

Τίτλος: Πρωτόκολλο για τον φωτομετρικό προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση της σακχαρίνης

Αρχή μεθόδου Σε τιμή pH 3.8 η σακχαρίνη και η χρωστική μπλε του μεθυλενίου αποκτούν αντίθετο φορτίο και σχηματίζουν ζεύγος ιόντων. Το συγκεκριμένο ζεύγος ιόντων είναι διαλυτό στο χλωροφόρμιο και απορροφά στα 652nm.

**Υλικά/
Εξοπλισμός**

- Χλωροφόρμιο καθαρότητας analytical grade ή υψηλότερης
- Γαλακτικό οξύ καθαρότητας reagent grade ή υψηλότερης
- Πρότυπη ουσία σακχαρίνης γνωστής καθαρότητας
- Μπλε του μεθυλενίου καθαρότητας reagent grade ή υψηλότερης
- pHμετρο
- φωτόμετρο ορατού/υπεριώδους

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Τεχνικό φυλλάδιο

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα γαλακτικών συγκέντρωσης 50mM και pH 3.8.
- Διάλυμα χρωστικής μπλε του μεθυλενίου συγκέντρωσης 3.5mg/ml σε χλωροφόρμιο
- Stock διάλυμα σακχαρίνης συγκέντρωσης 0.1mg/ml στο ρυθμιστικό διάλυμα γαλακτικών
- Διάλυμα των προς ανάλυση δειγμάτων παρασκευασμένα σε συγκεντρώσεις εντός των ορίων της καμπύλης αναφοράς, με βάση την αναμενόμενη περιεκτικότητα του σε σακχαρίνη (σε περίπτωση που δεν υπάρχουν στοιχεία για την περιεκτικότητα σε σακχαρίνη, είναι απαραίτητη η παρασκευή διαλυμάτων κλιμακούμενων συγκεντρώσεων)
- Διαλύματα σακχαρίνης κλιμακούμενων συγκεντρώσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

stock διάλυμα σακχαρίνης 0.1 mg/ml (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα γαλακτικών (μl)	Τελική συγκέντρωση σακχαρίνης (mg/100ml)	Χλωροφόρμιο (μl)	Μπλε του μεθυλενίου 3.5 mg/ml (μl)
10	540	0.18	500	50
50	500	0.91	500	50
100	450	1.82	500	50
150	400	2.73	500	50
200	350	3.64	500	50
250	300	4.55	500	50
350	200	6.36	500	50
500	50	9.09	500	50
0	550	0	500	50

Μέθοδος	Αφού παρασκευαστούν τα διαλύματα με βάση τις οδηγίες του παραπάνω πίνακα, ανακινούνται με ήπια ανάδευση αρκετές φορές. Αφού αφεθούν σε ηρεμία ώστε να ξεχωρίσει η υδατική και η χλωροφορμική φάση, η χλωροφορμική φάση (κάτω) η οποία θα πρέπει σε αυτό το σημείο να έχει εντονότερο μπλε χρώμα συλλέγεται και προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 652nm.
Υπολογισμοί	Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε σακχαρίνη επιτυγχάνεται μέσω της καμπύλης αναφοράς που παρασκευάζεται με τις γνωστές συγκεντρώσεις των δειγμάτων προτύπου σακχαρίνης ως προς την απορρόφηση στα 652nm.
Τεχνικά χαρακτηριστικά	Η φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της σακχαρίνης έχει συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 > 0.99$, LOD ίσο με 0.115mg/100ml και LOQ ίσο με 0.171mg/100ml.