



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.86—2003  
代替 GB/T 12392—1990

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

Determination of total ascorbic acid in fruits,  
vegetables and derived products—Fluorometric  
method and colorimetric method

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准第一法对应于 ISO 6557-1:1986《蔬菜、水果及其制品中抗坏血酸的测定方法》和 AOAC 967.22《维生素制品中总维生素 C 的微量荧光测定方法》。

本标准与 ISO 6557-1 和 AOAC 967.22 的一致性程度为非等效。

· 本标准代替 GB/T 12392—1990《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)》。

本标准与 GB/T 12392—1990 相比主要修改如下:

——修改了标准的中文名称,标准中文名称改为《蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定(荧光法和 2,4-二硝基苯肼法)》;

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分:化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

本标准主要起草人:王光亚、杨晓莉、田立新。

原标准于 1990 年首次发布,本次为第一次修订。

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

### 1 范围

本标准规定了用荧光法和 2,4-二硝基苯胂比色法测定食品中的抗坏血酸。

本标准适用于蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定。

本方法检出限:荧光法为  $0.022 \mu\text{g/mL}$ , 2,4-二硝基苯胂比色法为  $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。线性范围:荧光法为  $5 \mu\text{g/mL} \sim 20 \mu\text{g/mL}$ , 2,4-二硝基苯胂比色法为  $1 \mu\text{g/mL} \sim 12 \mu\text{g/mL}$ 。

### 第一法 荧光法

### 2 原理

试样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(quinoxaline),其荧光强度与抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比,以此测定食品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,以此排除试样中荧光杂质产生的干扰。

### 3 试剂

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

3.2 0.15 mol/L 硫酸:取 10 mL 硫酸,小心加入水中,再加水稀释至 1 200 mL。

3.3 偏磷酸-乙酸-硫酸液:以 0.15 mol/L 硫酸液为稀释液,其余同 3.1 配制。

3.4 乙酸钠溶液(500 g/L):称取 500 g 乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ),加水至 1 000 mL。

3.5 硼酸-乙酸钠溶液:称取 3 g 硼酸,溶于 100 mL 乙酸钠溶液(3.4)中。临用前配制。

3.6 邻苯二胺溶液(200 mg/L):称取 20 mg 邻苯二胺,临用前用水稀释至 100 mL。

3.7 抗坏血酸标准溶液( $1 \text{ mg/mL}$ )(临用前配制):准确称取 50 mg 抗坏血酸,用偏磷酸-乙酸溶液(3.1)溶于 50 mL 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 10 mL 抗坏血酸标准液,用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100 mL,定容前试 pH 值,如其  $\text{pH} > 2.2$  时,则应用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(3.3)稀释。

3.9 0.04% 百里酚蓝指示剂溶液:称取 0.1 g 百里酚蓝,加 0.02 mol/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 10.75 mL,磨溶后用水稀释至 250 mL。

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 200 g 炭粉于 1 L 盐酸(1+9)中,加热回流 1 h~2 h,过滤,用水洗至滤液中无铁离子为止,置于  $110^\circ\text{C} \sim 120^\circ\text{C}$  烘箱中干燥,备用。

### 4 仪器

4.1 实验室常用设备。

4.2 荧光分光光度计或具有 350 nm 及 430 nm 波长的荧光计。

4.3 捣碎机。

5 分析步骤

5.1 试样的制备

称取 100 g 鲜样,加 100 mL 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。均浆的取量需根据试样中抗坏血酸的含量而定。当试样液含量在 40 μg/mL~100 μg/mL 之间,一般取 20 g 匀浆,用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100 mL,过滤,滤液备用。

5.2 测定

5.2.1 氧化处理:分别取试样滤液(5.1)及标准使用液(3.8)各 100 mL 于 200 mL 带盖三角瓶中,加 2 g 活性炭,用力振摇 1 min,过滤,弃去最初数毫升滤液,分别收集其余全部滤液,即试样氧化液和标准氧化液,待测定。

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

5.2.3 各取 10 mL 试样氧化液于 2 个 100 mL 容量瓶中,分别标明“试样”及“试样空白”。

5.2.4 于“标准空白”及“试样空白”溶液中各加 5 mL 硼酸-乙酸钠溶液,混合摇动 15 min,用水稀释至 100 mL,在 4℃ 冰箱中放置 2 h~3 h,取出备用。

5.2.5 于“试样”及“标准”溶液中各加入 5 mL 500 g/L 乙酸钠液,用水稀释至 100 mL,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 10 μg/mL)0.5、1.0、1.5 和 2.0 mL 标准系列,取双份分别置于 10 mL 带盖试管中,再用水补充至 2.0 mL。荧光反应按 5.4 操作。

5.4 荧光反应

取 5.2.4 中“标准空白”溶液,“试样空白”溶液及 5.2.5 中“试样”溶液各 2 mL,分别置于 10 mL 带盖试管中。在暗室迅速向各管中加入 5 mL 邻苯二胺溶液,振摇混合,在室温下反应 35 min,于激发光波长 338 nm、发射光波长 420 nm 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使用。

6 结果计算

见式(1)。

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

式中:

X——试样中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

c——由标准曲线查得或由回归方程算得试样溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

m——试样的质量,单位为克(g);

V——荧光反应所用试样体积,单位为毫升(mL);

F——试样溶液的稀释倍数。

计算结果表示到小数点后一位。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。



## 第二法 2,4-二硝基苯肼比色法

### 8 原理

总抗坏血酸包括还原型、脱氢型和二酮古乐糖酸,试样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,根据脎在硫酸溶液中的含量与抗坏血酸含量成正比,进行比色定量。

### 9 试剂

9.1 4.5 mol/L 硫酸:谨慎地加 250 mL 硫酸(相对密度 1.84)于 700 mL 水中,冷却后用水稀释至 1 000 mL。

9.2 85%硫酸:谨慎地加 900 mL 硫酸(相对密度 1.84)于 100 mL 水中。

9.3 2,4-二硝基苯肼溶液(20 g/L):溶解 2 g 2,4-二硝基苯肼于 100 mL 4.5 mol/L 硫酸中,过滤。不用时存于冰箱内,每次用前必须过滤。

9.4 草酸溶液(20 g/L):溶解 20 g 草酸( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ )于 700 mL 水中,稀释至 1 000 mL。

9.5 草酸溶液(10 g/L):取 500 mL 草酸溶液(9.4)稀释至 1 000 mL。

9.6 硫脲溶液(10 g/L):溶解 5 g 硫脲于 500 mL 草酸溶液(9.5)中。

9.7 硫脲溶液(20 g/L):溶解 10 g 硫脲于 500 mL 草酸溶液(9.5)中。

9.8 1 mol/L 盐酸:取 100 mL 盐酸,加入水中,并稀释至 1 200 mL。

9.9 抗坏血酸标准溶液:称取 100 mg 纯抗坏血酸溶解于 100 mL 草酸溶液(9.4)中,此溶液每毫升相当于 1 mg 抗坏血酸。

9.10 活性炭:将 100 g 活性炭加到 750 mL 1 mol/L 盐酸中,回流 1 h~2 h,过滤,用水洗数次,至滤液中无铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )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 20 g/L 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

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 分析步骤

#### 11.1 试样的制备

全部实验过程应避光。

11.1.1 鲜样的制备:称取 100 g 鲜样及吸取 100 mL 20 g/L 草酸溶液,倒入捣碎机中打成匀浆,取 10 g~40 g 匀浆(含 1 mg~2 mg 抗坏血酸)倒入 100 mL 容量瓶中,用 10 g/L 草酸溶液稀释至刻度,混匀。

11.1.2 干样制备:称 1 g~4 g 干样(含 1 mg~2 mg 抗坏血酸)放入乳钵内,加入 10 g/L 草酸溶液磨成匀浆,倒入 100 mL 容量瓶内,用 10 g/L 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。不易过滤的试样可用离心机离心后,倾出上清液,过滤,备用。

#### 11.2 氧化处理

取 25 mL 上述滤液,加入 2 g 活性炭,振摇 1 min,过滤,弃去最初数毫升滤液。取 10 mL 此氧化提取液,加入 10 mL 20 g/L 硫脲溶液,混匀,此试样为稀释液。

11.3 呈色反应

11.3.1 于三个试管中各加入 4 mL 稀释液(11.2)。一个试管作为空白,在其余试管中加入 1.0 mL 20 g/L 2,4-二硝基苯肼溶液,将所有试管放入 37°C±0.5°C 恒温箱或水浴中,保温 3 h。

11.3.2 3 h 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 1.0 mL 20 g/L 2,4-二硝基苯肼溶液,在室温中放置 10 min~15 min 后放入冰水内。其余步骤同试样。

11.4 85%硫酸处理

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

11.5 比色

用 1 cm 比色杯,以空白液调零点,于 500 nm 波长测吸光值。

11.6 标准曲线的绘制

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

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

11.6.3 取 5,10,20,25,40,50,60 mL 稀释液,分别放入 7 个 100 mL 容量瓶中,用 10 g/L 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 µg/mL。

11.6.4 按试样测定步骤形成脲并比色。

11.6.5 以吸光值为纵坐标,抗坏血酸浓度(µg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

12 结果计算

见式(2)。

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

式中:

X——试样中总抗坏血酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

c——由标准曲线查得或由回归方程算得“试样氧化液”中总抗坏血酸的浓度,单位为微克每毫升(µg/mL);

V——试样用 10 g/L 草酸溶液定容的体积,单位为毫升(mL)。

F——试样氧化处理过程中的稀释倍数;

m——试样的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后两位。

13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。