

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 ٦,٢ ثنائي كلور فينول إندوفينول بطريقة لونية.

الهدف: تقدير حمض الأسكوربيك بالطريقة اللونية.

الكيمويات

- حمض الخليك
- حمض الأسكوربيك
- ٦,٢ 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 ٢٥ مل ماء مقطر ويستقبل الراشح في دورق مخروطي سعة ١٢٥ مل.
- يغطى الدورق جيداً ويحفظ في الثلاجة ويكون المحلول ثابتاً لمدة ٢-٣ أسابيع في الثلاجة.

٢- محلول الصبغة للعمل Working dye solution

- انقل ٧ مل من محلول الصبغة السابق ذكره إلى دورق معايرة سعة ٥٠٠ مل 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 ٠,٥٪ وعادة يفضل استخدام حمض الأوكساليك نظراً لثباته، كما أن حمض الميتافوسفوريك يلزم تحضيره يومياً.

٤- محلول الحمض القياسي

- أذب ١٠٠ ملجم حمض أسكوريك قياسي إلى ١٠٠ مل محلول استخلاص.

تحضير العينة Sample preparation:

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

٢- الخضر والفاكهة الطازجة والمعلبة: يؤخذ ٢٥-٥٠ جم من العينة وتخلط مع سبعة أضعافها من حمض الاستخلاص (حوالي ٣٥٠ مل) 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 ٢٠٠ مل حمض ميثافوسفوريك ٦٪ أو أوكساليك ٣٪ لمدة ١٥-٣٠ دقيقة على الأقل ثم تعامل كالمعتاد بعد ذلك.

التقدير Determination

١- معايرة الصبغة Dye standardization

اسحب بالضبط ١ مل من حمض الاستخلاص وانقلها إلى أنابيب المطياف Spectronic 20 وأضف إلى الأنبوب الأول ٩ مل ماء مقطر واضبط الجهاز على طول موجة ٥١٥ نانومتر والقراءة على صفر امتصاص "A" أو ١٠٠٪ نفاذية Transmission، أما الأنبوب الثاني فيضاف له ٩ مل 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 ± 1 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 ١ مل من مستخلص العينة وأضفه إلى ٣ أنابيب من أنابيب المطياف. أضف إلى الأنبوب الأول ٩ مل ماء مقطر واضبط الجهاز ليقرأ ١٠٠٪ نفاذية أو صفر امتصاصية أما الأنبوبين الآخرين فأضف لكل منهما ٩ مل 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 ١ مل).

ولحساب التراكيز من حمض الأسكوربيك بالملليجرام لكل ١ مل يجري عمل منحنى قياسي Standard curve يمثل العلاقة بين تركيزات معلومة من حمض الأسكوربيك بالملليجرام لكل ١ مل ودرجة الامتصاص لكل تركيز. فعلى سبيل المثال، تحضر ٦ دوارق معيارية سعة ١٠٠ مل وينقل للدورق الأول ١ مل (من محلول حمض الأسكوربيك المحضر بإذابة ١٠٠ ملجرام في ١٠٠ مل حمض استخلاص) ويكمل الحجم إلى العلامة بواسطة حمض الاستخلاص وينقل إلى الدورق الثاني ٢ مل ثم ٣، ٤، ٥، ٦ مل لبقية الدوارق تحتوي تحتوي الدوارق الستة على تركيزات من حمض الأسكوربيك على النحو التالي: ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦ ملجم/١٠٠ مل. كما أن ١ مل من كل دورق يحتوي على ٠,٠١، ٠,٠٢، ٠,٠٣، ٠,٠٤، ٠,٠٥، ٠,٠٦ ملجرام من حمض الأسكوربيك. بعد ذلك يؤخذ ١ مل من كل دورق وينقل إلى ٦ أنابيب من أنابيب المطياف ثم يضاف لكل أنبوب ٩ مل 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 ١٠ جم من مسحوق عصير البرتقال الصناعي (Tang) وأذيت وتم الاستخلاص بحمض الميتافوسفوريك ثم أجرى الترشيح وأكمل الحجم إلى ٤٠٠ مل. وعند معايرة الصبغة كانت الامتصاصية $A_1 = 0.535$. احسب نسبة فيتامين C في العينة ملجرام لكل ١٠٠ جم عينة.

الحل: أولاً يتم عمل منحنى قياسي يمثل التركيز بالمليجرام/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:

$$Y = ax + b$$

$$A_{\text{sample}} = ax + b \text{ أو بطريقة أخرى}$$

حيث إن:

$$A = \text{امتصاصية العينة} = A_1 - A_2 = 0.175 - 0.22$$

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

$$x = \text{التركيز ملجرام/مل}$$

$$b = \text{تقاطع المنحنى على المحور الرأسي} = 0.565$$

ومن شكل المنحنى المرفق يمكن الحل كالاتي:

$$A = A_1 - A_2 = 0.525 -$$

$$0.350 = 0.175$$

$$\therefore 0.175 = -5.5x + 0.565$$

$$-0.390 = -5.5x$$

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

$$\therefore 0.071 \times 100 = 7.1 \text{ ملجرام في } 100 \text{ مل}$$

$$X = \frac{7.1 \times 400}{100} = 28.4 \text{ ملجرام}$$

∴ نسبة فيتامين C في العينة = $10 \div (28.4 \times 100) = 0.352$ ملجرام/100 جم عينة

∴ نسبة فيتامين C في العينة = $10 \div (28.4 \times 100) = 0.352$ ملجرام/100 جم

(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 بمحمض أسكوربيك إلى الشكل عديم اللون. الهدف: تقدير حمض الأسكوربيك بالمعايرة.

الأجهزة

- دوارق معيارية.
- ماصات.
- أنابيب غليان.
- ساحات.
- 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 إندو فينول: أذب ٨٠٠ ملجرام من الصبغة في نحو ٥٠٠ مل 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 ١٥ جرام من حمض ميتافوسفوريك HPO_3 في ٤٠ مل من حمض الخل الثلجي مع ٢٠٠ مل ماء، خفف إلى ٥٠٠ مل 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 ٥٠٠ مل مستعملاً محلول حمض ميتا فوسفوريك.

طريقة العمل

الفاكهة والخضروات

١- تقييس الكواشف: يعاير محلول الصبغة بأخذ ٥ مل 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 ١٠ مل عصير الفاكهة إلى دورق مخروطي وأضف ٢ مل من مزيج حمضي ميتافوسفوريك-والخل وعابر بمحلول الصبغة كما في الفقرة السابقة، يخفف العصير إذا كان مركزاً، بأخذ ٢٠ مل بالماصة إلى أنبوبة مدرجة ١٠٠ مل وإكمال الحجم بمزيج حمض ميتا فوسفوريك- حمض الخل، ويعاير ١٠ مل منه بمحلول الصبغة كما سبق.

٣- تعيين حمض أسكوربيك 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 ١٠-٢٠ مل من مزيج حمضي ميتافوسفوريك- والخل، ويخفف هذا المزيج من تأكسد حمض أسكوربيك ويشبط الإنزيمات ويخفف تداخل الحديد الموجود، استمر في طحن المادة بإضافة ٥٠ مل من المزيج الحمضي ورشح عبر قماش الموسلين، اغسل الهاون بالخلط الحمضي وأضف الغسالة إلى قماش الموسلين واغسل بالماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ٢٥٠ مل 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 ٢٥٠ مل بالمزيج الحمضي، عاير ١٠ مل 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:

$$1 \text{ مل من محلول الصبغة} = A/1 \text{ ملجرام حمض أسكوربيك}$$

تقدير حمض أسكوربيك في عصير الفاكهة: إذا كان B مل حجم محلول الصبغة

المستعملة للتفاعل مع ١٠ مل من عصير الفاكهة، فإن:

$$100 \text{ مل عصير فاكهة} = A / (10 \times B) \text{ ملجرام حمض أسكوربيك}$$

ملاحظة: يؤخذ بالحسبان أي تخفيفات تجري خلال التحليل.