

荧光法测定食品中维生素C的研究

李铁生 吕敏 孙灿 王沙丽

前言

维生素C广泛的存在于新鲜蔬菜、水果中，是人体不可缺少的一种营养素。由于维生素C有降血胆固醇、减缓动脉粥样硬化的作用，所以在营养与疾病防治中有重要作用。近来经常报导维生素C有增强机体对肿瘤的抵抗力，并对化学致癌物的阻断作用，另外，维生素C还是食品加工中常用的抗氧化剂、酸味剂等添加剂。因此，维生素C的研究得到普遍重视。

维生素C又称抗坏血酸，它可以在酶的作用下转化成脱氢抗坏血酸。人体本身不能合成，必须依靠膳食供给。食品中抗坏血酸含量的测定方法很多，一般采用2,4-二硝基苯肼法测定总抗坏血酸，用2,6-二氯酚靛酚的方法或碘量法测定还原型抗坏血酸。我们在以上测定方法的基础上，对荧光法测定食品中维生素C进行了研究。

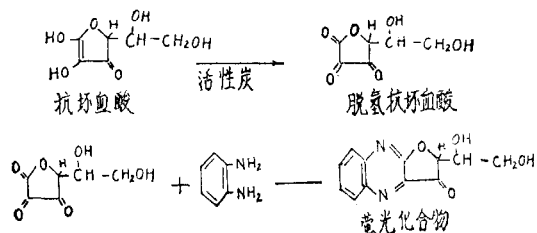
荧光分析法的特点是灵敏度高，线性关系好，重现性好，方法简便，取样容易。本实验回收率在80%以上。

材料和方法

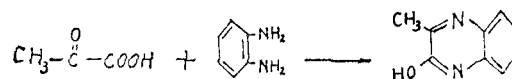
一、测量原理：

抗坏血酸在氧化剂存在下，被氧化成脱氢抗坏血酸，氧化型的抗坏血酸与邻苯二胺作用生成荧光化合物，此荧光化合物的激发波长是350nm，荧光波长在433nm，其荧光强度与含量成正比，由样品的荧光读数中减去空白，再与标准品荧光强度相比较，即可计算出抗坏血酸的含量。

反应式如下：



若样品中含丙酮酸，也能与邻苯二胺生成一种荧光化合物。



加入硼酸以后，硼酸与脱氢抗坏血酸形成的螯合物不能与邻苯二胺生成荧光化合物，而硼酸与丙酮酸并不作用，丙酮酸仍可以发生上述反应，因此，加入硼酸后再测出的荧光读数即是空白的荧光读数。

二、仪器：

日本岛津 RF-502 荧光分光光度计；组织捣碎机；离心机及实验室常用仪器。

三、试剂：

1. 0.02N 氢氧化钠。
2. 百里酚兰指示剂。
3. 0.03N 硫酸：取 0.83ml 浓硫酸用水稀释至 1000ml。
4. 乙酸钠溶液：取 500 克乙酸钠稀释至 1000ml。
5. 硼酸—乙酸钠溶液：称硼酸 9 克加入 35ml 乙酸钠，用水稀释至 100ml，用前配制。
6. 邻苯二胺溶液：称 20mg 邻苯二胺盐酸盐溶于 100ml 水中，用前配制。
7. 偏磷酸—冰醋酸溶液：称 15 克偏磷酸，加入 40ml 冰醋酸，加水稀释至 500ml，过滤后，贮存于冰箱中。
8. 抗坏血酸标准液：准确称 50mg 抗坏血酸溶于偏磷酸—冰醋酸溶液中，定容至 50ml 容量瓶中，此液浓度是 1mg/ml。
9. 溴：
10. 活性炭的处理：50 克活性炭加入 250ml 10% 盐酸，加热至沸，减压过滤，用蒸馏水冲洗活性炭，检查滤液中无 Fe⁺⁺⁺ 为止。再于

110~120°C烘干备用。

11. 偏磷酸—冰醋酸—硫酸溶液：称 15 克偏磷酸，加入 40ml 冰醋酸，用 0.03N 硫酸稀释至 500ml。

四、操作步骤：

1. 标准曲线的制备：

(1) 准确取 50ml 抗坏血酸标准液（浓度是 0.1mg/ml）于三角瓶中，在通风厨中加 2~3 滴溴，轻摇变微黄色，再通入空气将多余的溴排出，使溶液仍为无色。

若以活性炭做氧化剂时，可在三角瓶中加入 1~2 克处理好的活性炭，振摇 1 分钟后，过滤，滤液按下述步骤操作。

(2) 取两个 100ml 容量瓶，各瓶中准确加入刚处理过的标准液 5 ml，其中一个加入 40ml 乙酸钠溶液，用水定容至刻度，此液作为“标准溶液”。

另一个容量瓶中加 40ml 硼酸—乙酸钠溶液，用水定容至刻度，此液作为“标准空白”。

(3) 将十支试管置于试管架上，按下述量制备双份。

0.5ml “标准液” + 1.5ml 水，此液含抗坏血酸 1.25mg/ml。

1.0ml “标准液” + 1.0ml 水，此液含抗坏血酸 2.5mg/ml。

1.5ml “标准液” + 0.5ml 水，此液含抗坏血酸 3.75mg/ml。

2.0ml “标准液” + 0 ml 水，此液含抗坏血酸 5 mg/ml。

2.0ml “标准空白”。

(4) 避光反应：在暗室或避光条件下，迅速而准确地向以上各管加 5 ml 邻苯二胺溶液，加塞，振摇 1~2 分钟，在暗室中避光反应 35 分钟。

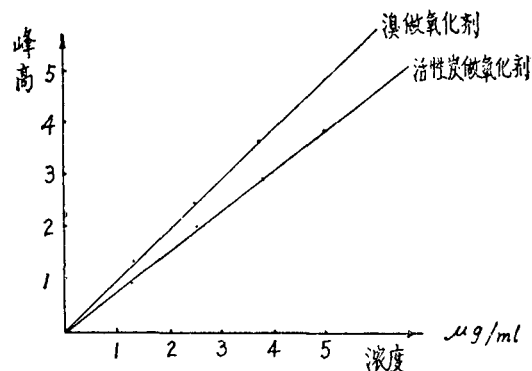
(5) 荧光测定：选择适当的仪器条件，如负高压、灵敏度、狭缝、灯电流等，固定激发波长 350nm，发射波长 433nm。

记录“标准溶液”各浓度的荧光强度（以峰高表示）和“标准空白”的荧光强度。

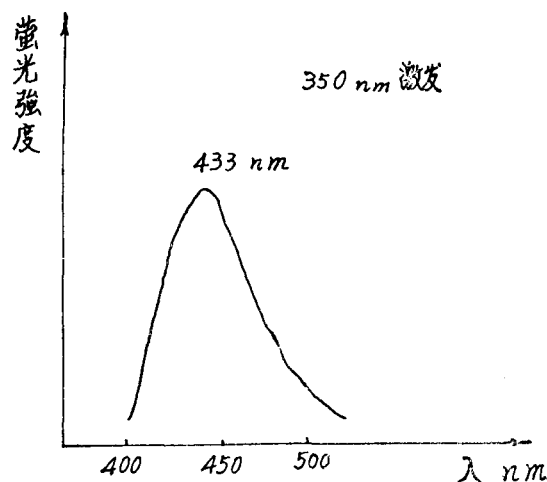
“标准溶液”荧光强度 - “标准空白”荧

光强度 = 相对荧光强度。

以相对荧光强度做纵坐标，以标准液浓度做横坐标，在坐标纸上取点，做出一条通过零点的直线：



抗坏血酸荧光扫描图谱：



仪器条件：

负高压：-800V 灯电流：21A

ex:10 350nm

em:5.8 400~500nm扫描

纸速：2 cm/min

2. 样品中抗坏血酸的测定

(1) 样品处理：取一定量的均匀样品（抗坏血酸含量约在 1 mg 左右）做为测定的总量，取少量试样加 1 滴百里酚兰，若显红色（pH=1.2）即用偏磷酸—冰醋酸溶液定容至 100ml，若显黄色（pH=2.8）即可用偏磷酸—冰醋酸—硫酸溶液定容 100ml。

定容后过滤备用。

(2) 氧化: 将全部滤液倒入三角瓶中, 加1~2克活性炭, 振摇1~2分钟, 过滤。或在通风厨内加2~3滴溴液, 振摇, 再通入空气将多余的溴排出。

(3) 取两个100ml容量瓶, 各吸20ml氧化处理过的样液, 其中一个加40ml乙酸钠, 用水定容至刻度, 作为“样品液”, 另一个加40ml硼酸-乙酸钠溶液, 用水定容至刻度, 作为“样品空白”。

(4) 取四支试管, 其中两支各加2ml“样品液”, 另两支各加2ml“样品空白”。

(5) 同1, (4)操作。

(6) 同1, (5)操作。得出样品的相对萤光强度, 从标准曲线上查出样品液中相对应的抗坏血酸浓度。

(7) 计算: 根据样品的重量和稀释倍数, 计算出样品中抗坏血酸的含量。

$$\frac{a}{W} \times V \times \frac{100}{20} = \mu\text{g/g}$$

a ——根据样品的相对萤光强度在标准曲线上查出的数, $\mu\text{g/ml}$ 。

W ——样重, g

V ——样品定容量, ml

$\frac{100}{20}$ ——本实验样品的稀释倍数。

讨 论

一、抗坏血酸的测定所用的氧化剂有活性炭, 吲哚酚、溴等, 我们采用活性炭和溴做氧化剂来进行比较, 它们都可以制作出一条通过零点的标准曲线。

1. 活性炭: 即可以起氧化作用, 又可以使样品脱色, 但加入的量要合适, 量过多, 对抗坏血酸有吸附作用, 使结果偏低。

同样的抗坏血酸量, 加入不同量的活性炭

对萤光强度的影响 表 1

加入活性炭的量	1克	2克	3克	4克	5克
萤光峰高	3.75	3.65	3.5	3.25	2.90

注: 用浓度是 $5\mu\text{g/ml}$ 的抗坏血酸, 取2ml来做

加入相同量的活性炭, 对不同浓度的抗坏

血酸萤光强度的影响 表 2

抗坏血酸用量	0.5ml	1.0ml	1.5ml	2.0ml
1克活性炭的萤光峰高	1.0	2.0	3.0	4.0
2克活性炭的萤光峰高	1.0	2.0	3.0	3.9

注: 抗坏血酸的浓度是 $5\mu\text{g/ml}$ 。

从上述两个表中看出, 过量的活性炭影响萤光强度, 而活性炭用量适当时, 即使抗坏血酸含量不同, 但对萤光强度没有影响。我们对一般样品, 用1~2克活性炭处理, 结果比较理想。

2. 溴: 是个很好的氧化剂, 但是不能脱色, 对于有颜色的样品有局限性, 可以考虑用白陶土脱色, 所以对无色样品, 用溴做氧化剂更为合适。另外, 由于溴没有吸附问题, 操作简便, 这些都比活性炭强。

总之, 对于这两种氧化剂, 各有利弊, 可针对不同的样品采用不同的氧化剂。

二、利用硼酸不与丙酮酸作用, 而只与脱氢抗坏血酸作用的性质, 在空白溶液中加入硼酸, 使脱氢抗坏血酸得到掩蔽。以往的国内外报导中, 硼酸的用量是: 3%硼酸加入5ml, 但根据我们的多次实验, 这个浓度和用量是远远达不到要求的, 即空白的萤光强度仍然很高。我们改用9%硼酸, 加入40ml, 对一般样品均能起到掩蔽作用, 个别样品, 效果仍不够好, 可以在作为“样品液”定容时, 再直接加入固体硼酸少许, 同样能起到掩蔽作用。

根据我们的实验证明: 9%硼酸已接近饱和, 再提高浓度时, 在一般室温下不易达到; 浓度低于9%, 势必要加大用量, 以致与定容量不相匹配, 因此, 我们选定的浓度是9%。在浓度确定后, 关于用量问题, 我们采取由少至多, 逐步选取的方法, 用同一样品, 采用不同的硼酸用量: 20ml、25ml、30ml、40ml、50ml、60ml, 经多次反复实验证明, 加入硼酸的量与萤光强度成反比, 但40ml、50ml、60ml的萤光强度几乎一样, 因此, 我们对一

82 年 国 外 冷 饮 新 品 种

随着食品工艺技术发展及市场新的需求,各国冷饮厂家竞相研制新的冷饮品种,有些已经研制成功,正在申请专利中。这些新品种制作简单,利润大,适应各种消费者需要,将成为冷饮市场强大的竞争者。

一、含酒雪糕 以百分之百的乙醇作付材料配入雪糕中,乙醇比例可达50%,完全不会分离。一般在冷饮店里,用5~10%的白兰地或葡萄酒可为广大消费者欢迎。也可在工厂大批生产。

二、酸乳酪雪糕 使酸乳酪均匀地分布于雪糕中,做到没有气味并不困难,只是太费工夫,不能制成商品出售。现在申请专利的是一种较为简便的方法,即仅使酸乳酪都分着色,再夹入着色的果子酱层,构成多彩冰激凌。批量生产时还需加工冻结成型,成型成本计入商品价值内。一般冷饮店等亦可进行中等规模的批量生产。

三、带奶酪颗粒的雪糕 制作这种雪糕的难点是如何将冻结的奶酪颗粒均匀地分布在雪糕内。使雪糕有奶油味容易,但使乳酪怎样溶

解在雪糕内仍保留其天然的香味却很难。在作西式糕点中也有同样问题。研制成的方法是用牛奶制成奶酪,并使用奶酪发酵菌,保留了奶酪原有的风味,也防止了奶酪的冻结。

四、带水果颗粒的雪糕 这也是应广大消费者需要研制的。带水果的雪糕有许多难点,例如雪糕冻结时水果的水份及糖份等也冻结,水果颗粒一经冻结也降低了品质;另外水果颗粒在冷冻机中会被粉碎,使冷冻工艺变得非常复杂。现在研制成功的完全保密的方法,可将柑桔的肉粒结合进雪糕里,还可结合进红色草莓制成多味多彩而又富营养的雪糕。此外还可结合蔬菜绿叶或海藻等供作病人或增进健康用。

五、不含乳类的奶味冰棒 世界性的环境污染,使得人们越来越需要有牛奶营养价值而又不是牛奶的饮料。现已可制成完全不用牛奶成分的超过牛奶营养价值的饮料。同时以此饮料为基础也制成了不含牛奶的奶味冰棒。所用设备也只是一般制冰棒的设备。

毛延年据(日)“食品工业”

1981年11月15日P.97

般样品采用了40ml的用量已足够了。

三、由于影响荧光强度的因素很多,各次测定条件很难完全一致,因此,标准曲线最好与样品同时做。根据稀溶液中产生的荧光强度与溶液浓度成正比的性质,也可以采用外标定点法来直接进行比较,计算出样品中抗坏血酸的含量,其结果与工作曲线法十分接近。由于样品是未知含量,所以,外标法的标准液浓度可以选两个定点,以弥补选择一点而带来的误差。

外标定点法:

标准液的制备同前,按下述量制备双分:

2.0ml “标准液” + 0 ml水

1.0ml “标准液” + 1.0ml水

2.0ml “标准空白” + 0 ml水

1.0ml “标准空白” + 1.0ml水

避光反应以及荧光测定同前

计算:

$$(a - a_0) : y = (b - b_0) : x$$

a : 标准液的荧光强度

a_0 : 标准空白的荧光强度

b : 样品的荧光强度

b_0 : 样品空白的荧光强度

y : 标准液中含抗坏血酸的量

x : 样品中含抗坏血酸的量

四、试剂的配制和保存十分重要,邻苯二胺溶液在空气中颜色变暗,影响显色,因此,要临用前配制。

偏磷酸(HPO_3)极易溶于水,它与水相结合渐变成为磷酸,配制好的偏磷酸—冰醋酸混合液在冰箱中保存7~10天为宜。