

还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚滴定法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

维生素 C(VitaminC)是一种具有抗氧化性质的有机化合物，又称抗坏血酸，是高等灵长类动物与其他少数生物的必需营养素，在生物体内，维生素 C 是一种抗氧化剂，同时也是一种辅酶，为酸性己糖衍生物，是烯醇式己糖酸内酯，可保护身体免于自由基的威胁，其广泛的食物来源为新鲜的蔬菜和水果，Vc 有 L-抗坏血酸和 D-抗坏血酸，而且两种都具有强还原性，但只有 L-抗坏血酸对人体具有生物活性。L-抗坏血酸有还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸两种，前者含量较高，在一般蔬菜和水果中占 90%以上，L-还原型抗坏血酸极易被氧化为 L-脱氢抗坏血酸 L-脱氢抗坏血酸亦可被还原为 L-还原型抗坏血酸，通常也称作氧化型抗坏血酸。

还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚滴定法)检测原理是还原型维生素 C 易被氧化型的 2,6-二氯酚靛酚氧化成氧化型维生素 C，2,6-二氯酚靛酚不仅是一种氧化剂，而且是一种酸碱指示剂，在中性和碱性溶液中呈蓝色，在酸性溶液中为红色，而被还原的 2,6-二氯酚靛酚为无色，当用 2,6-二氯酚靛酚滴定含有维生素 C 的酸性溶液时维生素 C 尚未完全被氧化前，滴下的 2,6-二氯酚靛酚立即被还原成无色；一旦维生素 C 全部被氧化时，滴下的 2,6-二氯酚靛酚立即被氧化成粉红色，因此当溶液从无色转变为微红色时即表示维生素 C 刚刚全部被氧化，此时即为滴定终点，若无其他杂质干扰，待测样品所还原的标准 2,6-二氯酚靛酚量与样品中所含的还原型维生素 C 量成正比，常用于蔬菜、水果及其制品中还原型维生素 C 含量的测定。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格	保存条件
还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚滴定法)	50T	4℃
试剂(A):VitaminC 标准	10ml	RT
试剂(B):组织匀浆液(6×)	2×250ml	4℃
试剂(C):二氯酚靛酚	50ml	4℃避光
试剂(D):二氯酚靛酚稀释液	250ml	RT
使用说明书	1 份	
有效期	6 个月	

自备材料:

- 1、组织捣碎器、匀浆器
- 2、滤纸、漏斗
- 3、50ml 容量瓶
- 4、100ml 三角烧瓶
- 5、10ml 吸管
- 6、5ml 微量滴定管

操作步骤(仅供参考):

- 1、配制 1×组织匀浆液: 按组织匀浆液(6×): 蒸馏水=1: 5 的比例稀释, 即得。
- 2、制备样品提取液: 清洗干净新鲜蔬菜或水果, 用布或吸水纸吸干表面水分或自然晾干。称取 5g, 加入 5ml 的 1×组织匀浆液, 置于组织捣碎器中打成浆状, 滤纸过滤, 滤液倒入 50ml 容量瓶内, 滤渣可用 1×组织匀浆液重复匀浆 1~2 次, 合并滤液倒入容量瓶内, 定容滤液总体积至 50ml。
- 3、配制 VitaminC 标准液: 取少量 1×组织匀浆液加入 10mgVitaminC 标准中, 充分混匀, 然后完全转移至 1×组织匀浆液, 即为 VitaminC 标准液(0.1mg/ml)。注意: 溶解应完全、准确, 否则有可能导致标准液不准确, 配制好的 VitaminC 标准液 4℃避光保存, 4 周有效(最好临用前配制)。
- 4、配制二氯酚靛酚标准液: 取少量二氯酚靛酚稀释液加入 50mg 二氯酚靛酚中, 充分混匀, 然后完全转移至二氯酚靛酚稀释液中, 并定容至 250ml, 即为二氯酚靛酚标准液(0.2mg/ml)。注意: 溶解应完全、准确, 否则有可能导致标准液不准确, 配制好的二氯酚靛酚标准液 4℃避光保存, 1 周有效。
- 5、标定二氯酚靛酚标准液: 准确吸取 1mlVitaminC 标准液(0.1mg/ml), 置于三角烧瓶中, 加入 9ml1×组织匀浆液, 用微量滴定管以二氯酚靛酚标准液进行滴定, 直至呈现淡红色, 并保持 15s 不褪色, 即为滴定终点, 记录染料的用量(V1); 另取一个三角烧瓶, 用 1×组织匀浆液 10ml 做空白对照, 按相同方法滴定, 记录染料的用量(V2), 由于 1mlVitaminC 标准液含量是已知的, 即 0.1mg; 由所用二氯酚靛酚标准液的体积可计算出 1ml 二氯酚靛酚相当于 VitaminC 的毫克数, 即滴定度 T(重复 3 次, 取平均值)。
- 6、维生素 C 样品滴定: 准确吸取滤液 10ml 置于 100ml 三角烧瓶内, 按相同方法滴定, 记录染料的用量(V3)(重复 3 次, 取平均值)。

计算:

100g 样品中维生素 C 的质量(mg)=(V3-V2)×VT/(Vs×m)×T×100

T(mg/ml)=0.1×1/(V1-V2)

式中: VT=样品提取液的总体积(ml)

V_s =滴定时所取的样品提取液体积(ml)

V_1 =染料标定所用的二氯酚靛酚标准液的体积(ml) V_2 =空白标定所用的二氯酚靛酚标准液的体积(ml) V_3 =样品提取液标定所用的二氯酚靛酚标准液的体积(ml)

T=滴定度，即 1ml 二氯酚靛酚相当于 VitaminC 的毫克数(mg/ml)

m=制备样品提取液所用的样品质量(g)

注意事项:

- 1、组织匀浆液(6×)久置或低温保存，容易产生乳白色浑浊；如果白色浑浊不明显，可以直接使用，不影响效果；如果白色浑浊较多，应弃用。
- 2、配好的 VitaminC 标准液 4℃避光保存，4 周有效(最好临用前配制)，也可-20℃保存。
- 3、配好的二氯酚靛酚标准液 4℃避光保存，1 周有效；如有条件可称取二氯酚靛酚 10mg，加入二氯酚靛酚稀释液并定容至 50ml 后使用，可避免浪费试剂。
- 4、本产品提供的组织匀浆液可用于大部分的蔬菜和水果等样品，可抑制抗坏血酸氧化酶活性。
- 5、松针类样品宜用 1%盐酸溶液提取。
- 6、若样品中含大量 Fe^{2+} ，可用 8%醋酸溶液提取， Fe^{2+} 不会很快与染料起作用。
- 7、待测样本如不能及时测定，应置于 2~8℃避光保存，3 天内稳定。
- 8、样品切碎的过程中，尽量避免与铁器、铜器接触，并且尽量迅速。
- 9、某些水果、蔬菜浆状物泡沫太多，可滴加数滴丁醇或辛醇等。
- 10、如用干滤纸过滤，应弃去起初的数毫升滤液，也可离心取上清。
- 11、如果浆状物不易过滤，可低速离心，留取上清液进行滴定。
- 12、样品提取液要避免日光直射，否则会加速抗坏血酸的氧化。
- 13、如果提取物中含有较多色素，可用白陶土脱色过滤后再滴定，或加入 1ml 氯仿，到达滴定终点时，氯仿层呈现淡红色。也可采用二甲苯萃取比色法进行测定。
- 14、如果样品是流质（如橙汁等），则无需研磨，直接取 5ml 汁液，加入等量的 1×组织匀浆液混匀后滴定即可。
- 15、为了防止还原型维生素 C 被氧化，滴定应迅速，一般不超过 2min。
- 16、滴定所用的二氯酚靛酚标准液一般控制在 1~4ml 之间，2ml 左右最好。
- 17、滴定开始时二氯酚靛酚标准液应迅速加入，随后尽量一滴一滴的加入，并不断摇动三角烧瓶，直至呈粉红色，且保持 15s 不褪色，这样可以减少其他杂质的干扰。
- 18、如果样品浓度过高，应用蒸馏水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。

附录：该试剂盒提供的试剂均经严格称量或容量瓶定容，如果试剂盒开封使用后或可考虑 VitaminC 标准液不再标准时，尤其是配制 VitaminC 标准液后，放置过久，可以考虑重新标定 VitaminC 标准液含量。其方法如下：

将 VitaminC 标准液(0.1mg/ml)用 1×组织匀浆液稀释至 0.02mg/ml，取 VitaminC 标准液(0.02mg/ml)5ml 置于三角烧瓶中，加入 6%碘化钾溶液 0.5ml，1%淀粉指示剂 3 滴，再以 0.001mol/L 碘酸钾标准液进行滴定，终点为蓝色。

维生素 C 浓度(mg/ml)= $0.088 \times V1/V2$

式中：V1=滴定时所消耗的碘酸钾标准液的量(ml)

V2=滴定时所取的 VitaminC 标准液的量(ml)

0.088=1ml 碘酸钾标准液相对于 VitaminC 的量(mg)