

اندازه‌گیری میزان ویتامین ث با روش تیتراسیون دو مرحله‌ای اکسیداسیون - احیا در انواع مرکبات

میترا محمودی (Ph.D.)***

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)**

محمدعلی ابراهیم‌زاده (Ph.D.)*

سیدمسعود حسینی (M.ST.)***

محمدرضا قایخلو (M.ST.)***

چکیده

سابقه و هدف: شواهد حاکی از آن است که مصرف میوه‌ها به علت دارا بودن مواد آنتی‌اکسیدانت، از قبیل ویتامین ث خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان را کاهش می‌دهند. از آنجا که مرکبات منبع غنی از این ویتامین می‌باشند، این مطالعه مقدار این ویتامین را در برخی گونه‌های پر مصرف مرکبات اندازه‌گیری می‌کند.

مواد و روش‌ها: سیزده گونه رسیده و پر مصرف مرکبات از باغ‌های تحقیقاتی فجر ساری تهیه و میزان ویتامین ث با روش تیتراسیون دو مرحله‌ای اکسیداسیون - احیا اندازه‌گیری شد. اطلاعات به دست آمده با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی آنالیز شد.

یافته‌ها: میانگین ویتامین ث در تمامی میوه‌ها $18/3 \pm 85/4$ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه (با محدوده ۵۷/۹ تا ۱۳۱/۶) بود. بیش‌ترین مقدار این ویتامین در پرتقال شهسواری، $4/2 \pm 131/6$ ، و پرتقال خونی سانگینولا $2/2 \pm 100/7$ میلی‌گرم و کم‌ترین مقدار آن در تانجلو، $2/3 \pm 57/9$ و نارنگی $2/2 \pm 70/2$ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه بود. ارتباطی بین مقدار ویتامین ث و اسید سیتریک موجود در آب میوه یافت نشد.

استنتاج: بین میزان ویتامین ث در انواع مرکبات مورد تحقیق در این مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. به منظور دریافت مقدار بیش‌تری از ویتامین ث از طریق رژیم روزانه، مصرف مرکبات حاوی ویتامین ث بیش‌تر، پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین ث، تیتراسیون، مرکبات

مقدمه

(۱-۴). این آثار بیولوژیک مربوط به ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از قبیل ویتامین ث می‌باشد که از تخریب بافت‌ها توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (۵-۲).

بررسی‌ها نشان می‌دهد، مصرف میوه و سبزیجات موجب کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، و فرایندهای تخریبی در بافت‌های بدن می‌شود

E این تحقیق طی شماره ۳۲-۸۳ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه مازندران انجام شده است.

* استادیار شیمی دارویی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** استادیار داروسازی هسته‌ای، عضو هیأت علمی (استادیار)، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** مهندس کشاورزی، کارشناس تحقیق و توسعه شرکت فجر
* ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده داروسازی
*** استادیار فارماکولوژی، عضو هیأت علمی (استادیار)، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

E تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۳/۱۰/۱ تاریخ تصویب: ۸۳/۷/۱۴

شود تا با توجه بیش تر به این اختلاف در انواع میوه‌ها، در ارائه رژیم‌های غذایی سرشار از ویتامین ث در پیش‌گیری از انواع بیماری‌ها موفق تر از همیشه عمل نمایند.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها:

نمونه‌ها از ۱۳ نوع مرکبات رسیده شامل؛ پرتقال (تامسون، ایتالیائی، بیروتی، بی‌اسید، شهبواری، خونی سانگینولا و خونی مورو)، تانجلو، نارنگی معمولی و نارنگی یافا یا کلمانتین، لیمو شیرین، نارنج و گریپ فروت از نهالستان تحقیقات بنیادسازی در طی سال ۱۳۸۳ تهیه شد. از آنجا که مقدار ویتامین ث در مراحل مختلف رشد میوه متفاوت می‌باشد، از میوه‌های رسیده نمونه‌ها انتخاب شدند. شاخص رسیده بودن با اندازه‌گیری مقدار قند (با اندازه‌گیری میزان فروکتوز با رفرکتومتری) و اسیدیته میوه (با تیتراسیون مستقیم حجم معینی از آب میوه با سود با غلظت) مشخص شد. مناسب‌ترین زمان (حالت رسیده) در هر گونه زمانی بود که نسبت قند به اسیدیته در محدوده ۷ تا ۹ بود. از هر میوه ۳ بار نمونه‌گیری شده و در هر نمونه عمل سنجش ۳ بار تکرار شد. از آنجا که شرایط کشت، اعم از آب، خاک، رطوبت، تازگی زمان چیدن میوه و میزان رسیده بودن در میزان مواد موجود در میوه‌ها، تاثیر به سزایی داشته و روند مطالعه را با مشکلات زیادی روبرو می‌نمود، طرح عملیاتی این تحقیق در غیاب اطلاعات قبلی، به عنوان یک مطالعه اولیه و مقدماتی طراحی شد. بنابراین سعی گردید با انتخاب کلیه میوه‌ها از یک منطقه زراعی، بسیاری از پارامترها یکسان و امکان مقایسه بین گونه‌های مختلف فراهم شود. و نیز با تعیین روزانه نسبت قند به اسید در مطلوب‌ترین زمان رسیدن، جمع‌آوری

مقدار اسکوریبیک اسید (ویتامین ث) یک شاخص اساسی برای تعریف ارزش تجاری میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد (۶). مقدار توصیه شده این ویتامین، ۶۰ میلی‌گرم روزانه می‌باشد اما، مصرف روزانه، ۱۲۰ میلی‌گرم جهت کاهش بیماری‌های مزمن مانند سرطان پیشنهاد می‌گردد (۵). کمبود این ویتامین در بدن موجب بروز بیماری‌های زیادی از جمله، اسکوربوت می‌شود. عقیده بر آنست که این ماده به عنوان حد واسط در بیوستنز و متابولیسم برخی مواد که در سیستم ایمنی بدن دخالت دارد شرکت می‌کند (۷). فرایندهای اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های مزمن از قبیل تصلب شرائین و سرطان دارند. در این فرایندها، تولید اکسیژن نوزاد موجب تخریب بافتی و تغییر ساختمان و عملکرد تقریباً تمامی بیومولکول‌ها (از قبیل چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه) می‌شود. بدن انسان مکانیسم‌های متعددی برای محافظت از این ذرات فعال دارد، آنزیم‌هایی از قبیل کاتالاز، سوپر اکسید دیس موتاز و آنزیم‌های ترمیم‌کننده، مانند DNA گلیکوزیلاز و آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل اسکوریبیک اسید (ویتامین ث)، آلفا توکوفرول (ویتامین E) و بتا کاروتن‌ها از جمله این مکانیسم‌ها می‌باشند (۸). ویتامین ث می‌تواند آلفا توکوفرول را از رادیکال توکوفرول که از واکنش با سایر رادیکال‌ها تشکیل شده، مجدداً تولید نماید. این ویتامین در تولید فرم احیاشده گلوکاتایون نیز نقش دارد. ماده اخیر اکسیژن نوزاد را در سیستم تنفسی نابود می‌کند (۹، ۱۰). مرکبات، به عنوان یک منبع غنی از ویتامین ث شناخته شده است، اما اختلاف قابل ملاحظه‌ای در میزان این ویتامین در انواع مرکبات وجود دارد. از آنجا که تاکنون این اختلاف بررسی نشده است، میزان ویتامین ث در سطح ۱۳ گونه پرمصرف مرکبات بررسی می‌شود تا ضمن افزایش اطلاعات عموم خوانندگان، گامی کوچک در افزایش سطح اطلاعات متخصصین علم تغذیه برداشته

میوه‌ها انجام شد و تنها از میوه‌های تازه چیده شده (به جهت برخورداری از حداکثر ویتامین ث) استفاده شد. با این اقدامات در حد امکان به بهترین وجه شرایط یکسانی در مقایسه این میوه‌ها با یکدیگر ایجاد گردید. کلیه مواد شیمیائی مورد نیاز این تحقیق از کارخانه مرک خریداری شد.

تعیین مقدار ویتامین ث با روش تیترومتری با ید، پتاسیم یداید و پتاسیم یدات در حضور معرف نشاسته توسط بسیاری از محققین گزارش شده است. سهولت انجام این روش و ارزانی مواد مورد نیاز جهت سنجش از سایر مزایای این روش می‌باشد (۷). روش پذیرفته شده در فارماکوپه‌های آمریکا (USP) و اروپا^۱ نیز همین روش می‌باشد (۱۲، ۱۱). بر این مبنا، در این تحقیق نیز از روش تیتراسیون استفاده شده است.

محلول تیو سولفات سدیم با غلظت ۱۰ میلی‌مول بر dm^3 ، محلول یدید پتاسیم با غلظت ۵ میلی‌مول بر dm^3 و محلول یدات پتاسیم با غلظت ۱ میلی‌مول بر dm^3 تهیه شد.

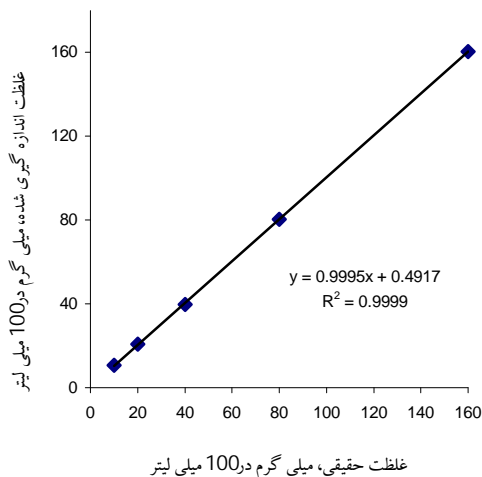
انجام تیتراسیون با استفاده از محلول تیوسولفات سدیم در محیط اسیدی در حضور معرف نشاسته صورت پذیرفت. نقطه پایان تیتراسیون با بی‌رنگ شدن (از رنگ بنفش پررنگ اولیه) مشخص گردید. محاسبه میزان ویتامین ث با در دست داشتن مول ید تیترا شده با محلول تیوسولفات سدیم انجام پذیرفت. ابتدا از حجم تیوسولفات مصرفی، تعداد مول آن را محاسبه، و از این طریق میزان ید وارد واکنش شده با محلول تیوسولفات در خلال تیتراسیون محاسبه شد. تعداد ید وارد واکنش شده با ویتامین ث از تفاوت میزان ید تیترا شده با محلول تیوسولفات و کل ید آزاد شده در روند واکنش، که خود براساس حجم مصرفی محلول تیوسولفات و غلظت

مولی آن قابل محاسبه است، به دست آمد. از تعداد مول‌های ید، تعداد مول‌های ویتامین ث تعیین و با توجه به حجم آب میوه اولیه، تعداد مول اسید اسکوربیک (ویتامین ث) در لیتر محاسبه شد. از ضرب عدد حاصل در $174/2$ (وزن مولکولی ویتامین ث) مقدار این ویتامین به صورت گرم در لیتر محاسبه و سرانجام به صورت میلی‌گرم در 100 میلی‌لیتر گزارش شد (۱۳). عمل تیتراسیون با محلول حاوی غلظت‌های مشخص از ویتامین ث استاندارد (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در 100 میلی‌لیتر) تکرار شده و پس منحنی استاندارد رسم گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌سویه (ANOVA) و متعاقب آن تست توکی انجام پذیرفت. نتایج بر اساس میانگین بیان گردید. نتایج با احتمال کمتر از 0.05 ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش دهم انجام شد.

یافته‌ها

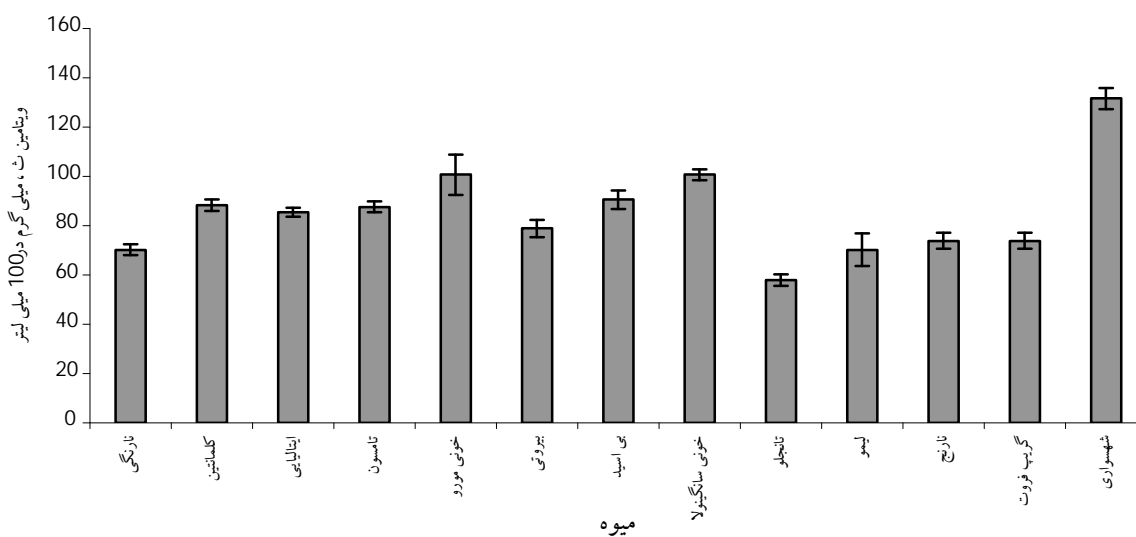
نمودار شماره ۱ منحنی استاندارد تیتراسیون ویتامین ث با غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. میزان ویتامین ث با روش تیتراسیون دو مرحله‌ای تعیین شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد و محاسبه معادله خط، ضریب تعیین بالایی به دست آمد ($r^2 = 0.9999$, $F = 3.77$). نمودار شماره ۲ میزان ویتامین ث اندازه‌گیری شده را در نمونه‌ها نشان می‌دهد. پرتقال شهبازی با $131/6 \pm 4/2$ و خونی سانگینولا با $100/7 \pm 2/2$ میلی‌گرم ویتامین ث در 100 میلی‌لیتر آب میوه به ترتیب دارای بیشترین مقدار ویتامین و تانجولو با $57/8 \pm 2/3$ و نارنگی معمولی با $70/2 \pm 2/2$ میلی‌گرم ویتامین ث در 100 میلی‌لیتر آب میوه نیز کم‌ترین میزان ویتامین ث را دارا بودند ($P < 0.001$). میزان اسید سیتریک این میوه‌ها نیز با

1. European Pharmacopoeia



یکدیگر مقایسه شد. پرتقال مورو با $2/2 \pm 0/2$ و نارنج با $1/7 \pm 0/2$ و پرتقال بی اسید با $0/3 \pm 0/1$ و لیمو با $0/43 \pm 0/1$ میلی گرم در 100 میلی لیتر آب میوه به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار اسید سیتریک بودند. میانگین اسید سیتریک در کلیه میوهها $1/2 \pm 0/2$ میلی گرم در 100 میلی لیتر آب میوه به دست آمد. از نظر آماری ارتباط معنی داری بین میزان ویتامین ث و اسید سیتریک میوهها مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نمودار شماره ۱: ارتباط بین غلظت حقیقی ویتامین ث (X) در مقابل غلظت اندازه گیری شده (Y) با استفاده از روش تیتراسیون.



نمودار شماره ۲: مقدار ویتامین ث اندازه گیری شده در انواع مرکبات

بحث

وجود ویتامین ث در این میوه می باشد (۱۲). تحقیقات نشان می دهد بین میزان ویتامین ث در آب پرتقال با فعالیت آنتی اکسیدانتی کل آب میوه، ارتباط معنی داری وجود دارد (۲). مقادیر ویتامین ث در 100 میلی لیتر آب

ارتباط بین خاصیت آنتی اکسیدانی و مقدار ویتامین ث در پرتقال به اثبات رسیده است. علی رغم وجود مقدار زیادی مواد فنلی از قبیل هسپریدین و ناریروتین، ۸۷ درصد خاصیت آنتی اکسیدانی در پرتقال به واسطه

مقایسه مقادیر گزارش شده در دیگر مقالات با نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، که گونه‌های مرکبات ایرانی به مراتب دارای مقدار ویتامین ث بیش تری نسبت به انواع کشت شده در سایر کشورها می‌باشند. در بین انواع مرکبات، پرتقال شهسواری بیش ترین ویتامین ث را دارا می باشد. بر خلاف نظر مثبت عامه مردم بر لیمو، مقدار این ویتامین در لیمو تقریباً از تمامی میوه‌ها کم تر بود. نظر به نقش ارزشمند ویتامین ث در سلامتی، پیشنهاد می‌گردد که افراد جامعه به مصرف بیش تر مرکباتی هدایت شوند که دارای ویتامین ث بیش تری می‌باشند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت و پشتیبانی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه انجام شده است که از ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد. از مدیریت بخش تحقیق و توسعه شرکت فجر ساری نیز به جهت همکاری قدردانی می‌گردد.

پرتقال با استفاده از روش دی کلروفنل ایندوفنل، ۵۲/۳ میلی گرم (۱۵) و در پرتقال، گریپ فروت و لیمو با روش HPLC به ترتیب ۴۹/۸، ۶۴/۷ و ۵۱/۳ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب میوه گزارش شده است (۱۶). با استفاده از روش تیتراسیون با ید، مقدار ویتامین ث در ۱۰۰ میلی لیتر آب پرتقال و آب لیمو در هند ۶۷/۱ و ۵۲/۸ میلی گرم و مقدار این ویتامین در همین مطالعه با روش HPLC، به ترتیب ۶۳/۲ و ۵۱/۳ گزارش شده است (۱۷). مقدار ویتامین ث در ۱۰۰ میلی لیتر آب لیمو در تایلند با روش اندازه گیری تیتراسیون با ید، ۱۰/۵ میلی گرم گزارش شده است (۱۸). نتایج مطالعات مختلف بیانگر این مساله است که مرکبات به عنوان منبع غنی از ویتامین ث بوده که میزان آن در انواع آن مختلف می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که پرتقال شهسواری، خونی سانگینولا و خونی مورو دارای بیش ترین مقدار ویتامین ث می‌باشند. نارنگی کلمانتین، پرتقال تامسون و پرتقال ایتالیائی نیز از این بابت در حد وسط قرار داشته و نارنگی معمولی، لیمو شیرین و تانجلو نیز دارای کم ترین مقدار ویتامین ث می‌باشند.

فهرست منابع

1. Sanchez-Moreno C. Effect of orange juice intake on vitamin C concentration and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(3): 454-60.
2. Proteggente AR. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from sicilian sweet orange varieties. *Free Radic Res.* 2003; 37(6): 681-7.
3. Sun J. Antioxidant and antiproliferative activity of common fruits. *J Agric Food Chem.* 2002; 20(25): 7449-54.
4. Wolfe K. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(3): 609-14.
5. Toit R. Composition of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology.* 2001; 166: 63-69.
6. Saari NB. Ascorbate oxidase from starfruit: preparation and its application

- in the determination of ascorbic acid from fruit juices. *Food Chemistry*. 1999; 66: 57-61.
7. Arya SP.N. spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000; 417: 1-14.
8. Mc Call MR. Can antioxidant vitamin materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26(7/8): 1034-1053.
9. Anderson D. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 1999; 37:1015-1025.
10. Niki E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly. *Nutrition*. 2000; 18(6): 524-24.
11. Brater M.D. The United States Pharmacopoeia (USP) 25 and National Formulary (NF) 20, Webcom Limited. *Toronto*. 2002; p. 163.
12. Calam D. *European Pharmacopoeia*, 4th ed, Council of Europe, Strasbourg. 2002; p. 675.
13. Skinner J. in: *Microscale Chemistry; Experiments in Chemistry, Measuring the amount of vitamin C in fruit drinks. Royal Society of Chemistry*. 1997, p. 67 (cf. J. Chem. Ed. 69, A213-4, 1992).
14. Miller N.J, Rice-Evans C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant blackcurrant drink. *Food Chemistry*. 1997; 60(3): 331-337.
15. Kabasakails V, Siopidou D, Moshatou E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*. 2000; 70: 325-328.
16. Vinci G, Botre F, Mele G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. *Food Chemistry*. 1995; 53: 211-214.
17. Jain A, Chaurasia A, Verma K.K. Determination of ascorbic acid in soft drink, preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow injection spectrophotometry. *Talanta*. 1995; 42(6): 779-787.
18. Suntornsuk L, Gritsanapun W, Nilkamhank S, Paochom A. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002; 28: 849-855.