrazenom svetle.

Oxydácia sa prevádza pri pH 10. Intenzita fluorescencie je funkciou koncentrácie vodíkových iónov v roztoku a množstva prítomného tiochrómu. Prebytok ferrikyanidu rýchlo rozrušuje vzniknutý tiochróm rovnako ako pôsobenie svetla. Treba však poznamenať, že len voľný vitamín možno stanoviť touto metódou. Lebo len z voľného vitamínu oxydáciou vzniknutý tiochróm možno extrahovať organickými rozpúšťadlami. V prípade, že aneurín je viazaný na látky cukornej povahy, musíme porušiť väzbu pomocou taka-díastázy. Niekedy modrá fluorescencia aneurínu je rôzne zafarbená, čo je zapríčinené prítomnosťou iných fluoreskujúcich látok. Toto napr. vidíme pri zelenom hrášku. Pri priamej oxydácii výluhu alkalickým ferrikyanidom vznikne pomarančovočervená fluorescencia; keď však najprv uskutočnime extrakciu izobutanolom a len potom oxydujeme vodnú vrstvu, vystúpi v ultrafialovom svetle typická modrá fluorescencia tiochrómu.

Pre vysokofarebný materiál sa veľmi dobre hodí ako extrahovadlo smes kyseliny soľnej a acetónu a vyčerenie roztoku sa prevedie pomocou celitového filtru.

Kinnersley a Petters vypracovali kolorimetrickú metódu. Je založená na účinku diazo-benzén-sulfónovej kyseliny na vitamín B₁, ktorý s formaldehydom dáva červené zafarbenie. Keďže touto reakciou je atakovaná 4-amino-skupina pyrimidínového jadra, je zrejmé, že vitamín s blokovanou amino-skupinou alebo tiochróm nebude dávať túto reakciu. Táto metóda sa dá aplikovať len na veľmi čisté roztoky vitamínu. Prítomnosť redukujúcich látok interferuje s farbou, vzniknutou z aneurínu.

Prebluda a McCollum vypracovali inú kolorimetrickú metódu. Diazotovaný p-amino-acet-anilid, p-amino-aceto-fenón alebo metyl-p-amino-aceto-fenón dávajú s tiamínom červené farbivo, špecifické pre vitamín B₁, ktoré sa dá extrahovať organickými rozpúšťadlami, ako je xylén, acetón, izobutanol a iné. Citlivosť reakcie stúpa v prítomnosti fenolu alebo etanolu, prípadne oboch.

Willsteadt navrhuje použiť 2,4 dichlór-benzén-diazónium-chlorid s nasledujúcou extrakciou vzniknutého žltočerveného farbiva éterom a oddelením vedľajších produktov adsorpciou na hydroxyde vápenatom. Táto metóda bola upravená pre rýchle stanovenie s diazotovanou sulfanilovou kyselinou pred a po pridaní ferrikyanidu. Rozdiel medzi najdenými hodnotami udáva množstvo vitamínu B₁. Aj fosfor-derivát aneurínu dáva zafarbenie, ale toto farbivo sa nedá extrahovať organickými rozpúšťadlami.

Gravimetrické stanovenie je založené na vzniku pomarančovočervenej srazeniny, vzniknutej reakciou s vizmut-kálium-jodidom.

Vitamín B₁ nie je toxický ani v množstvách niekoľko tisíckrát väčších než je normálna denná dávka. Hypervitamínózu vitamínom B₁ dosiaľ nepozorovali. Množstvo aneurínu, potrebné pre ľudský organizmus, nie je konštantné, ale je funkciou uhradenej potravy, intenzity metabolizmu, vonkajšej teploty a iných okolností. Strávené uhľohydráty zvyšujú a tuky snižujú množstvo vitamínu B₁, potrebného pre organizmus, kým proteíny ho neovplyvňujú.

Z uvedeného vidíme, že je veľmi ťažko určiť dennú dávku aneurínu pre človeka. Priemerne sa pohybuje od 1 do 2,5 mg. Každý živočíšny organizmus potrebuje, aby sa mu vitamín dodával v potrave. Výnimku tvoria len ovce a hovädzí dobytok, keďže vzniká syntézou baktériami v ich zažívacom trakte.

Vitamíny, o ktorých bola až dosiaľ reč, vyznačujú sa ľahkou rozpustnosťou vo vode a označujeme ich aj ako „vitamíny vo vode rozpustné.“

(Dokončenie v budúcom čísle).