

水果中维生素 c 的测定

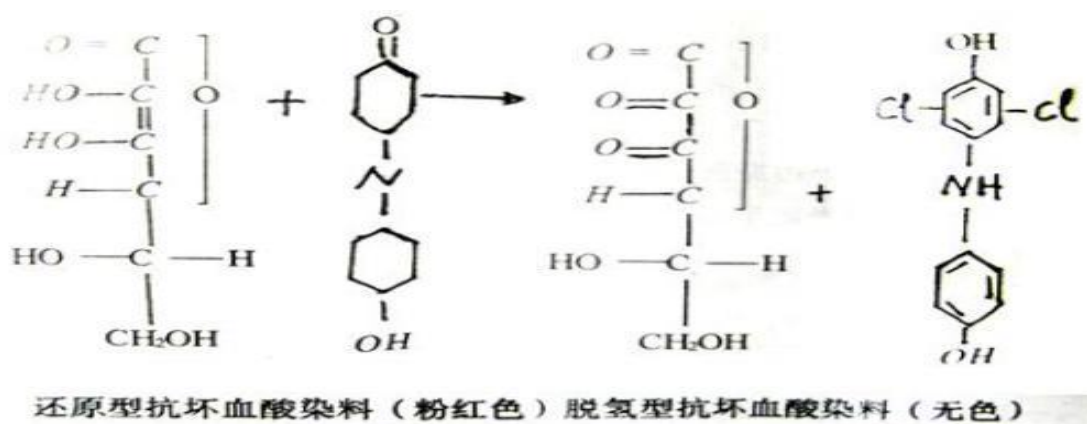
一、目的与要求：

- 1、掌握 2, 6-二氯酚靛酚测定维生素 C 的原理和方法。

二、原理：

还原型抗坏血酸能还原染料 2, 6-二氯酚靛酚，该染料在酸性中呈红色，被还原后红色消失。还原型抗坏血酸还原 2, 6-二氯酚靛酚后，本身被氧化成脱氢抗坏血酸。在没有杂质干扰时，一定量的样品提取液还原标准 2, 6-二氯酚靛酚的量与样品中所含维生素 C 的量成正比。

反应式如下：



还原型抗坏血酸染料(粉红色)脱氢型抗坏血酸染料(无色)

三、试剂：

(1) 2% 草酸溶液：溶解 20 克草酸结晶于 200 毫升水中，然后稀释至 1000ml。

(2) 1% 草酸溶液：取上述 2% 草酸溶液 500ml，用水稀释至 100

0ml。

(3) 抗坏血酸标准溶液：准确称取 20mg 抗坏血酸，溶于 1% 草酸溶液中，移入 10ml 量瓶中，并用 1% 草酸溶液稀释至 100 毫升，混匀，置冰箱中保存。

使用时吸取上述抗坏血酸 5ml，置于 50 毫升容量瓶中，用 1% 草酸溶液定容之。此标准使用液每毫升含 0.02mg 维生素 C。

标定：吸取标准使用液 5ml 于三角烧瓶中，加入 6% 碘化钾溶液 0.5ml，1% 淀粉溶液 3 滴，再以 0.001N 碘酸钾标准溶液滴定，终点为淡蓝色。

计算如下：

$$\text{抗坏血酸浓度 (mg/ml)} = (V_1 \times 0.088) / V_2$$

V_1 ：滴定时所耗 0.001N 碘酸钾标准溶液的量(ml)

V_2 ：所取抗坏血酸的量(ml)

0.088：1ml 0.0001N 碘酸钾标准溶液相当于抗坏血酸的量(mg / ml)

(4) 2.6：二氯靛酚溶液：称取碳酸氢钠 52mg，溶于 200ml 沸水中，然后称取 2,6-二氯靛酚 50mg，溶解在上述碳酸氢钠的溶液中，待冷，置于冰箱中过夜，次日过滤置于 250ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。此液应贮于棕色瓶中并冷藏，每星期至少标定 1 次。

标定方法：取 5ml 已知浓度的抗坏血酸标准溶液，加入 1% 草酸溶液 5ml，摇匀，用上述配制的染料溶液滴定至溶液呈粉红色于 15 秒不褪色为

止

每毫升染料溶液相当于 Vc 的毫克数=滴定度(T)=(C×V₁)/V₂

式中:

C: 抗坏血酸(V)的浓度(mg / ml)

V₁: 抗坏血酸的量(ml)

V₂: 消耗染料溶液量(ml)

(5)0.1N 碘酸钾溶液: 精确取干燥的碘酸钾 0.100ml。0.3567 克用水稀释至 100ml.

(6)0.001N 碘酸钾溶液: 吸取 0.1N 碘酸钾溶液 1ml, 用水稀释至 100 毫升。此溶液 1ml 相当于抗坏血酸 0.088mg。

(7)1%淀粉溶液。

(8)6%碘化钾溶液。

四、操作方法:

1、称取适量(50.0-100.0 克)样品,加等量的 2%草酸溶液,倒入组织捣碎机中捣成匀浆。称取 10.00-30.00 克浆状样品(使其含有抗坏血酸 1-5mg),置于小烧杯中,用 1%草酸溶液将样品移入 100 毫升容量瓶中,并稀释至刻度,摇匀。

2、将样液过滤,弃去最初毫升滤液。若样液具有颜色,用白陶土(应选择脱色力强但对抗坏血酸无损失的白陶土)去色,然后迅速吸取 5-10ml 滤液,置于 50ml 三角烧瓶中,用标定的 2,6-二氯靛酚染料溶液滴定之,

直至溶液呈粉红色于 15 秒内不褪色为止。

计算：

每百克样品中抗坏血酸毫克数 = $(V \cdot T) / W \times 100$

V：滴定时所耗去染料溶液的量(ml)；

T：1ml 染料溶液相当于抗坏血酸标准溶液的量(mg)

W：滴定时所取的滤液中含样品量(g)。

五、说明：

(1) 所有试剂配制最好用重蒸馏水。

(2) 样品取样后，应浸泡在已知量 2% 草酸溶液中使抗坏血酸受损失。以免发生氧化，使抗坏血酸受损失。

(3) 对动性的样品可用 10% 三氯醋酸代替 2% 草酸溶液提取；对含有大量 Fe 的样品，如储藏过久的罐头食品可用 8% 醋酸溶液代替草酸溶液提取。

(4) 整个操作过程要迅速，防止还原型抗坏血酸被氧化。

(5) 若样品滤液无色，可不加色陶土。须加白陶土的，要对每批新的白陶土测定回收率。加白陶土脱色过滤后，样品要迅速滴定。

(6) 滴定开始时，染料溶液要迅速加入，直至红色不立即消失而后尽可能一滴一滴地加入，并要不断振动三角烧瓶，直至呈粉红色于 15 秒内不消失为止。样品中可能有其他杂质也能还原 2,6-二氯靛酚，但一般杂质还原该染料的速度均较抗坏血酸慢，所以滴定时以 15 秒钟红

色不褪为终点。

(7)测定样品溶液时必须同时作一空白对照，样品溶液滴定的毫升数须扣除空白液滴定的毫升数。

实验法(二) 2.4-二硝基苯肼法

一、原理：

用酸处理过的活性炭把还原型的抗坏血酸氧化为脱氢型抗坏血酸再继续氧化为二酮古乐糖酸。二酮古乐糖酸与 2.4-二硝基苯肼偶联生成红色的络合物。其呈色的强度与二酮古乐糖酸浓度成正比，可以比色定量。

二、试剂：

(1) 1%草酸溶液。

(2) 2%草酸溶液。

(3) 酸处理过的活性炭：取 200 克活性炭，加入 10%盐酸 1000 ml，煮沸后，抽气过滤，再用沸水 1000ml 煮沸，过滤，重复用水洗至滤液中无高价铁离子(即用 1%硫氰化钾溶液试验不呈红色为止)，于 100-120℃烘干。

(4) 2%2.4-二硝基苯肼溶液：取 2 克 2.4-二硝基苯肼溶液溶于 100ml 9N 硫酸中。

(5) 9N 硫酸溶液：量取浓硫酸 250ml，慢慢地倒入 750ml 水中，加水边搅拌。

(6) 10%硫酸溶液：称取 5 克硫酸，溶解于 50ml 50%酒精中。

(7) 85%硫酸溶液：精确称取 20mg 抗坏血酸，溶解在 1%草酸中，溶液稀释至 100ml。吸取此液 50ml，加入 0.1 克活性炭，振摇 1 分钟，过滤吸取上述滤液 5ml，用 1%草酸稀释到 100 毫升(此标准使用液每毫升含 10ug 抗坏血酸)。

三、操作方法：

(1)样品的处理和分析：称取适量样品加等量的 2%草酸溶液于组织捣碎机中打成匀浆。取匀浆 20 克用 1%草酸稀释至 100ml，摇匀，过滤。

取滤液 10ml，加入 1%草酸 10ml (取滤液的量视抗坏血酸含量而定，一般控制每毫升抗坏血酸的浓度为 1-10ug)，加 1 勺活性炭，摇 1 分钟，静置过滤。

各取滤液 2 毫升于样品管和样品空白管中，各管加 1 滴硫酸溶液。于样品管中加入 2,4-二硝基苯肼 0.5ml，样品管，样品空白管加盖，置于 37℃保温箱中保温 3 小时。后取出样品管放入冰水中，样品管和样品空白管置于冰浴中，从滴点管中滴加 85%硫酸 2ml 于各管中，边滴边摇试管(为防止溶液温度升高，溶液中糖炭化而转黑色)。

将各管于冰浴中取出，在室温下放置 30 分钟后，立即在分光光度计波长 540nm 处读取光密度。根据测得的光密度，从标准曲线中查出相应的含量。

(2) 标准曲线的绘制：分别吸取抗坏血酸标准工作液 10、20、30、40、50ml，稀释至 50ml，这些标准液每毫升含有 2、4、6、8、10ug

抗坏血酸。

各取 2ml，置于各标准管中，加硫酸溶液 1 滴和 2,4-二硝基苯肼溶液 0.5ml，置各管于 30℃ 保温箱中保温 3—4 小时，取出，放在冰浴中，于各管中滴加 85% 硫酸 2.5ml 边滴边摇试管，然后取出，放置 30 分钟，于分光光度计 540nm 波长条件下测定光密度。根据测得的光密度绘制标准曲线。

同时作一试剂空白，于一试剂空白管中加入 1% 草酸溶液 2ml，操作同标准管。

计算：每百克食品中含抗坏血酸的毫克数 $= C/W \times 100$

C：相当于标准溶液的量 (mg)

W：测定时所取得样品溶液相当于样品的量 (g)

四、说明：

(1) 加入 85% 硫酸后，将试管从水中取出。溶液的颜色会继续变深所以必须计算好，加入硫酸后准于 30 分钟内比色。

(2) 硫酸可防止抗坏血酸被氧化，且可帮助准于的形成，最终溶液中硫酸的浓度均需一致，否则影响色度。