

抗坏血酸（维生素 C）的测定方法

在测定维生素 C 的国标方法中，荧光法为测定食物中维生素 C 含量的第一标准方法，2、4-二硝基苯肼法作为第二法。

一、荧光法

1. 原理

样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化成脱氢型抗坏血酸后，与邻苯二胺（OPDA）反应生成具有荧光的喹喔啉（quinoxaline），其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比，以此测定食物中抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的总量。

脱氢抗坏血酸与硼酸可形成复合物而不与 OPDA 反应，以此排除样品中荧光杂质所产生的干扰。本方法的最小检出限为 0.022 g/ml。

2. 适用范围

GB12392-90 本方法适用于蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定

3. 仪器

3.1. 实验室常用设备。

3.2. 荧光分光光度计或具有 350nm 及 430nm 波长的荧光计。

3.3. 打碎机。

4. 试剂

本实验用水均为蒸馏水，试剂不加说明均为分析纯试剂。

(1) 偏磷酸-乙酸液：称取 15g 偏磷酸，加入 40ml 冰乙酸及 250ml 水，搅拌，放置过夜使之逐渐溶解，加水至 500ml。4℃冰箱可保存 7~10 天。

(2) 0.15 mol/L 硫酸：取 10ml 硫酸，小心加入水中，再加水稀释至 1200ml。

(3) 偏磷酸-乙酸-硫酸液：以 0.15mol/L 硫酸液为稀释液，其余同 4.1. 配制。

(4) 50% 乙酸钠溶液：称取 500g 乙酸钠（CH₃COONa·3H₂O），加水至 1000ml。

(5) 硼酸-乙酸钠溶液：称取 3g 硼酸，溶于 100ml 乙酸钠溶液（4.4）中。临用前配制。

(6) 邻苯二胺溶液：称取 20mg 邻苯二胺，于临用前用水稀释至 100ml。

(7) 0.04%百里酚蓝指示剂溶液：称取 0.1g 百里酚蓝，加 0.02mol/L 氢氧化钠溶液，在玻璃研钵中研磨至溶解，氢氧化钠的用量约为 10.75ml，磨溶后用水稀释至 250ml。

变色范围：pH=1.2 红色

pH=2.8 黄色

pH>4.0 兰色

(8) 活性炭的活化：加 200g 炭粉于 1L 1+9 盐酸中，加热回流 1~2h，过滤，用水洗至滤液中无铁离子为止，置于 110~120℃烘箱中干燥，备用。

(9) 标准

抗坏血酸标准溶液（1mg/ml）：准确称取 50mg 抗坏血酸，用溶液（4.1）溶于 50ml 容量瓶中，并稀释至刻度。

抗坏血酸标准使用液（100 μg/ml）：取 10ml 抗坏血酸标准液，用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100ml。定容前试 pH 值，如其 pH>2.2 时，则应用溶液（4.3）稀释。

标准曲线的制备：取下述“标准”溶液（抗坏血酸含量 10 μg/ml）0.5、1.0、1.5 和 2.0ml 标准系列，取双份分别置于 10ml 带盖试管中，再用水补充至 2.0ml。

5. 操作步骤

上海洪纪仪器设备有限公司

5.1 样品制备

全部实验过程应避免光。

称取 100g 鲜样，加 100g 偏磷酸-乙酸溶液，倒入打碎机内打成匀浆，用百里酚蓝指示剂调试匀浆酸碱度。如呈红色，即可用偏磷酸-乙酸溶液稀释，若呈黄色或兰色，则用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液稀释，使其 pH 为 1.2。匀浆的取量需根据样品中抗坏血酸的含量而定。当样品液含量在 40~100 μg/ml 之间，一般取 20g 匀浆，用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100ml，过滤，滤液备用。

5.2 氧化处理：分别取样品滤液及标准使用液各 100ml 于带盖三角瓶中，加 2g 活性炭，用力振荡 1min，过滤，弃去最初数毫升滤液，分别收集其余全部滤液，即样品氧化液和标准氧化液，待测定。

5.3 各取 5ml 标准氧化液于 2 个 50ml 容量瓶中，分别标明“标准”及“标准空白”。

5.4 各取 5ml 样品氧化液于 2 个 50ml 容量瓶中，分别标明“样品”及“样品空白”。

5.5 于“标准空白”及“样品空白”溶液中各加 5ml 硼酸-乙酸钠溶液，混合摇动 15min，用水稀释至 50ml，在 4℃ 冰箱中放置 2h，取出备用。

5.6 于“样品”及“标准”溶液中各加入 5ml 15% 乙酸钠溶液，用水稀释至 50ml，备用。

5.7 荧光反应

取“标准空白”溶液，“样品空白”溶液及（5.6）中“样品”溶液各 2ml，分别置于 10ml 带盖试管中。在暗室中迅速向各管中加入 5ml 邻苯二胺，振荡混合，在室温下反应 35min，用激发光波长 338nm、发射光波长 420nm 测定荧光强度。标准系列荧光强度分别减去标准空白荧光强度为纵坐标，对应的抗坏血酸含量为横坐标，绘制标准曲线或进行相关计算，其直线回归方程供计算时使用。

6. 计算

$$X = (c \times V / m) \times F \times (100 / 1000)$$

式中：X——样品中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总含量，mg/100g；

c——由标准曲线查得或由回归方程算得样品溶液浓度，μg/ml；

m——试样质量，g；

F——样品溶液的稀释倍数；

V——荧光反应所用试样体积，ml。

例：测定每一制备溶液的荧光强度。用标准溶液每 ml 含 2.5 μg、5.0 μg、7.5 μg 及 10.0 μg，各标准浓度管读数减去相应的标准空白读数的各平均值做标准曲线。

由样品液读数减去样品液空白读数之值，从标准曲线上查得相应的抗坏血酸（μg/ml），按取样量及稀释率计算样品中抗坏血酸的含量。

如：取制备好的辣椒样品 2.138g，稀释到 100ml，氧化后分别取 10ml 滤液稀释到 50ml

样品读数为 23.34，样品空白读数为 3.188，样品读数减去样品空白读数为 20.152，查荧光标准曲线相当标准抗坏血酸的 2.23 μg。

$$2.23 \times 100 \div 50 \div 100$$

$$= 52 \text{ (mg/100g)}$$

$$2.138 \div 10 \div 1000$$

7. 注意事项

7.1 大多数植物组织内含有一种能破坏抗坏血酸的氧化酶，因此，抗坏血酸的测定应采用新鲜样品并尽快用偏磷酸-醋酸提取液将样品制成匀浆以保存维生素 C。

7.2 某些果胶含量高的样品不易过滤，可采用抽滤的方法，也可先离心，再取上清液过滤。

7.3 活性炭可将抗坏血酸氧化为脱氢抗坏血酸，但它也有吸附抗坏血酸的作用，故活性炭用量应

上海洪纪仪器设备有限公司

适当与准确，所以，应用天平称量。我们的实验结果证明，用 2g 活性炭能使测定样品中还原型抗坏血酸完全氧化为脱氢型，其吸附影响不明显。

二、2, 4-二硝基苯肼法

1. 原理

总抗坏血酸包括还原型、脱氢型和二酮古乐糖酸。样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸，再与 2, 4-二硝基苯肼作用生成红色脎，脎的含量与总抗坏血酸含量成正比，进行比色测定。

2. 适用范围

GB12392-90 本方法适用于蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定。

3. 仪器

3.1 恒温箱：37±0.5℃

3.2 可见-紫外分光光度计

3.3 打碎机

4. 试剂

本实验用水均为蒸馏水，试剂纯度均为分析纯。

4.1 4.5mol/L 硫酸：谨慎地加 250ml 硫酸（比重 1.84）于 700ml 水中，冷却后用水稀释至 1000ml。

4.2 85%硫酸：谨慎地加 900ml 硫酸（比重 1.84）于 100ml 水中。

4.3 2%, 4-二硝基苯肼溶液：溶解 2g 2, 4-二硝基苯肼于 100ml 4.5mol/L 硫酸内，过滤。不用时存于冰箱内，每次用前必须过滤。

4.4 2%草酸溶液：溶解 20g 草酸于 700ml 水中，稀释至 1000ml。

4.5 1%草酸溶液：稀释 500ml 2%草酸溶液到 1000ml。

4.6 1%硫脲溶液：溶解 5g 硫脲于 500ml 1%草酸溶液中。

4.7 2%硫脲溶液：溶解 10g 硫脲于 500ml 1%草酸溶液中。

4.8 1mol/L 盐酸：取 100ml 盐酸，加入水中，并稀释至 1200ml。

4.9 活性炭：将 100g 活性炭加到 750ml 1mol/L 盐酸中，回流 1~2h，过滤，用水洗数次，至滤液中无铁离子（Fe³⁺）为止，然后置于 110℃烘箱中烘干。

4.10 标准

(1) 抗坏血酸标准溶液（1mg/ml）：溶解 100mg 纯抗坏血酸于 100ml 1%草酸溶液中。

(2) 标准曲线绘制

加 1g 活性炭于 50ml 标准溶液中，摇动 1min，过滤。

取 10ml 滤液放入 500ml 容量瓶中，加 5.0g 硫脲，用 1%草酸溶液稀释至刻度。抗坏血酸浓度为 20 μg/ml。

取 5, 10, 20, 25, 40, 50, 60ml 稀释液，分别放入 7 个 100ml 容量瓶中，用 1%硫脲溶液稀释至刻度，使最后稀释液中抗坏血酸的浓度分别为 1, 2, 4, 5, 8, 10 及 12 μg/ml。

按样品测定步骤形成脎并比色。

以吸光值为纵坐标，以抗坏血酸浓度（μg/ml）为横坐标绘制标准曲线。

5. 操作步骤

5.1 样品制备

全部实验过程应避光。

5.1.1 鲜样制备：称 100g 鲜样和 100g 2%草酸溶液，倒入打碎机中打成匀浆，取 10-40g 匀浆（含 1-2mg 抗坏血酸）倒入 100ml 容量瓶中，用 1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。

5.1.2 干样制备：称 1-4g 干样（含 1-2mg 抗坏血酸）放入乳钵内，加入 1%草酸溶液磨成匀浆，

上海洪纪仪器设备有限公司

倒入 100ml 容量瓶中，用 1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。

5.1.3 将上述两液过滤，滤液备用。不易过滤的样品可用离心机沉淀后，倾出上清液，过滤，备用。

5.2 氧化处理：取 25ml 上述滤液，加入 0.5g 活性炭，振摇 1min，过滤，弃去最初数毫升滤液。取 10ml 此氧化提取液，加入 10ml 2%硫脲溶液，混匀。

5.3 呈色反应

5.3.1 于三个试管中各加入 4ml 稀释液。一个试管作为空白，在其余试管中加入 1.0ml 2%2, 4-二硝基苯肼溶液，将所有试管放入 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温箱或水浴中，保温 3h。

5.3.2 3h 后取出，除空白管外，将所有试管放入冰水中。空白管取出后使其冷到室温，然后加入 1.0ml 2%2, 4-二硝基苯肼溶液，在室温中放置 10~15min 后放入冰水内。其余步骤同样品。

5.3.3 85%硫酸处理：当试管放入冰水后，向每一试管中加入 5ml85%硫酸，滴加时间至少需要 1min，需边加边摇动试管。将试管自冰水中取出，在室温放置 30min 后比色。

5.3.4 比色：用 1cm 比色杯，以空白液调零点，于 500nm 波长测吸光值。

6. 计算

同荧光法。

7. 注意事项

7.1 大多数植物组织内含有一种能破坏抗坏血酸的氧化酶，因此，抗坏血酸的测定应采用新鲜样品并尽快用 2%草酸溶液制成匀浆以保存维生素 C。

7.2 若溶液中含有糖，硫酸加得太快，溶解热会使溶液变黑。

7.3 试管自冰水中取出后，颜色会继续变深，所以，加入硫酸后 30 分钟应准时比色。