

# 中华人民共和国国家标准

## 蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定方法（荧光法和 2, 4 - 二硝基苯肼法）

GB 12392—90

**Method for determination of total ascorbic acid in fruits, vegetables and derived products—Fluorometric method and colorimetric method**

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了用荧光法和 2, 4 - 二硝基苯肼比色法测定抗坏血酸。

本标准适用于蔬菜、水果及其制品小总抗坏血酸的测定。

## 第一篇 荧光法

本标准参照采用国际标准 ISO 6557/1—1986《蔬菜、水果及其制品中抗坏血酸的测定方法》。

### 2 原理

样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸后，与邻苯二胺（OPDA）反应生成有荧光的喹啉啉（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产生的干扰，最小检出限  $0.022\mu\text{g/mL}$ 。

### 3 试剂

本实验用水均为蒸馏水。

**3.1 偏磷酸 - 乙酸液：**称取 15g 偏磷酸，加入 40mL 冰乙酸及 250mL 水，加温，搅拌，使之逐渐溶解，冷却后加水至 500mL。于 4℃ 冰箱可保存 7 ~ 10d。

- 3.2 0.15mol/L 硫酸**: 取 10mL 硫酸, 小心加入水中, 再加水稀释至 1200mL。
- 3.3 偏磷酸 - 乙酸 - 硫酸液**: 以 0.15mol/L 硫酸液为稀释液, 其余同 3.1 配制。
- 3.4 50% 乙酸钠溶液**: 称取 500g 乙酸钠 ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 加水至 1000mL。
- 3.5 硼酸 - 乙酸钠溶液**: 称取 3g 硼酸, 溶于 100mL 乙酸钠溶液 (3.4) 中。临用前配制。
- 3.6 邻苯二胺溶液**: 称取 20mg 邻苯二胺, 于临用前用水稀释至 100mL。
- 3.7 抗坏血酸标准溶液 (1mg/mL) (临用前配制)**: 准确称取 50mg 抗坏血酸, 用溶液 (3.1) 溶于 50mL 容量瓶中, 并稀释至刻度。
- 3.8 抗坏血酸标准使用液 (100 $\mu\text{g}$ /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 (3.3) 稀释。
- 3.9 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 值等于 1.2 | 红色 |
| pH 值等于 2.8       | 黄色 |
| pH 值大于 4         | 蓝色 |

- 3.10 活性炭的活化**: 加 200g 炭粉于 1L1 + 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 $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥, 备用。

## 4 仪器和设备

- 4.1 实验室常用设备**。
- 4.2 荧光分光光度计**或具有 350nm 及 430nm 波长的荧光计。
- 4.3 捣碎机**。

## 5 操作方法

- 5.1 样品液的制备**: 称取 100g 鲜样, 加 100g 偏磷酸 - 乙酸溶液 (3.1), 倒入捣碎机内打成匀浆, 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, 若呈黄色或蓝色, 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 $\mu\text{g}$ /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 测定步骤

- 5.2.1 氧化处理**: 分别取样品滤液 (5.1) 及标准使用液 (3.8) 各 100mL 于 200mL 带盖三角瓶中, 加 2g 活性炭, 用力振摇 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。

5.2.2 各取 10mL 标准氧化液于 2 个 100mL 容量瓶中，分别标明“标准”及“标准空白”。

5.2.3 各取 10mL 样品氧化液于 2 个 100mL 容量瓶中，分别标明“样品”及“样品空白”。

5.2.4 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 水稀释至 100mL，在 4℃ 冰箱中放置 2~3h，取出备用。

5.2.5 于“样品”及“标准”溶液中各加入 5mL 50% 乙酸钠液，用水稀释至 100mL，备用。

### 5.3 标准曲线的制备

取上述“标准”溶液（5.2.5）（抗坏血酸含量 10μg/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。荧光反应按 5.4。

### 5.4 荧光反应

取（5.2.4）中“标准空白”溶液，“样品空白”溶液及（5.2.5）中“样品”溶液各 2mL，分别置于 10mL 带盖试管中。在暗室迅速向各管中加入 5mL 邻苯二胺溶液，振荡混合，在室温下反应 35min，于：激发光波长 338nm、发射光波长 420nm 处测定荧光强度。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

$$X = \frac{c \cdot V}{m} \times F \times \frac{100}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

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。

## 7 结果的允许差

同一实验室平行或重复测定结果相对偏差绝对值 ≤ 10%。

## 第二篇 2, 4 - 二硝基苯胍比色法

## 8 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 - 二硝基苯胍作用生成红色脘，根据脘在硫酸溶液中的含量与总抗坏血酸含量成正比，进行比色定量。

## 9 试剂

本实验用水均为蒸馏水。试剂纯度均为分析纯。

**9.1 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。

**9.2 85% 硫酸：**谨慎地加 900mL 硫酸（比重 1.84）于 100mL 水中。

**9.3 2% 2, 4 - 二硝基苯胍溶液：**溶解 2g 2, 4 - 二硝基苯胍于 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。

**9.4 2% 草酸溶液：**溶解 20g 草酸（ $H_2C_2O_4$ ）于 700mL 水中，稀释至 1000mL。

**9.5 1% 草酸溶液：**稀释 500mL 2% 草酸溶液到 1000mL。

**9.6 1% 硫脲溶液：**溶解 5g 硫脲于 500mL 1% 草酸溶液中。

**9.7 2% 硫脲溶液：**溶解 10g 硫脲于 500mL 1% 草酸溶液中。

**9.8 1mol/L 盐酸：**取 100mL 盐酸，加入水中，并稀释至 1200mL。

**9.9 抗坏血酸标准溶液：**溶解 100mg 纯抗坏血酸于 100mL 1% 草酸小，配成每毫升相当于 1mg 抗坏血酸。

**9.10 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（ $Fe^{3+}$ ）为止，然后置于 110℃ 烘箱中烘干。

检验铁离子方法：利用普鲁士蓝反应。将 2% 亚铁氰化钾与 1% 盐酸等量混合，将上述洗出滤液滴入，如有铁离子则产生蓝色沉淀。

## 10 仪器和设备

**10.1 恒温箱：**37 ± 0.5℃。

**10.2 可见—紫外分光光度计。**

**10.3 捣碎机。**

## 11 操作步骤

### 11.1 样品的制备

全部实验过程应避光。

**11.1.1 鲜样的制备：**称 100g 鲜样和 100g<sup>2</sup>% 草酸溶液，倒入捣碎机中打成匀浆，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。

**11.1.2 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，倒入 100mL 容量瓶内，用 1% 草酸溶液稀释至刻度，混匀。

**11.1.3** 将（11.1.1）和（11.1.2）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。

**11.2 氧化处理：**取 25mL 上述滤液，加入 2g 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。

### 11.3 呈色反应

**11.3.1** 于三个试管中各加入 4mL 稀释液（11.2）。一个试管作为空白，在其余试管中加入 1.0mL 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。

**11.3.2** 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 2,4-二硝基苯肼溶液，在室温中放置 10~15min 后放入冰水内。其余步骤同样品。

**11.4 85% 硫酸处理：**当试管放入冰水后，向每一试管中加入 5mL 85% 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。

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

### 11.6 标准曲线绘制

**11.6.1** 加 2g 活性炭于 50mL 标准溶液中，摇动 1min，过滤。

**11.6.2** 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  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**11.6.3** 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,  $12\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**11.6.4** 按样品测定步骤形成脲并比色。

**11.6.5** 以吸光值为纵坐标，以抗坏血酸浓度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）为横坐标绘制标准曲线。

12 计算

$$X = \frac{c \cdot V}{m} \times F \times \frac{100}{1\ 000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：X——样品中总抗坏血酸含量，mg/100g；

c——由标准曲线查得或由回归方程算得“样品氧化液”中总抗坏血酸的浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

V——试样用 1% 草酸溶液定容的体积，mL，

F——样品氧化处理过程中的稀释倍数；

m——试样质量，g。

13 结果的允许差

同一实验室中行或重复测定相对偏差绝对值  $\leq 10\%$ 。

附加说明：

本标准由中华人民共和国卫生部卫生监督司提出，食品卫生标准分委员会审查通过。

本标准由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所起草。

本标准主要起草人王光亚、田立新。

本标准由卫生部委托技术归口单位卫生部食品卫生监督检验所负责解释。