

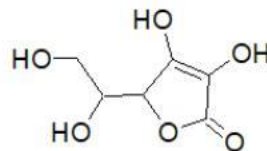
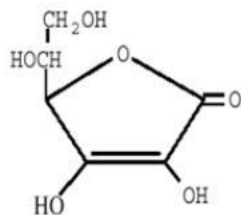
Προσδιορισμός βιταμίνης C σε χυμούς φρούτων



Νίκος Καλογερόπουλος – Αμαλία Γιάννη

Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)

Άχρωμο κρυσταλλικό σώμα, σ.τ. 192°C, Mr = 176



1753: Ο Lind θεράπευε το σκορβούτο με χυμούς φρούτων

1933: Ο Szent Gyorgyi Kirq απομόνωσε την βιταμίνη C και στη συνέχεια Βρετανοί και Ελβετοί την συνέθεσαν

- Λόγω της χαρακτηριστικής ομάδας της διενόλης το ασκορβικό οξύ έχει αναγωγικές ιδιότητες και όξινο χαρακτήρα. Διαλύεται σε νερό, μεθανόλη και αιθανόλη, είναι αδιάλυτο στο βενζόλιο, αιθέρα, χλωροφόρμιο και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Είναι αρκετό ευαίσθητο στα αλκάλια και την οξείδωση, ιδιαίτερα παρουσία καταλύτη. Οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ, που είναι σχετικά σταθερό σε pH<4.0 και διατηρεί το 75-80% της ενεργότητας του L-ασκορβικού οξέος.

Πηγές, ιδιότητες

- Βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα αλλά όχι στο κρέας. Καταστρέφεται εύκολα κατά το μαγείρεμα των τροφίμων.
- Ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, απαραίτητο για το σχηματισμό κολλαγόνου π.χ. κατά την επούλωση των πληγών.
- Η μόνη βιταμίνη που είναι απαραίτητη σε μεγάλες ποσότητες για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού
- Η RDA δόση για υγιείς μη καπνιστές ενήλικες που είναι 75-90 mg/day, υπερβαίνει την απαιτούμενη για αποφυγή σκορβούτου (45mg/day) και είναι αρκετή για παροχή αντιοξειδωτικής προστασίας. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν υπάρχει πλεονέκτημα στην πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας.
- Μεγαδόσεις ίσες με 100-250xRDA θεωρήθηκαν ότι προφυλάσσουν από το κρύωμα κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε σε δοκιμές υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι μεγάλες δόσεις αντιμετωπίζονται εύκολα από τον οργανισμό όμως μπορεί να συνεισφέρουν στη δημιουργία πετρών στα νεφρά.

Μέθοδοι προσδιορισμού

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες τεχνικές. Το ασκορβικό προσδιορίζεται με ογκομετρικές, φθορισμομετρικές, χρωματογραφικές και φωτομετρικές μεθόδους.

α) χημικός/ογκομετρικός προσδιορισμός

Στηρίζεται στις αναγωγικές ιδιότητες του ασκορβικού οξέος που ανάγει ποσοτικά τον δείκτη 2,6-διχλωροφαινολο-ινδοφαινόλη (DPI).

Το δείγμα τεμαχίζεται και εκχυλίζεται σε μπλέντερ με μίγμα μεταφωσφορικού /οξικού οξέος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και παραλαβή του διαλύματος. Το διάλυμα οξινίζεται με δ/μα οξαλικού οξέος. Ακολουθεί ογκομέτρηση με τη χρωστική που προηγουμένως έχει τιτλοδοτηθεί με πρότυπο ασκορβικό οξύ. Σαν τελικό σημείο της ογκομέτρησης λαμβάνεται το σημείο σχηματισμού ελαφρώς ρόδινης χροιάς, η οποία παραμένει επί 5-10 sec.

β) φθορισμομετρικός προσδιορισμός

Στηρίζεται στη μετατροπή του ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ και εν συνεχεία στην αντίδραση της α-δικετο ομάδας με ο-φαιτυλενοδιαμίνη. Η προκύπτουσα κινόξαλίνη μετρείται φθορισμομετρικά στα $\lambda_{ex}=350$ nm και $\lambda_{em}=430$ nm.

Μέθοδοι προσδιορισμού

γ) χρωματογραφικός/ογκομετρικός προσδιορισμός

Το δείγμα εκχυλίζεται με διάλυμα οξαλικού οξέος. Σε περίπτωση που πρόκειται να προσδιοριστεί το άθροισμα (ασκορβικό + δεϋδροασκορβικό), το εκχύλισμα κατεργάζεται με H_2S σε $pH=3.5$, για την αναγωγή του δεϋδροασκορβικού σε ασκορβικό οξύ. Το προκύπτον διάλυμα χρωματογραφείται (χρωματογραφία χάρτου ή λεπτής στιβάδας) με διάλυμα οξικού βουτυλεστέρα κορεσμένου με νερό/αιθανάλη. Η κηλίδα του ασκορβικού αποξύνεται και προσδιορίζεται το ασκορβικό ογκομετρικά.

δ) φωτομετρικός προσδιορισμός

Κατ' αρχήν οξειδώνεται το ασκορβικό προς δεϋδροασκορβικό οξύ με ενεργό άνθρακα (Norit) ή 2,6 διχλωροφαινολ-ινδοφαινόλη. Το δεϋδροασκορβικό οξύ αντιδρά με 2,4 -δινιτροφαινυλδραζίνη και παράγεται 2,4 -δινιτροφαινυλδραζόνη η οποία κατόπιν διάλυσης σε H_2SO_4 85% δίνει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα που απορροφά σε $\lambda=520-525$ nm.

ε) προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία (HPLC)

Εφαρμόζεται σε καθαρά φαρμακευτικά δείγματα αλλά και σε εκχυλίσματα ιστών, βιολογικών υγρών κλπ που έχουν προηγουμένως καθαρισθεί με χρωματογραφία στήλης.

Ογκομετρικός προσδιορισμός βιταμίνης C σε χυμούς φρούτων

- 1^η ογκομέτρηση. Το διάλυμα της 2,6 διχλωροφαινολο-ινδοφαινόλης (DPI) είναι ευαίσθητο και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη εντός του ψυγείου. Πριν χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να λάβει χώρα μέτρηση της οξειδωτικής του δύναμης. Αυτό γίνεται με αντίδραση με το KI που αποτελεί αναγωγικό μέσο. Η αντίδραση γίνεται σε όξινο περιβάλλον και το εκλυόμενο I₂ τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα Na₂S₂O₃ παρουσία δείκτη αμύλου. Λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω αντιδράσεις:

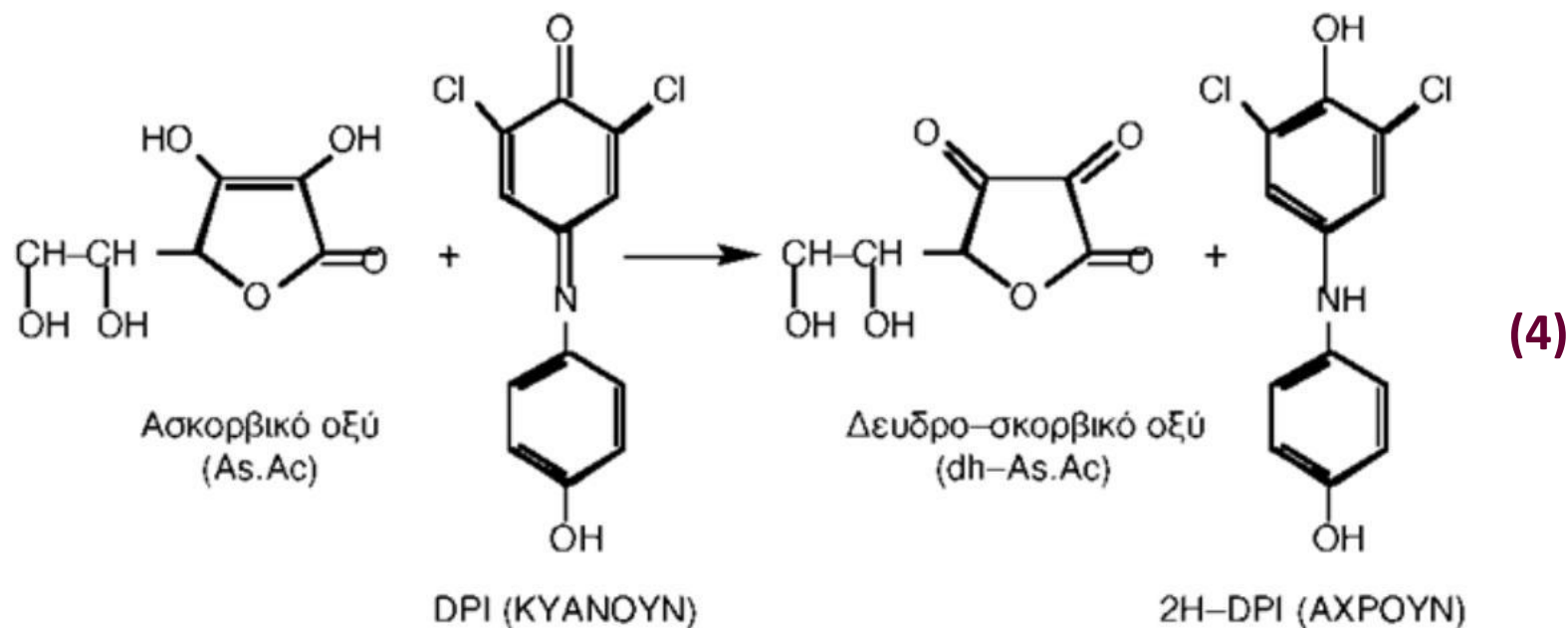


Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

Σε κωνική φιάλη των 100mL φέρονται 10mL του διαλύματος της DPI 0.04% w/v και προστίθενται 5mL διαλύματος KI 50% w/v και 10mL διαλύματος HCl 0.1M. Μετά από παραμονή 2 min το διάλυμα ογκομετρείται με διάλυμα 0.01M Na₂S₂O₃ και δείκτη άμυλο.

Ογκομετρικός προσδιορισμός βιταμίνης C σε χυμούς φρούτων

- 2^η ογκομέτρηση. Το τιτλοδοτημένο διάλυμα της DPI θα χρησιμοποιηθεί για τον ογκομετρικό προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος στα δείγματα των χυμών. Κατά την ογκομέτρηση το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ, ενώ ο δείκτης DPI ανάγεται προς την άχρωμη λευκοένωσή του, 2H-DPI. Η αντίδραση:



Ογκομετρικός προσδιορισμός βιταμίνης C σε χυμούς φρούτων

- Προετοιμασία του δείγματος χυμού :

Μεταφέρονται με σιφώνιο 10mL χυμού εμπορίου ή χυμού φρούτων σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με διάλυμα οξαλικού οξέος 0.4% w/v.

Το διάλυμα ανακινείται και διηθείται με πτυχωτό ηθμό.

Μεταφέρονται ακριβώς 10mL του διηθήματος με σιφώνιο σε κωνική φιάλη και προστίθενται 10mL διαλύματος οξαλικού οξέος 0.4% w/v.

- Ογκομέτρηση του ασκορβικού οξέος του δείγματος χυμού :

Το διάλυμα στην κωνική φιάλη ογκομετρείται με προσθήκη του διαλύματος DPI από προχοΐδα μέχρις ότου εμφανιστεί και παραμείνει μια ελαφρά ρόδινη χροιά.

Η ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 2-3 φορές και εξάγεται ο μέσος όρος καταναλώσεων του DPI. Έστω β mL DPI 0.04% w/v

Ογκομετρικός προσδιορισμός βιταμίνης C σε χυμούς φρούτων

- Η ογκομέτρηση γίνεται παρουσία οξαλικού οξέος, το οποίο σταθεροποιεί και προστατεύει το ασκορβικό οξύ (οξειδώνεται πιο εύκολα από αυτό και επιπλέον δημιουργεί όξινο περιβάλλον). Όταν τελειώσει η ογκομέτρηση (δηλ. έχει αντιδράσει όλη η ποσότητα του ασκορβικού οξέος) τότε με μια σταγόνα περίσσειας της DPI -από την προχοΐδα- χρωματίζεται το διάλυμα στην κωνική ελαφρά ρόδινο.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η DPI λειτουργεί και ως δείκτης.
- Σημειώνεται η κατανάλωση DPI μέχρι να αποκτήσει το διάλυμα ελαφρά ρόδινο χρώμα (**β mL DPI**).
- Από τις καταναλώσεις του θειοθειϊκού νατρίου (**α mL**) και της DPI (**β mL**) υπολογίζεται η περιεκτικότητα του ασκορβικού οξέος (AsAc) στο αρχικό δείγμα χυμού σε mg/mL από τον τύπο:

$$\text{mg AsAc/mL χυμού} = \alpha \times \beta \times 0.088$$

Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα μεθόδου

Η μέθοδος έχει ακρίβεια περίπου 3%. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια.

Η μέθοδος έχει τα ακόλουθα μειονεκτήματα :

- α) δεν προσδιορίζεται το δεϋδρο-ασκορβικό οξύ που συνήθως υπάρχει σε μικρές ποσότητες στους χυμούς και το οποίο έχει ανάλογη βιολογική δράση με το ασκορβικό οξύ
- β) μαζί με το ασκορβικό οξύ προσδιορίζεται και το ελεύθερο διοξείδιο του θείου που πιθανώς υπάρχει στο δείγμα ως συντηρητικό. Η δέσμευση του SO_2 μπορεί να γίνει πριν την ογκομέτρηση, με προσθήκη 2-3 mL ακετόνης στο δείγμα.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- α) είναι απλή και γρήγορη
- β) το χρωματικό τέλος της αντίδρασης είναι εύκολα διαπιστώσιμο.

Πειραματικά δεδομένα

No	Δείγμα χυμού	Ετικέτα mgAsAc/ 100mL	α mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	β mL DPI	mg AsAc/ mL	mgAsAc/ 100mL
I	Amita Motion, 7 vitamins					
II	Amita, πορτοκάλι					

AsAc:
ασκορβικό
οξύ
(ascorbic
acid)

Σημείωση: Η κάθε ομάδα θα χρησιμοποιήσει τα δικά της δεδομένα από τις ογκομετρήσεις και το δείγμα χυμού που ανέλυσε.

Ερωτήσεις & υπολογισμοί

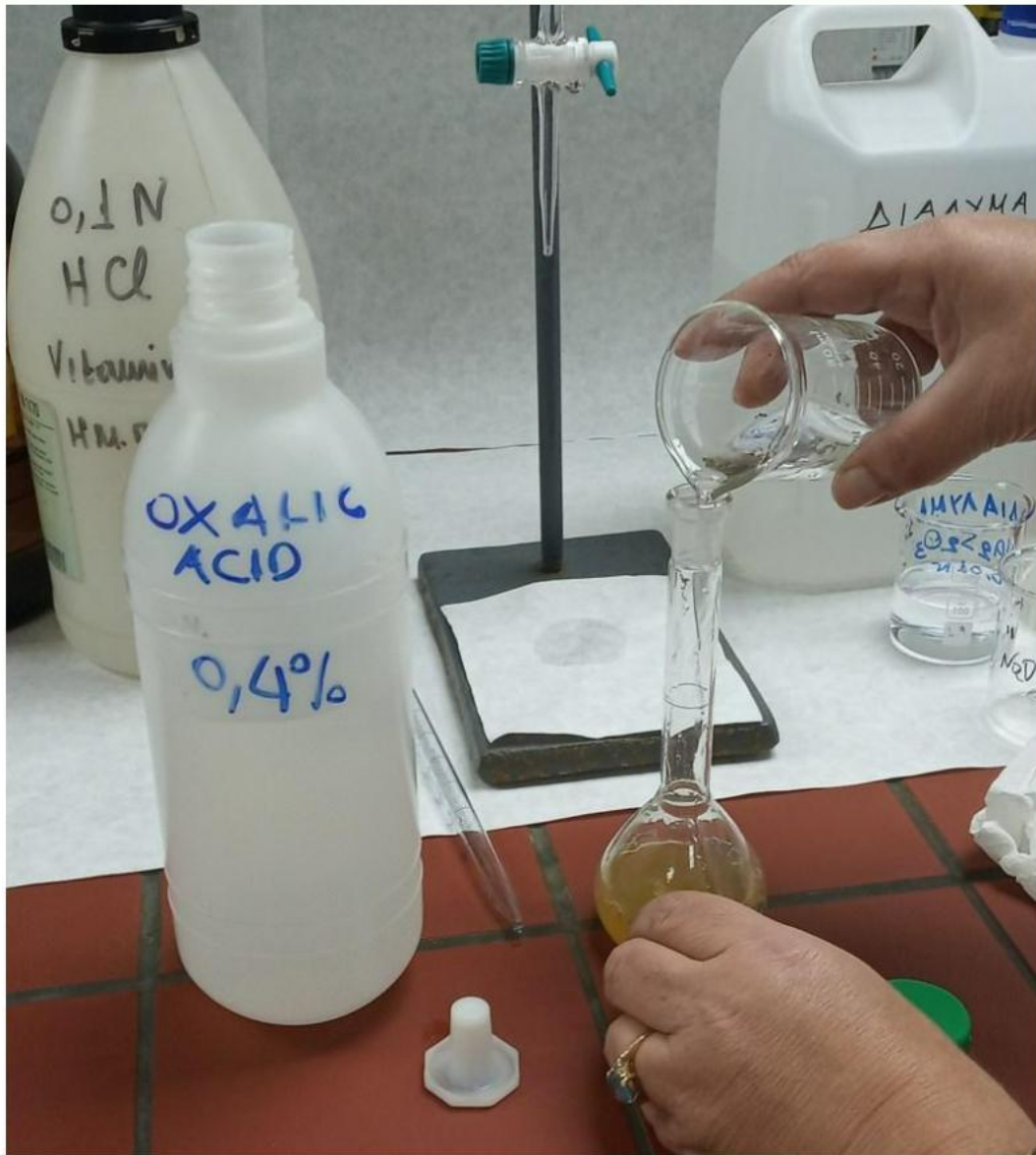
1. Ποια τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της μεθόδου;
2. Ποιος ο ρόλος του οξαλικού οξέος κατά την ογκομέτρηση;
3. Από τα δεδομένα του πίνακα να υπολογίσετε τα mg ασκορβικού σε 100mL χυμού και να τα συγκρίνετε με την τιμή που αναγράφεται στην ετικέτα κάθε χυμού. Αν υπάρχει διαφορά, δώστε εξήγηση (να λάβετε υπόψη και την ημερομηνία λήξης).
4. Να υπολογίσετε τα mg ασκορβικού που υπάρχουν σε ένα ποτήρι (250mL) των χυμών που αναλύσατε. Τι ποσοστό του RDA αντιπροσωπεύουν;

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 1



Μεταφέρουμε με σιφώνιο ακριβώς 10mL χυμού σε ογκομετρική φιάλη των 100mL (άρα γίνεται αραιώση 1:10)

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 2



Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με διάλυμα οξαλικού οξέος (0.4% w/v)

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 3



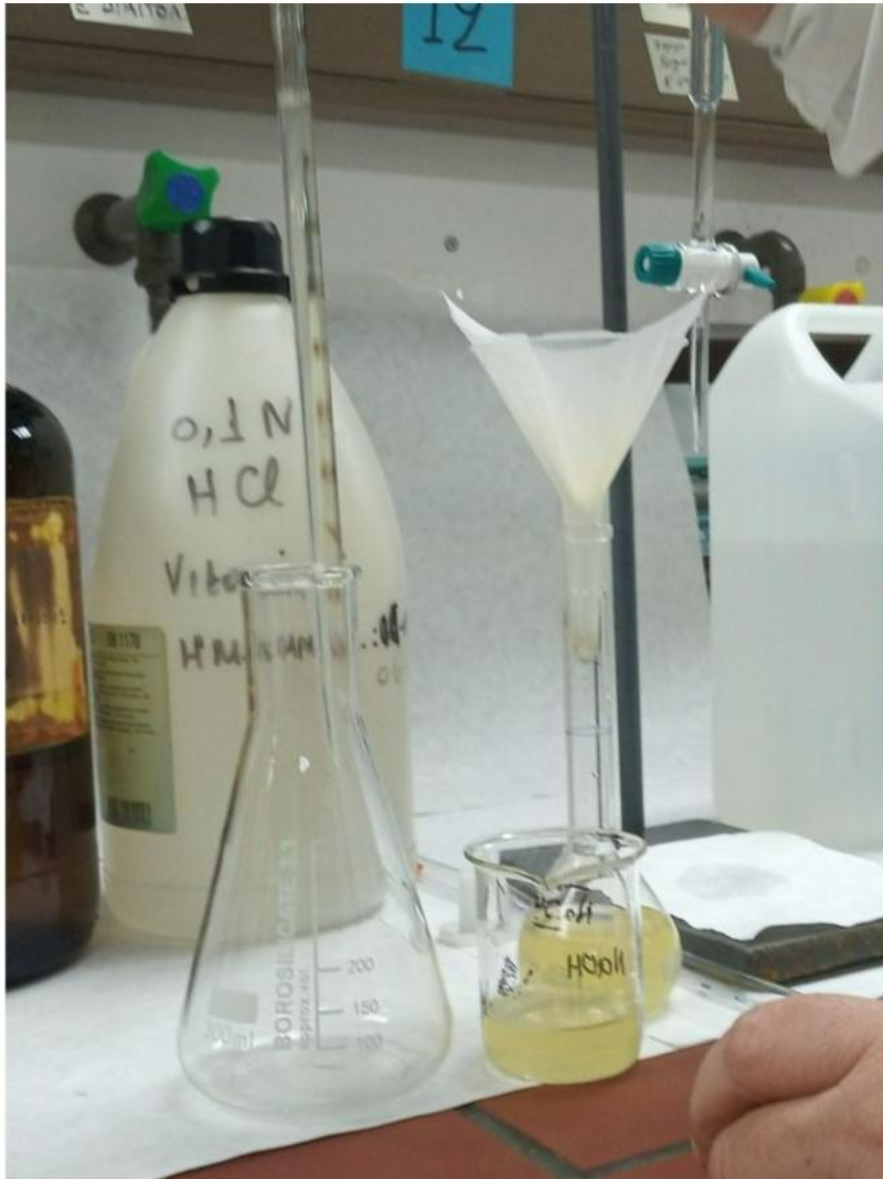
Πωματίζουμε και ανακινούμε καλά την ογκομετρική φιάλη

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 4



Διηθούμε τον αραιωμένο
χυμό με χάρτινο ηθμό

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 5



Μεταφέρουμε με σιφώνιο 10mL του διηθήματος σε κωνική φιάλη (αυτά αντιστοιχούν σε 1mL του αρχικού χυμού).

Προσθέτουμε επιπλέον 10mL διαλύματος οξαλικού οξέος 0.4% w/v

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 6

Γεμίζουμε την προχοΐδα με διάλυμα DPI και μηδενίζουμε κατά τα γνωστά.

ΠΡΟΣΟΧΗ: λόγω του σκούρου χρώματος του δείκτη για την σωστή καταγραφή των όγκων κοιτάζουμε το επάνω μέρος του μηνίσκου.



Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 7



Ογκομετρούμε με την DPI (που είναι ταυτόχρονα και δείκτης). Οι σταγόνες της DPI αποχρωματίζονται όσο υπάρχει ασκορβικό οξύ που δεν έχει αντιδράσει

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 8



Στο ισοδύναμο σημείο, όταν όλο το ασκορβικό έχει αντιδράσει (οξειδωθεί) παραμένει μια ελαφρά ρόδινη χροιά της DPI που δηλώνει το τέλος της ογκομέτρησης

Προετοιμασία και εκτέλεση προσδιορισμού. 9



**Χρώμα του διαλύματος στο
ισοδύναμο σημείο.**