١٣

تقدير حمض الأسكوربيك
Ascorbic Acid Determination

(١٣,١) تقدير حمض الأسكوربيك المختزل بالطريقة اللونية
Determination of Reduced Ascorbic Acid by Photometric Methods

مقدمة

تقدير فيتامين C في عصائر مختلفة باستخدام صبغة ٢,٦ ثنائي كلور فينول إندوفينول بطريقة لونية.

الهدف: تقدير حمض الأسكوربيك بالطريقة اللونية.

الكيماويات

- حمض الخليك
- حمض الأسكوربيك
- ٢,٦ ثنائي كلور إندوفينول
- حمض ميتافوسفوريك

المحاليل Reagents

١- محلول الصبغة الاحتياطي Stock dye solution

• أذب ١٠٠ ملجم من بلورات الصبغة الجافة ٦,٢ ثنائي كلور فينول إندوفينول في صورة ملح الصوديوم 2, 6 dichlorophenol indophenol sodium salt في ٧٥ مل ماء مقطر سبق غليه في كأس زجاجي.

• رشح المحلول خلال ورقة ترشيح واطمان رقم ٤.

• اغسل الكأس وورقة الترشيح بـ ٢٥مل ماء مقطر ويستقبل الراشح في دورق مخروطي سعة ١٢٥مل.

• يغطى الدورق جيداً ويحفظ في الثلاجة ويكون المحلول ثابتاً لمدة ٢-٣ أسابيع في الثلاجة.

٢- محلول الصبغة للعمل Working dye solution

انقل ٧مل من محلول الصبغة السابق ذكره إلى دورق معايرة سعة ٥٠٠مل ثم خفف بالماء المقطر إلى العلامة.

٣- محلول الاستخلاص Extracting solution

وهو عبارة عن محلول أحد الحمضين التاليين: ١- حمض الميتافوسفوريك HPO_3 بتركيز ١٪ أو ٢- حمض الأوكساليك بتركيز ١,٥٪ وعادة يفضل استخدام حمض الأوكساليك نظراً لثباته، كما أن حمض الميتافوسفوريك يلزم تحضيره يوميًا.

٤- محلول الحمض القياسي

أذب ١٠٠ ملجم حمض أسكوربيك قياسي إلى ١٠٠مل محلول استخلاص.

تحضير العينة Sample preparation:

١- العصائر: يتم استخراج العصير من الثمرة ثم الترشيح. يؤخذ ٢٠مل من الراشح في دورق سعة ١٠٠مل ويكمل إلى الحجم بإضافة حمض الاستخلاص ويخلط جيداً ثم يعاد الترشيح ويكون المحلول جاهزاً للمعايرة.

٢- الخضر والفاكهة الطازجة والمعلبة: يؤخذ ٢٥-٥٠جم من العينة وتخلط مع سبعة أضعافها من حمض الاستخلاص (حوالي ٣٥٠مل) في خلاط كهربائي لمدة ٣ دقائق ثم يجرى الترشيح للتخلص من العكارة والمواد الغروية. إذا لم يتحصل على محلول رائق تماماً تجرى عملية طرد مركزي centrifugation.

٣- في حالة الأغذية المجففة: يجب نقعها في ٢٠٠مل حمض ميتافوسفوريك ٦٪ أو أوكساليك ٣٪ لمدة ١٥-٣٠ دقيقة على الأقل ثم تعامل كالمعتاد بعد ذلك.

التقدير Determination

١- معايرة الصبغة Dye standardization

اسحب بالضبط ١مل من حمض الاستخلاص وانقلها إلى أنابيب المطياف Spectronic 20 وأضف إلى الأنبوب الأول ٩مل ماء مقطر واضبط الجهاز على طول موجة ٥١٥ نانومتر والقراءة على صفر امتصاص "A" أو ١٠٠٪ نفاذية Transmission، أما الأنبوب الثاني فيضاف له ٩مل من محلول الصبغة ويقرأ الامتصاص أو النفاذية في خلال ١٠ ثواني. ويجب أن تكون القراءة حوالي ٣٠٪ نفاذية أو ما يقابلها من درجة الامتصاص وإذا اختلفت النفاذية عن الـ ٣٠٪ بمعدل ±١ يجب ضبط تركيز الصبغة بإضافة ماء مقطر أو محلول الصبغة المركز وإعادة القراءة. تؤخذ ٣ قراءات ويحسب المتوسط وهو يمثل T_1 ومنها يمكن الحصول على A_1 من معادلة خاصة وهي ($A_1 = 2-\log T_1$) أو يمكن قراءة الامتصاص A_1 مباشرة من الجهاز.

٢- تقدير امتصاصية العينة

اسحب ١مل من مستخلص العينة وأضفه إلى ٣ أنابيب من أنابيب المطياف. أضف إلى الأنبوب الأول ٩مل ماء مقطر وأضبط الجهاز ليقرأ ١٠٠٪ نفاذية أو صفر امتصاصية أما الأنبوبين الآخرين فأضف لكل منهما ٩مل من محلول الصبغة وخذ القراءة خلال ١٠ ثواني واحصل على المتوسط، وهو يمثل T_2 و A_2.

يلاحظ الفرق بين A_1 و A_2 ناتج من وجود Vit. C أو حمض الأسكوربيك الذي يختزل لون الصبغة من اللون الأحمر في الوسط الحمضي إلى عديم اللون وبذلك تقل درجة الامتصاص للضوء في الأنابيب المختبرة على راشح العينة بحسب تركيز أو كمية فيتامين C في الراشح بالملليجرام لكل أنبوب (أي لكل ١مل).

ولحساب التراكيز من حمض الأسكوربيك بالملليجرام لكل ١مل يجرى عمل منحنى قياسي Standard curve يمثل العلاقة بين تركيزات معلومة من حمض الأسكوربيك بالملجرام لكل ١مل ودرجة الامتصاص لكل تركيز. فعلى سبيل المثال، تحضر ٦ دوارق معيارية سعة ١٠٠مل وينقل للدورق الأول ١مل (من محلول حمض الأسكوربيك المحضر بإذابة ١٠٠ ملجرام في ١٠٠مل حمض استخلاص) ويكمل الحجم إلى العلامة بواسطة حمض الاستخلاص وينقل إلى الدورق الثاني ٢مل ثم ٣، ٤، ٥، و٦مل لبقية الدوارق حتوي تحتوي الدوارق الستة على تركيزات من حمض الأسكوربيك على النحو التالي: ١، ٢، ٣، ٤، ٥ و ٦ملجم/١٠٠مل. كما أن ١مل من كل دورق يحتوي على ٠,٠١، ٠,٠٢، ٠,٠٣، ٠,٠٤، ٠,٠٥ و ٠,٠٦ ملجرام من حمض الأسكوربيك. بعد ذلك يؤخذ ١مل من كل دورق وينقل إلى ٦ أنابيب من أنابيب المطياف ثم يضاف لكل أنبوب ٩مل من محلول الصبغة وتؤخذ قراءة الامتصاص في خلال ١٠ ثواني. وبعد ذلك يتم عمل المنحنى القياسي الذي يمثل معدل التغير للامتصاص مع التركيز.

مثال: أخذت عينة وزنها ١٠جم من مسحوق عصير البرتقال الصناعي (Tang) وأذيبت وتم الاستخلاص بحمض الميتافوسفوريك ثم أجرِ الترشيح وأكمل الحجم إلى ٤٠٠مل. وعند معايرة الصبغة كانت الامتصاصية A_1 = 0.535. احسب نسبة فيتامين C في العينة ملجرام لكل ١٠٠جم عينة.

الحل: أولاً يتم عمل منحنى قياسي يمثل التركيز بالملليجرام/مل على الإحداثي الأفقي "X" والامتصاصية على الإحداثي الرأسي "Y" ثم تؤخذ القراءات من الجهاز وتوقع النقط لكل تركيز ويتم توصيل النقاط بحيث يشمل الخط معظم النقاط.

ومن معادلة الخط المستقيم يمكن حساب التركيز:

$$Y = ax + b$$

أو بطريقة أخرى $A_{sample} = ax + b$

حيث إن:

A = امتصاصية العينة = $A_1 - A_2 = 0.175$

a = ميل المنحنى slope = $\frac{0.22}{0.04} = -5.5$

x = التركيز ملجرام/١مل

b = تقاطع المنحنى على المحور الرأسي = 0.565

ومن شكل المنحنى المرفق يمكن الحل كالآتي:

$A = A_1 - A_2 = 0.525 - 0.350 = 0.175$

$\therefore 0.175 = -5.5x + 0.565$

$-0.390 = -5.5\ x$

$\therefore x = -0.390 \div -5.5 = 0.071$

∴ ٠,٠٧١ ملجرام في ١ مل

× ——— ٤٠٠ مل

∴ × = (٠,٠٧١ × ٤٠٠) ÷ ١ = ٢٨,٤ ملجرام وهذه الكمية موجودة في ١٠جم عينة

∴ نسبة فيتامين C في العينة = (٢٨,٤ × ١٠٠) ÷ ١٠ = ٢٨٤ ملجرام /١٠٠جم

(١٣,٢) تقدير حمض الاسكوربيك بالمعايرة
Determination of Ascorbic Acid by Titration

مقدمة

يُقدر حمض الأسكوربيك بالمعايرة مع صبغة ٦,٢- ثنائي كلورو فينول إندو فينول (DCP) الذي تُختزل بحمض أسكوربيك إلى الشكل عديم اللون.

الهدف: تقدير حمض الأسكوربيك بالمعايرة.

الأجهزة

- دوارق معيارية.
- ماصات.
- أنابيب غليان.
- سحاحات.
- خلاط كهربائي.
- قشارة بطاطا.
- قمع.
- قماش موسلين.
- دوارق مخروطية.
- أقماع ترشيح وورق.
- رمل.

الكواشف

الفاكهة والخضروات – تحضير المحاليل كما يلي:

- **محلول ٦,٢- ثنائي كلورو فينول انـدو فينـول:** أذب ٨٠٠ ملجرام من الصبغة في نحو ٥٠٠مل من ماء مقطر مغلي مسبقاً ومبرد، رشح إذا كان ضرورياً،

واكمل إلى لتر بالماء المقطر، احفظ العبوة مبردة في الظلام واستعمل المحلول خلال أسبوع.

• **مزيج حمض ميتافوسفوريك–حمض الخل:** أذب ١٥جرام من حمض ميتافوسفوريك HPO_3 في ٤٠مل من حمض الخل الثلجي مع ٢٠٠مل ماء، خفف إلى ٥٠٠مل ورشح واحفظ هذا المحلول في الثلاجة لمدة أسبوع.

• **محلول قياسي من حمض أسكوربيك:** أذب ١٠٠ ملجرام حمض الأسكوربيك في ٥٪ من محلول حمض ميتا فوسفوريك وخفف في دورق حجمي إلى ٥٠٠مل مستعملاً محلول حمض ميتا فوسفوريك.

طريقة العمل

الفاكهة والخضروات

١– تقييس الكواشف: يعاير محلول الصبغة بأخذ ٥مل من محلول حمض أسكوربيك في أنبوب غليان ومعايرته مباشرة بمحلول الصبغة، ويزول لون الصبغة الأزرق بحمض الأسكوربيك أولاً، وتتابع الإضافة إلى محلول الصبغة مع التحريك حتى الحصول على لون زهري فاتح يدوم لمدة ١٥ ثانية، احسب عدد المليجرامات من حمض أسكوربيك المكافئ لواحد مل من الصبغة، يجب إجراء معايرة الصبغة كل يوم؛ لأن محاليل حمض أسكوربيك ليست ثابتة.

٢– تعيين حمض أسكوربيك في عصير الفاكهة: خذ بالماصة ١٠مل عصير الفاكهة إلى دورق مخروطي وأضف ٢مل من مزيج حمضي ميتافوسفوريسك– والخل وعاير بمحلول الصبغة كما في الفقرة السابقة، يخفف العصير إذا كان مركزاً، بأخذ ٢٠مل بالماصة إلى أنبوبة مدرجة ١٠٠مل وإكمال الحجم بمزيج حمض ميتا فوسفوريك– حمض الخل، ويعاير ١٠مل منه بمحلول الصبغة كما سبق.

٣- تعيين حمض اسكوربيك في الفاكهة والخضروات: زن ١٠- ٢٠ جراماً من الفاكهة أو الخضروات بحسب كمية حمض الأسكوربيك المتوقعة فيها، ثم تابع وفق واحد من الخيارين:

أ) اطحن المادة باستعمال الهاون وقليل من الرمل النقي مع ١٠- ٢٠مل من مزيج حمضي ميتافوسفوريك- والخل، ويخفف هذا المزيج من تأكسد حمض أسكوربيك ويثبط الإنزيمات ويخفف تداخل الحديد الموجود، استمر في طحن المادة بإضافة ٥٠مل من المزيج الحمضي ورشح عبر قماش الموسلين، اغسل الهاون بالخليط الحمضي وأضف الغسالة إلى قماش الموسلين واغسل بالماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ٢٥٠مل بالمزيج الحمضي.

ب) استعمل خلاط بدلاً من الهاون وخذ طبقة السائل الرائقة، وفي هذه الحالة، اغسل المتبقي في أنبوب الطرد المركزي بمزيج حمضي ميتافوسفوريك- الخل، أضف السائل إلى طبقة السائل الرائقة، وأكمل الحجم إلى ٢٥٠مل بالمزيج الحمضي، عاير ١٠مل كما فعلت سابقاً، وأحسب كمية حمض أسكوربيك.

الحسابات

تعتمد الحسابات على تقييس محلول الصبغة وفق الطريقة الآتية:

تقييس محلول الصبغة: إذا كان A مل حجم محلول الصبغة المستعملة المتفاعلة مع ٥ مل من محلول حمض الأسكوربيك، فإن:

١ مل من محلول الصبغة = A/1 ملجرام حمض أسكوربيك

تقدير حمض أسكوربيك في عصير الفاكهة: إذا كان B مل حجم محلول الصبغة المستعملة للتفاعل مع ١٠مل من عصير الفاكهة، فإن:

١٠٠مل عصير فاكهة = A/ (10 x B) ملجرام حمض أسكوربيك

ملاحظة: يؤخذ بالحسبان أي تخفيفات تجري خلال التحليل.