

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

Badanie zawartości witaminy C w mandarynkach metodą miareczkowania spektrofotometrycznego

Study of vitamin C content in mandarins by spectrophotometric measurement method

Karina Orłowska, Bartłomiej Brydak

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

ABSTRAKT: W artykule przedstawiono możliwość zastosowania miareczkowania spektrofotometrycznego do oznaczania zawartości witaminy C w wybranych owocach cytrusowych (mandarynkach). Witamina C, kluczowy składnik odżywczy, odgrywa znaczącą rolę w żywieniu człowieka i analizie chemicznej żywności. Zastosowana metoda analityczna opiera się na reakcji kwasu askorbinowego z 2,6-dichlorofenolindofenolem (DCPIP). W artykule omówiono sposób przygotowania próbki, procedurę analityczną i zastosowaną aparaturę spektrofotometryczną. Podkreślono również zalety metody, w tym wysoką dokładność i czułość, a także opisano jej potencjalne zastosowania w analizie żywności. Celem artykułu jest zapoznanie czytelników nie tylko z techniką analityczną, ale także z jej potencjalnymi zastosowaniami w badaniach nad jakością i wartościami odżywczymi owoców cytrusowych.

ABSTRACT: This article focuses on the application of the spectrophotometric titration method to determine the vitamin C content in mandarins. Vitamin C, a key nutrient, plays a significant role in human nutrition and food chemical analysis. The analytical method employed is based on the reaction of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), enabling precise determination of its concentration. The article discusses sample preparation, the analytical procedure, and the spectrophotometric tools used. It also highlights the advantages of the method, including high accuracy and sensitivity, as well as its applications in food analysis. The aim of this article is to introduce readers not only to the analytical technique but also to its potential applications in research on the quality and nutritional value of citrus fruits.

Słowa kluczowe: mandarynki, Witamina C, kwas askorbinowy, miareczkowanie spektrofotometryczne

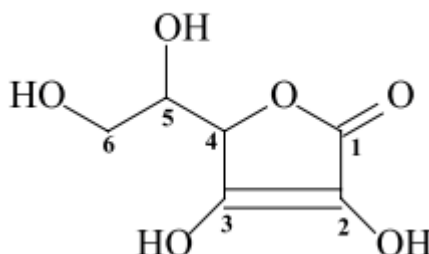
1. Wstęp

Odkrycie witaminy C miało kluczowe znaczenie w zrozumieniu przyczyn i leczenia szkorbutu, choroby, która przez wieki dziesiątkowała załogi statków i populacje krajów o ograniczonym dostępie do świeżych produktów. Już w XVIII wieku szkocki lekarz James Lind udowodnił, że spożywanie cytrusów skutecznie zapobiega tej chorobie, co stanowiło pierwszy praktyczny dowód na rolę diety w profilaktyce szkorbutu [1]. Witamina C, będąca antyoksydantem, odgrywa także istotną rolę w syntezie kolagenu, wspieraniu odporności oraz wchłanianiu żelaza, co czyni ją niezbędnym składnikiem diety [1]. Po wyizolowaniu witaminy przez Alberta Szent-Görgyiego jej znaczenie naukowe i medyczne szybko wzrosło, a odkrycie jej struktury umożliwiło rozwój przemysłowej produkcji i szeroką dostępność suplementów witaminy C [1]. Współcześnie jest jednym z najczęściej badanych i stosowanych związków w dietetyce oraz medycynie.

2. Budowa witaminy C i biogeneza

Zdolność do syntetyzowania w organizmie kwasu L-askorbinowego jest warunkowana przez obecność enzymu oksydazy L-gulon- γ -laktonowej w wątrobie, który posiada większość gatunków zwierząt. Rośliny prawdopodobnie dzięki enzymowi dehydrogenazie galaktono-laktonowej również posiadają zdolność do syntezy tego związku. W przypadku człowieka, który nie posiada takich szlaków

prowadzących do syntezy witaminy C konieczne jest jej dostarczanie wraz z pożywieniem [1]. Kwas askorbinowy będący pochodną sacharydów w organizmach zwierząt jest tworzony z D-glukozy. W przypadku roślin może być syntetyzowany z D-glukozy lub D-galaktozy. Kwas L-askorbinowy o wzorze $C_5H_8O_6$ jest t γ -laktonem kwasu 2,3-dehydro-L-gulonowego, którego wzór przedstawiono na **Rysunku 1**. Rozerwanie pierścienia t γ -laktonowego prowadzi do rozpadu kwasu na dwa związki – kwas szczawiowy i kwas L-treonowy [1].



Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu L-askorbinowego [1].

3. Dzielne zapotrzebowanie na witaminę C

Minimalne dziennie zapotrzebowanie na witaminę C jest najwyższe spośród wszystkich witamin, i wynosi około 1 mg na kilogram masy ciała u dorosłych, 2 mg/kg u niemowląt i dzieci, oraz jeszcze więcej w szczególnych okolicznościach. U kobiet w ciąży oraz karmiących zapotrzebowanie wzrasta do około 1.5 mg/kg, co jest związane z większymi wymaganiami metabolicznymi organizmu oraz koniecznością wsparcia rozwoju dziecka. Wzrost zapotrzebowania obserwuje się również u osób żyjących w przewlekłym stresie, cierpiących na choroby przewlekłe, takie jak nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca, a także u osób palących papierosy, gdyż palenie prowadzi do szybszego zużycia witaminy C w organizmie [1,2].

Ponadto, witamina C pełni funkcje antyoksydacyjne, co sprawia, że zapotrzebowanie na nią wzrasta w sytuacjach związanych z nasilonym stresem oksydacyjnym, na przykład w przypadku ekspozycji na zanieczyszczenia środowiskowe, intensywny wysiłek fizyczny, infekcje czy urazy. Zbyt niska podaż witaminy C w diecie może prowadzić do osłabienia układu odpornościowego, problemów z gojeniem ran, a w skrajnych przypadkach – do rozwinięcia szkorbutu. Warto również podkreślić, że chociaż organizm ludzki nie jest zdolny do syntezy witaminy C, jest ona łatwo dostępna w wielu produktach spożywczych, takich jak owoce cytrusowe, jagody, papryka, brokuły czy natka pietruszki. W razie niedoborów dietetycznych można ją suplementować, jednak dawki powyżej 2 g dziennie mogą powodować skutki uboczne, takie jak biegunka czy kamica nerkowa [1,2]. Przykłady owoców i warzyw zawierających witaminę C przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Zawartość witaminy C w wybranych owocach i warzywach [1].

Warzywa	Zawartość witaminy C (mg/100 g świeżej masy produktu)	Owoce	Zawartość witaminy C (mg/100 g świeżej masy produktu)
papryka	125-200	owoce dzikiej róży	250-800
pietruszka -nać	269	czarne porzeczki	150-300
brukselka	65-145	kiwi	84
szpinak	40-84	grejpfruty	30-70
pomidor	5-33	cytryny	40-60
marchew	2	pomarańcze	30-50
ziemniaki wiosenne	20-33	śliwki	5
ziemniaki zimowe	7-8	orzechy włoskie	3

4. Metody oznaczania witaminy C

4.1. Metody miareczkowe

Jedną z powszechnie stosowanych metod oznaczania zawartości witaminy C w produktach bez wyraźnego zabarwienia jest miareczkowanie z użyciem 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCPIP), zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Organizacji Standaryzacyjnej (ISO). Metoda ta opiera się na redukcji DCPIP przez kwas askorbinowy w środowisku kwaśnym. Titrant pełni również rolę wskaźnika punktu końcowego. Należy jednak unikać jej w próbkach zawierających jony metali, takie jak żelazo (II), cynk (II) czy miedź (I), ponieważ mogą one również reagować z DCPIP. Alternatywnie, można stosować miareczkowanie roztworem EDTA, który działa jako wskaźnik końca miareczkowania oraz maskuje zanieczyszczenia metalami. Zmiana koloru na żółtozłoty sygnalizuje osiągnięcie punktu końcowego. Dodatkowo, do oznaczania kwasu askorbinowego wykorzystuje się również inne metody redoksymetryczne, takie jak jodometria i bromianometria [3].

4.2. Metody spektrofotometryczne

Metody spektrofotometryczne są wygodne do szybkiego oznaczania zawartości witaminy C. Wiele z nich opiera się na redukcji jonów żelaza(III) do żelaza(II) przez kwas askorbinowy, a następnie na reakcji kompleksowania żelaza(II) z chelatorami, takimi jak 1,10-fenantrolina czy bipyrydyna. Inną metodą jest redukcja jonów miedzi(II) do miedzi(I) opracowana przez Kubilay i współpracowników. Występują również metody pośrednie, takie jak kompleksowanie żelaza(III) z tiocyjanianem lub użycie kompleksu ferrozynowego. Najbardziej popularną metodą spektrofotometryczną jest technika opracowana przez Kyaw'a, wykorzystująca kwas wolframowy jako reagent barwiący, z modyfikacjami wprowadzonymi przez Rutkowskiego i współpracowników [3].

4.3. Metody elektrochemiczne

W metodach elektrochemicznych, takich jak polarografia, wykorzystuje się redukcję kwasu dehydroaskorbinowego przez o-fenylodiaminę. Inna metoda polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego na kroplowej elektrodzie rtęciowej, co sprawdza się w analizie witaminy C w żywności, przyprawach oraz odżywkach dla niemowląt. Woltametryczne metody analizy, choć efektywne, mogą być ograniczone przez pokrywanie elektrod produktami utleniania. Ich zaletą jest

możliwość oznaczania kwasu askorbinowego w mętnych sokach owocowych, co stanowi przewagę nad innymi technikami [3].

5. Metodyka badań

W badaniu oznaczano zawartość witaminy C w mandarynkach pochodzących z różnych źródeł: z rynku lokalnego, ze sklepu Lidl, Biedronka i Carrefour. Analizę przeprowadzono przy użyciu metody spektrofotometrycznego miareczkowania redoks z zastosowaniem odczynnika 2,6-dichlorofenolindofenolowego (DCPIP).



Rysunek 2. Urządzenie pomiarowe do spektrofotometrycznego miareczkowania z zastosowaniem odczynnika DCPIP.

5.1. Sprzęt i odczynniki

- Automatyczny titrator (sprzęt laboratoryjny przeznaczony do przeprowadzenia analizy miareczkowej) – Metrohm, Szwajcaria
- System do wytwarzania wody dejonizowanej Polwater, Polska
- Octan sodu 3 hydrat cz. (czystość 99-99,9%) firmy CHEMPUR, Polska
- Wodorowęglan sodu cz. (czystość 99-99,9%) firmy WarChem, Polska
- Kwas askorbinowy L(+)- CZDA, ACS, Ph. Eur. (czystość 99.9-99.99%) firmy POCH
- 2,6 – Dichlororfenolindofenol (DCPIP) CZDA, ACS (czystość 99.9-99.99%) firmy Polska, POCH
- Kwas szczawiowy 2. Hydrat CZDA, ACS, ODCZ. (czystość 99.9-99.99%) firmy POCH, Polska

5.2. Przygotowanie roztworów

Roztwór kwasu szczawiowego:

Roztwór przygotowano w kolbie miarowej o pojemności 250 ml, odważając 0.3505 g kwasu szczawiowego, który rozpuszczono w niewielkiej ilości wody destylowanej i następnie dopełniono kolbę wodą dejonizowaną do kreski.

Roztwór DCPIP:

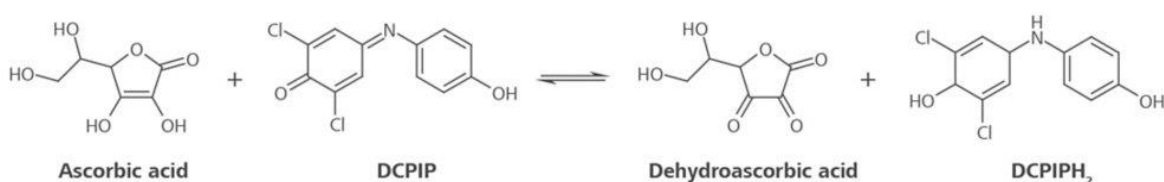
Roztwór DCPIP przygotowano w kolbie miarowej o pojemności 250 ml, rozpuszczając 0.0828 g odczynnika 2,6-dichlorofenoloindofenolowego w wodzie dejonizowanej, po czym objętość kolby dopełniono do kreski. Roztwór ten posłużył do przeprowadzania miareczkowania.

Roztwór 10% octanu sodu:

Roztwór sporządzono, rozpuszczając 0.025 g wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) w niewielkiej ilości wody dejonizowanej, a następnie uzupełniono objętość kolby do kreski.

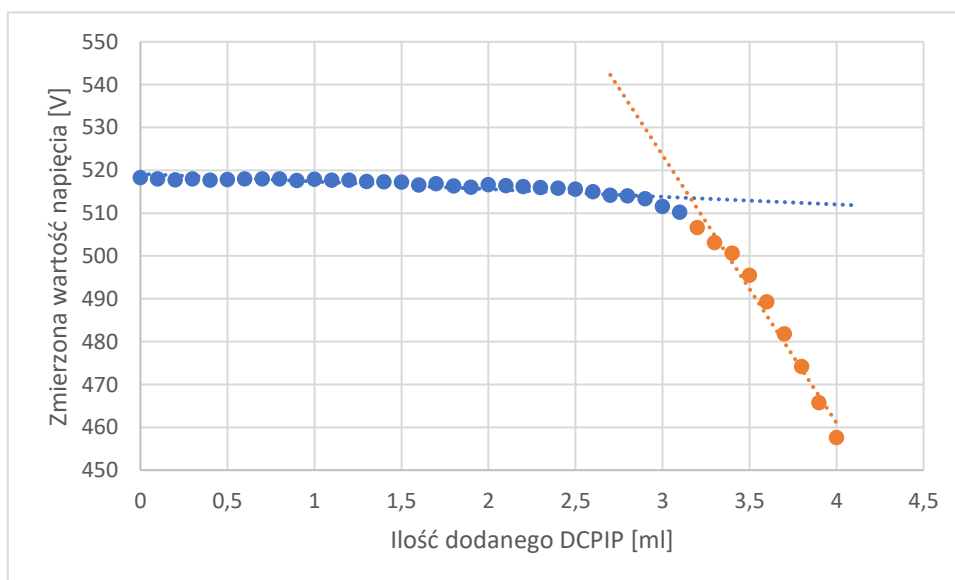
Wykonanie oznaczenia:

Pierwszym etapem przeprowadzenia oznaczenia witaminy C w mandarynkach było wyznaczenia stężenia roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu poprzez zmiareczkowanie roztworu wzorcowego witaminy C przygotowanego poprzez rozpuszczenie 0.0126g witaminy C w 10 ml kwasu szczawiowego. Przebieg reakcji zilustrowano na **Rysunku 3**.



Rysunek 3. Reakcja kwasu askorbinowego i 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCPIP) w wyniku której powstaje kwas dehydroaskorbinowy i zredukowana forma DCPIP [4].

Pomiar powtórzono 3-krotnie a przykładową krzywą miareczkowania przedstawiono na wykresie (**Rysunek 4**).



Rysunek 4. Przykładowa krzywa miareczkowania roztworu wzorcowego witaminy C roztworem 2,6-dichlorofenoloindofenolu.

Na podstawie uzyskanych krzywych miareczkowania wyznaczono punkty końcowe (PK) metodą dwóch stycznych do prostoliniowych odcinków wykresu. Na podstawie wyznaczonych objętości zużytego w miareczkowaniu 2,6-dichlorofenolindofenolu wyznaczono jego stężenie.

Następnie z otrzymanych wyników wyciągnięto średnią, której wynik posłużył do dalszych obliczeń, aby uzyskać zawartość witaminy C.

$$V_{PK\bar{s}r} = \frac{2.9593 + 3.2990 + 3.2789}{3} = 3.18[\text{ml}] \quad (1)$$

W 50 ml roztworu wzorcowego znajdowało się $1.42 \cdot 10^{-4}$ mola witaminy C. W 1 ml roztworu miareczkowanego znajdowało się $2.84 \cdot 10^{-6}$ mola witaminy C. Reakcja kwasu askorbinowego z DCPIP przebiega w stosunku molowym wynoszącym 1:1, co oznacza, że na zmiareczkowanie jednego mola witaminy C potrzeba 1 mol DCPIP. Wykorzystując powyższy stosunek, w jakim przebiega reakcja i średnią objętość titranta, obliczono stężenie DCPIP:

$$C_{DCPIP} = \frac{n_{wit.C \text{ w } 1\text{ml roztworu}}}{x_{\bar{s}r}} = \frac{1.43 \cdot 10^{-6}}{3.18} = 4.50 \cdot 10^{-7} \left[\frac{\text{mol}}{\text{ml}} \right] \quad (2)$$

5.3. Przygotowanie próbek do oznaczenia

Próbki do oznaczenia przygotowano z 3 różnych owoców dla każdego źródła pochodzenia mandarynek (zakupionych w Lidlu, Biedronce, Carrefourze i lokalnym bazarze), homogenizując miąższ i uzyskując jednorodny sok.

Każdą próbkę do badań przygotowano odmierzając kolejno do zlewki o pojemności 100 ml:

- 20 ml roztworu kwasu szczawiowego,
- 50 ml wody dejonizowanej poddanej procesowi odtlenienia,
- 1 ml roztworu octanu sodu.

Do tak przygotowanego roztworu dodawano 1 ml soku z mandarynek, a następnie miareczkowano roztworem DCPIP.

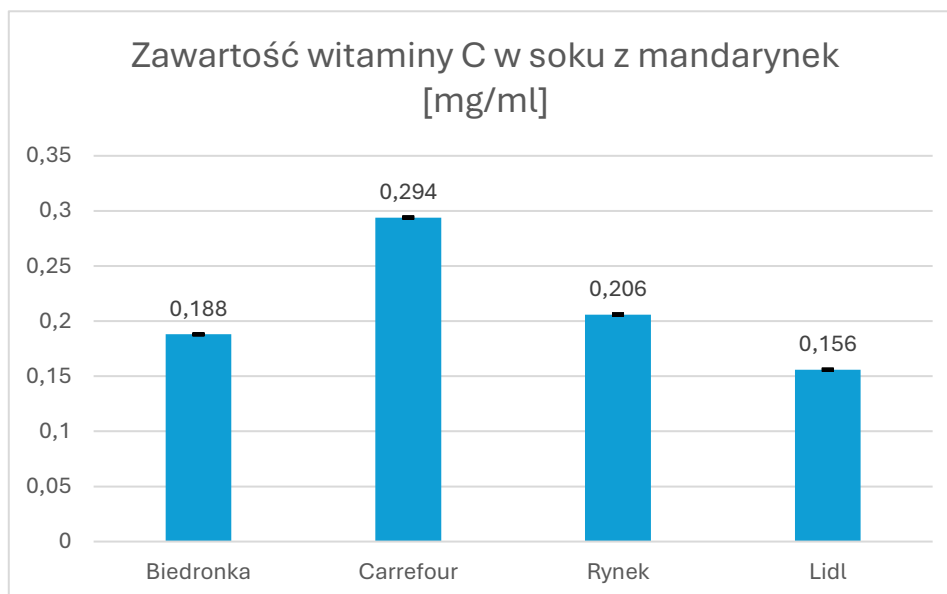
5.4. Obserwacje i przebieg reakcji

Zasada oznaczania witaminy C polega na redukcji barwnika DCPIP przez kwas askorbinowy. W celu oznaczenia kwasu askorbinowego – miareczkujemy badany roztwór soku w kwaśnym środowisku. Podczas miareczkowania obserwowano zmianę barwy roztworu. W miarę dodawania DCPIP roztwór zmieniał barwę z niebieskiego na różowy co wskazywało na zakończenie reakcji, czyli przereagowanie całej witaminy C.

5.5. Analiza wyników i obliczenia

Dla każdego rodzaju mandarynek wykonano trzy miareczkowania, a na podstawie objętości zużytego roztworu DCPIP obliczono stężenie witaminy C w próbce. Wyniki umożliwiły porównanie zawartości witaminy C w mandarynkach z różnych źródeł, a także ocenę powtarzalności zastosowanej metody.

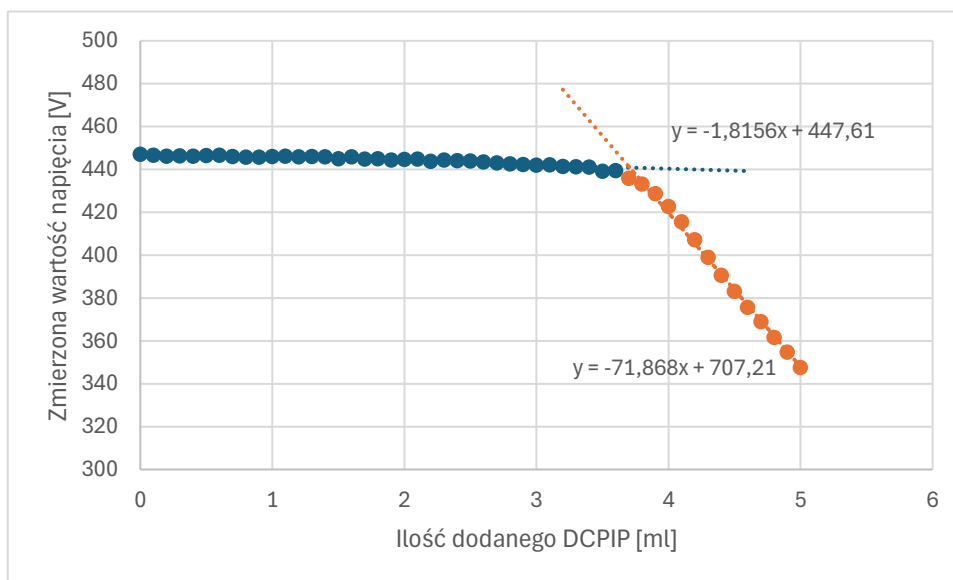
Wartości średnie wyznaczonej zawartości witaminy C w soku z mandarynek wraz z uzyskaną precyzją oznaczenia przedstawiono na wykresie (**Rysunek 5**).



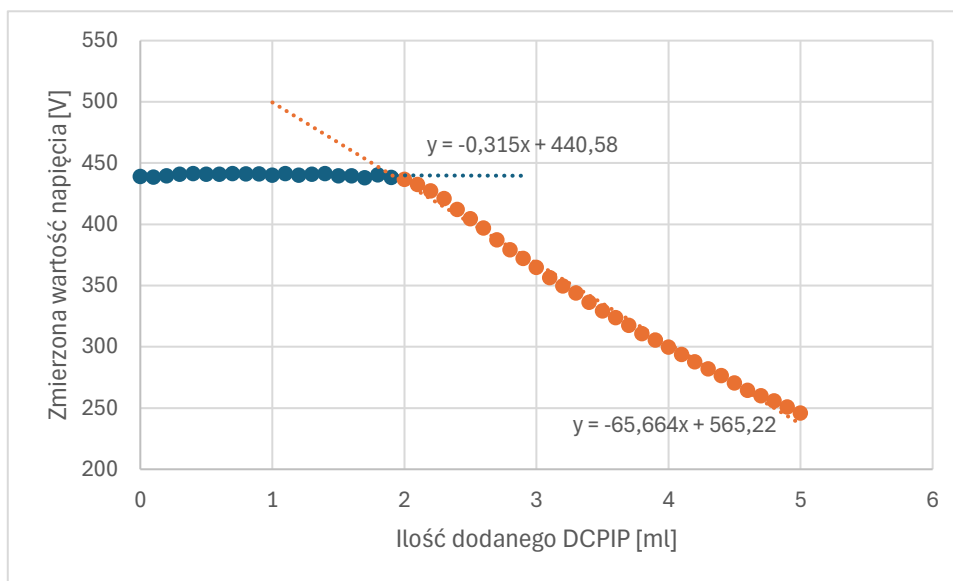
Rysunek 5. Wykres zawartości Witaminy C w soku z mandarynek.

5.6. Dokładność oznaczenia

W celu zbadania dokładności oznaczenia do próbek soku uzyskanego z mandarynek zakupionych w sklepie Lidl odmierzone dodatkowo 0.5 ml roztworu wzorcowego witaminy C. Roztwory poddano miareczkowaniu a przykładowe zestawienie uzyskanej krzywej miareczkowania dla soku mandarynek przed i po dodatku wzorca zestawiono na **Rysunku 6 i 7**. Wyznaczony odzysk wynosił 107% co potwierdza przydatność metody do oznaczeń witaminy C w sokach owoców cytrusowych techniką spektrofotometrycznego miareczkowania.



Rysunek 6. Krzywa miareczkowania roztworu zawierającego sok z mandarynek ze sklepu „Lidl” z dodatkiem wzorca.



Rysunek 7. Krzywa miareczkowania roztworu zawierającego sok z mandarynek ze sklepu „Lidl”.

5.7. Wnioski

Technika miareczkowania spektrofotometrycznego pozwoliła na oznaczenie zawartości witaminy C w soku z mandarynek. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że najwięcej kwasu askorbinowego zawierał sok z mandarynek zakupionych w sklepie „Carrefour”, na następnym miejscu znalazł się sok z mandarynek kupionych na „Rynku”. Najmniej witaminy C zawierał sok z mandarynek zakupionych w „Biedronce” i w „Lidlu”. Precyzja oznaczenia, współczynnik zmienności mandarynek wynosiła odpowiednio:

- 0.09% ze sklepu „Biedronka”,
- 0.02% ze sklepu „Carrefour”.
- 0.05% z „Rynku”,
- 0.04% ze sklepu „Lidl”.

Wszystkie wartości współczynnika zmienności wynoszą poniżej 1%, co potwierdza wysoką precyzję stosowanej metody analitycznej. Dokładność oznaczenia została zweryfikowana za pomocą testu odzysku, w którym uzyskano wartość na poziomie 107%. Wynik ten potwierdza, że metoda spektrofotometrycznego miareczkowania może być stosowana do oznaczenia witaminy C w mandarynkach.

Optymalna dawka witaminy C zależy od wieku i płci człowieka, ale również innych czynników, jak stan zdrowia i narażenie na stres. U osób dorosłych dzienne zapotrzebowanie na kwas askorbinowy to około 1 mg/kg masy ciała. W przypadku dzieci zaleca się wyższe dawki witaminy C - około 2 mg/kg masy ciała na dobę [5]. Dlatego aby pokryć dzienne zapotrzebowanie na witaminę C dla dorosłej osoby o wadze około 60 kg należy wypić około 300 ml soku ze świeżo wyciśniętych mandarynek.

Literatura

- [1] Janda, K., Kasprzak, M., & Wolska, J. (2015). Witamina C—budowa, właściwości, funkcje i występowanie. *Pom. J. Life Sci*, 61(4), 419-425.
- [2] Maćkowiak, K., & Torliński, L. (2007). Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka. *Nowiny Lekarskie*, 76(4), 349-356.
- [3] Horbacz, M., Gawron, K., Kalisz, J., Kisała, J., Żywności, S. T., & Ćwiklińskiej, U. PRZEGLĄD METOD OZNACZANIA ZAWARTOŚCI WITAMINY C.

- [4] https://www.metrohm.com/pl_pl/aktualnosci/blog/2023/oznaczenia-witaminy-C-kwasu-askorbinowego.html
- [5] <https://www.medicover.pl/suplementy/witaminy-c/> (dostęp z dnia 03.12.2024)