

LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

ESPERIENZA: DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA VITAMINA C IN UN SUCCO DI FRUTTA

Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
 - La vitamina C
 - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
 - Scheda per lo studente titolazione classica
- Come elaborare i dati
 - Scheda per lo studente determinazione strumentale
- Bibliografia/ sitografia

OBIETTIVO:

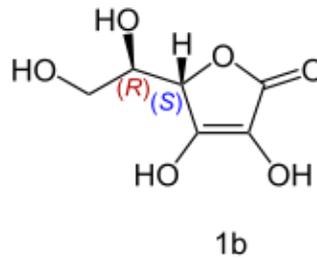
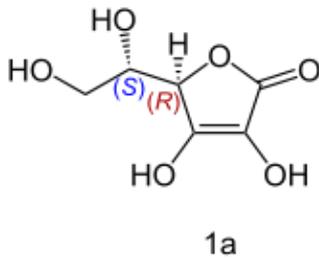
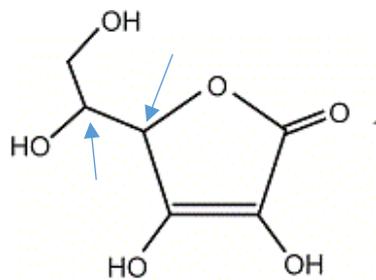
SPERIMENTARE DIVERSE TECNICHE ANALITICHE (CLASSICHE E STRUMENTALI) PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA VIT.C IN UN CAMPIONE ALIMENTARE

INTRODUZIONE

LA VITAMINA C

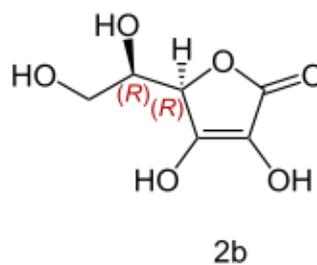
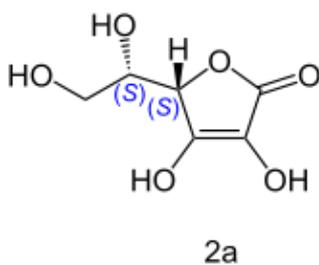
La vitamina C è uno degli enantiomeri dell'acido ascorbico, in particolare corrisponde all'acido L-ascorbico.

La formula bruta del composto è $C_6H_8O_6$ e nella immagine seguente sono indicati i due stereocentri presenti, che comportano la possibilità di avere due coppie di enantiomeri, diastereoisomeri tra loro



1a Acido L-ascorbico (vit.C)

1b Acido D-ascorbico

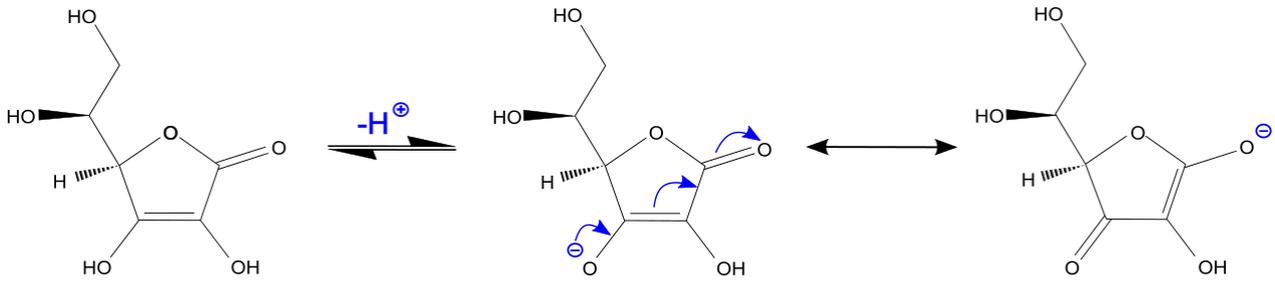


2a Acido L-isoascorbico

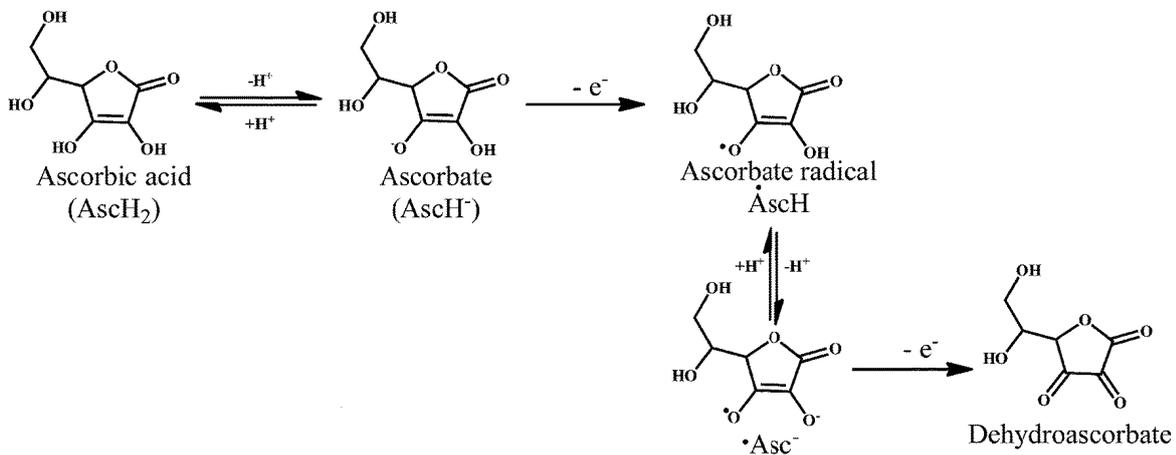
2b Acido D-isoascorbico

Il nome IUPAC della vitamina C è (5*R*)-[(1*S*)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifuran-2(5*H*)-one . Ha attività ottica $[\alpha]_D^{20} = +20$.

È un solido bianco che si scioglie bene in acqua, dando soluzioni debolmente acide ($pK_{a1} = 4,10$, $pK_{a2} = 11.6$). La prima dissociazione coinvolge l'ossidrile in C-4 e l'anione risultante è stabilizzato dalla risonanza, come si vede nelle figura seguente



La vitamina C ha inoltre proprietà riducenti: lo ione ascorbato ha infatti la capacità di perdere dapprima un elettrone, formando il radicale ascorbato e poi un secondo, trasformandosi nel deidroascorbato :



L'attività riducente della vitamina C è la ragione del suo utilizzo nell'ambito dell'industria alimentare: alla attività antiossidante si aggiungono inoltre la capacità di stabilizzare la vitamina A ed E, l'acido folico e la tiamina e di chelare ioni metallici.

La vitamina C è necessaria per una lunga serie di fondamentali reazioni metaboliche: infatti è il cofattore di enzimi che catalizzano reazioni di idrossilazione:

- l'idrossilazione della prolina e della lisina per la formazione del collagene (e quindi favorisce la rimarginazione delle ferite e previene emorragie capillari);
- l'idrossilazione della DOPA per la formazione dell'adrenalina;
- l'idrossilazione di composti aromatici nel fegato.

Non solo:

- interviene nei processi di difesa cellulare, favorendo l'eliminazione dei radicali liberi, esercitando quindi un'azione preventiva di alcune patologie tumorali (tumore del cavo orale, della laringe e dell'esofago);
- riduce la formazione di nitrosamine intestinali;
- attraverso la donazione di un elettrone al tocoferil-radicalo rigenera l'attività antiradicalica della vitamina E.
- favorisce la riduzione dell'acido folico nelle sue forme coenzimatiche;

- favorisce l'assorbimento intestinale del ferro per riduzione da Fe³⁺ a Fe²⁺;
- favorisce l'eliminazione di metalli pesanti tossici come piombo, nickel e cadmio, che si legano alla vitamina e vengono quindi escreti;
- interviene nella sintesi della serotonina, neurotrasmettitore responsabile di sensazioni come stanchezza e sazietà;
- partecipa alla sintesi della carnitina, in sinergia con gli enzimi lisina, e metionina,
- partecipa alla trasformazione enzimatica del colesterolo in acido biliare o vitamina D.

Per questi motivi la vitamina C è prodotta da quasi tutti i tipi di organismi a partire dagli zuccheri : ci sono alcune eccezioni, tra le quali ci siamo noi Homo sapiens, insieme a tutti gli *Haplorrhini*
E' quindi fondamentale introdurre questa vitamina con la dieta.

L'IDEA PORTANTE DELL'ESPERIMENTO

Abbiamo deciso di utilizzare un classico metodo di titolazione, specifico per la vitamina C: una titolazione iodimetrica diretta. La soluzione titolante sarà una soluzione di Lugol (soluzione I₂/I⁻) , la soluzione da titolare conterrà l'acido ascorbico (in quantità incognita) e l'amido svolgeràà la funzione da indicatore (in presenza di I₃⁻ forma un complesso bluastro)

Nelle titolazioni iodimetriche si utilizza iodio molecolare I₂ (o meglio I₃⁻) come standard primario: ciò vuol dire che questo reagirà direttamente con l'agente riducente, consumandosi sino a che non sarà più presente la sostanza riducente: solo allora si potrà formare il complesso amido-iodio che farà virare il colore della soluzione (lo ioduro non forma il complesso amido iodio), segnalando il punto di fine della titolazione.

La reazione sarà quindi:



L'esperienza quindi prevederà diverse fasi:

- Una prima titolazione di una soluzione di acido ascorbico a titolo noto (sarà il nostro standard)
- Una serie di prove su campioni che potrebbero essere
 - Succhi di frutta o verdura commerciali o freschi, fatti sul momento (quantità vit.C incognita)
 - Preparati / integratori nei quali si dichiara la quantità di vit.C presente
 - succhi di frutta o verdura commerciali o freschi che hanno subito diversi trattamenti (esposizione a T elevate, all'ossigeno atmosferico...)

Si propone anche una determinazione quantitativa per via spettrofotometrica, sfruttando la capacità di reagire dell'acido deidroascorbico con il 2,4-DNPH: si forma un idrazone che è solubile in acido solforico, dando origine a una soluzione rossastra. La misura a 521 nm dell'assorbanza della soluzione permette, grazie a una retta di taratura, di conoscere la quantità di acido ascorbico totale presente nel campione di partenza

LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

Reagenti

- Soluzione Lugol
- Amido solubile per iodimetria
- Acido ascorbico
- Campioni di succhi di frutta commerciali / freschi/...

Strumenti/ vetreria

- Bilancia tecnica
- Buretta da 50 mL con sostegno
- Becher da 400 mL
- Beute da 250 mL
- Matraccio da 250 mL
- Pipette tarate da 25 mL
- Cilindro graduato da 100 mL

Materiale necessario per la determinazione spettrofotometrica

- Spettrofotometro UV- cuvette di quarzo
- Soluzione acido metafosforico 5%-acido acetico glaciale 10% oppure soluzione acido ossalico circa 20mM
- Soluzione 2,6-DCPIP 0,186 mM oppure acqua di bromo
- Soluzione DNPH 10 mM
- Tiourea 13 mM
- Acido solforico 85%

SCHEDA PER LO
STUDENTE**La titolazione della vitamina C****MATERIALE**

- Soluzione Lugol
- Amido solubile per iodimetria
- Acido ascorbico
- Campioni di succhi di frutta commerciali / freschi/...

**STRUMENTAZIONE E
VETRERIA**

- Bilancia tecnica
- Buretta da 50 mL con sostegno
- Becher da 400 mL
- Beute da 250 mL
- Matraccio da 250 mL
- Pipette tarate da 25 mL
- Cilindro graduato da 100 mL

PROCEDIMENTO**Preparazione della soluzione di amido**

- Si pesano 2 g circa di amido e si sciolgono in 100 mL di acqua calda. Si lascia raffreddare la soluzione prima dell'uso.

Preparazione della soluzione standard di acido ascorbico

- Si pesano 0,250 g di acido ascorbico e li si scioglie in un piccolo quantitativo di acqua all'interno di un matraccio da 250 mL
- Si porta a volume

Si carica con la soluzione di Lugol una buretta da 50 mL, azzerando con cura

Titolazione della soluzione standard di acido ascorbico

- Si prelevano dal matraccio con una pipetta tarata 25 mL di soluzione
- Si versano in una beuta, aggiungendo circa 100 mL di soluzione
- Si aggiunge 1 mL di soluzione di amido
- Si pone la beuta sotto la buretta, sistemandola su un agitatore magnetico
- Si legge con attenzione il volume di partenza del titolante nella buretta
- Si inizia la titolazione. Il punto di viraggio sarà segnalato dalla comparsa di una colorazione bluastra all'interno della beuta (deve persistere per almeno 10 s). Fermare allora la titolazione
- Annotare il volume di Lugol presente nella buretta e calcolare per differenza il volume di titolante adoperato.
- Ripetere l'operazione almeno altre due volte. Annotare sempre i volumi.

SCHEDA PER LO
STUDENTE**La titolazione della vitamina C****Titolazione del campione contenente acido ascorbico in quantità ignota**

Caricare nuovamente la buretta, se necessario. Leggere con attenzione il volume di partenza del titolante.

- Prelevare 25 mL di succo , versarli in una beuta e aggiungere circa 100 mL di acqua
- Aggiungere 1 mL di soluzione di amido
- Sistemare la beuta sotto la buretta sull'agitatore magnetico.
- Iniziare la titolazione, procedendo esattamente come per la soluzione standard di acido ascorbico.
- Fermare la titolazione non appena compare una colorazione bluastro, annotare il volume di Lugol presente nella buretta. Calcolare per differenza il volume di titolante.
- Ripetere la titolazione altre due volte, annotando sempre i volumi di titolante utilizzati.

Se si esegue anche la determinazione strumentale, si può utilizzare uno dei reagenti (DCPIP) per eseguire una titolazione classica sul campione.

Reagenti:

Soluzione contenente vit.C 1%

DCPIP 1%

Procedere secondo le procedure classiche della titolazione, preparando ovviamente un soluzione di riferimento a concentrazione nota di vit.C per il confronto

COME ELABORARE I DATI

Per prima cosa compilare una tabella nella quale compaiono le seguenti voci:

	Volume Lugol utilizzato (mL)				
	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Media	
Standard					
Campione 1					
Campione 2					

Calcoleremo la quantità di acido ascorbico presente nei campioni incogniti utilizzando la relazione

$$\begin{array}{l}
 \text{g di acido ascorbico} \\
 \text{nel campione incognito}
 \end{array}
 = \text{mL Lugol utilizzati per il campione} \times \frac{\text{g acido ascorbico in standard}}{\text{mL Lugol utilizzati per standard}}$$

Una volta eseguiti i calcoli si potrebbe presentarli anche sotto forma di tabella o grafico

Determinazione per via spettrofotometrica

REAGENTI

- Soluzione acido ossalico circa 20mM oppure soluzione acido metafosforico 5%-acido acetico glaciale 10%
- Soluzione tiourea 13 mM
- 2,6-DCPIP 0,186 mM (necessario per ossidare l'acido ascorbico) oppure acqua di bromo (sempre per lo stesso scopo=
- DNPH 10 mM
- Acido solforico 85%
- Acido ascorbico puro per costruire retta taratura
- Campione di frutta/ succo di frutta

STRUMENTI E VETRERIA

- spettrofotometro , cuvette di quarzo 1 cm
- Bagno termico
- Bagno di ghiaccio
- Becher da 150 mL

PROCEDURA

- Si mescolano 5 g di campione con 25 mL di soluzione acida (acido ossalico o miscela acido metafosforico/acetico) – eventualmente si frulla – e si porta a 50 mL volume con la stessa soluzione .
- Si centrifuga a 4000 rpm per 15 minuti. Si prende per l'analisi il surnatante. Si immette in una provetta il campione (4 mL)
- Si aggiunge l'ossidante goccia a goccia sino al momento in cui le gocce non si scolorano più. Si aggiungono poche gocce di tiourea sino a che la soluzione non torna limpida.
- Si aggiunge 1 mL di 2,4-DNPH
- Si immette la provetta in bagno maria a 37 °C per 3 ore / a bagno maria in ebollizione per 15 min
- Si fa raffreddare in bagno di ghiaccio e poi si aggiunge una uguale quantità di acido solforico all'85%. Si lascia riposare per 15 minuti.
- Si procede all'analisi spettrofotometrica, a 521 nm.
- All'assorbanza misurata si sottrae l'assorbanza del bianco, ottenuta precedentemente su una soluzione identica a questa ma in assenza di campione.
- Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione di acido ascorbico utilizzando una retta di taratura , precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di acido ascorbico.

BIBLIOGRAFIA / SITOGRAFIA

https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ascorbique

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid_\(molecular_aspects\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid_(molecular_aspects))

www.chimica.uniba.it/it/didattica/pubblicazioni/download/file?fid=95.41

Iodimetria

<http://www.brainyresort.com/it/iodimetria-e-iodometria/>

Determinazione spettrofotometrica

<http://dspace.unive.it/bitstream/handle/10579/1098/TESI%2Bestratto%20standard.pdf?sequence=1>

<http://pmf.unsa.ba/hemija/glasnik/files/Issue%2038/38%20-%208-Kapur.pdf>

<http://scialert.net/fulltext/?doi=jbs.2006.388.392>