

维生素C的提取及 含量测定

一、实验目的

- 学习维生素C的重要性质
- 掌握2,6-二氯酚靛酚法测定维生素C的原理和方法

二、实验原理

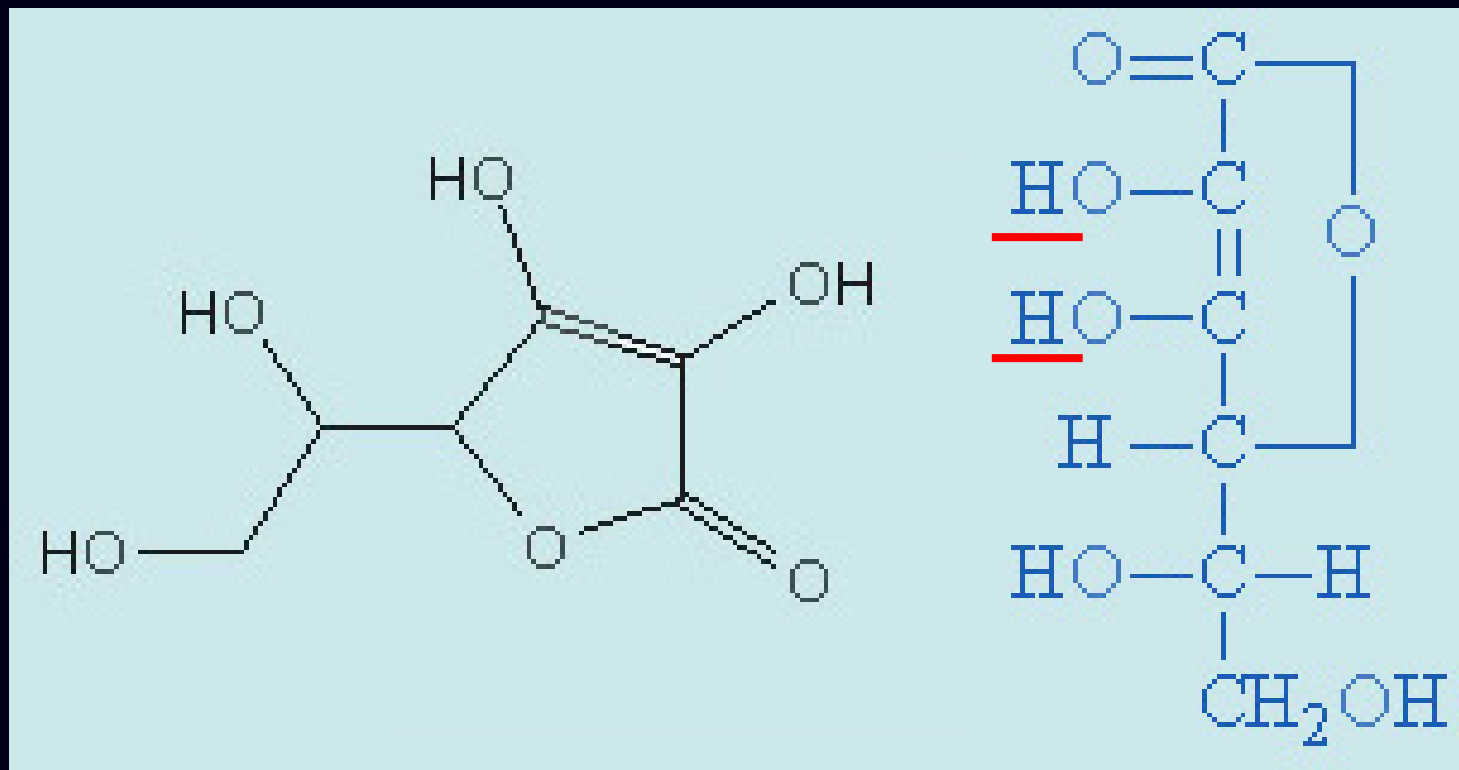
- 维生素C的结构与性质
- 维生素定量测定

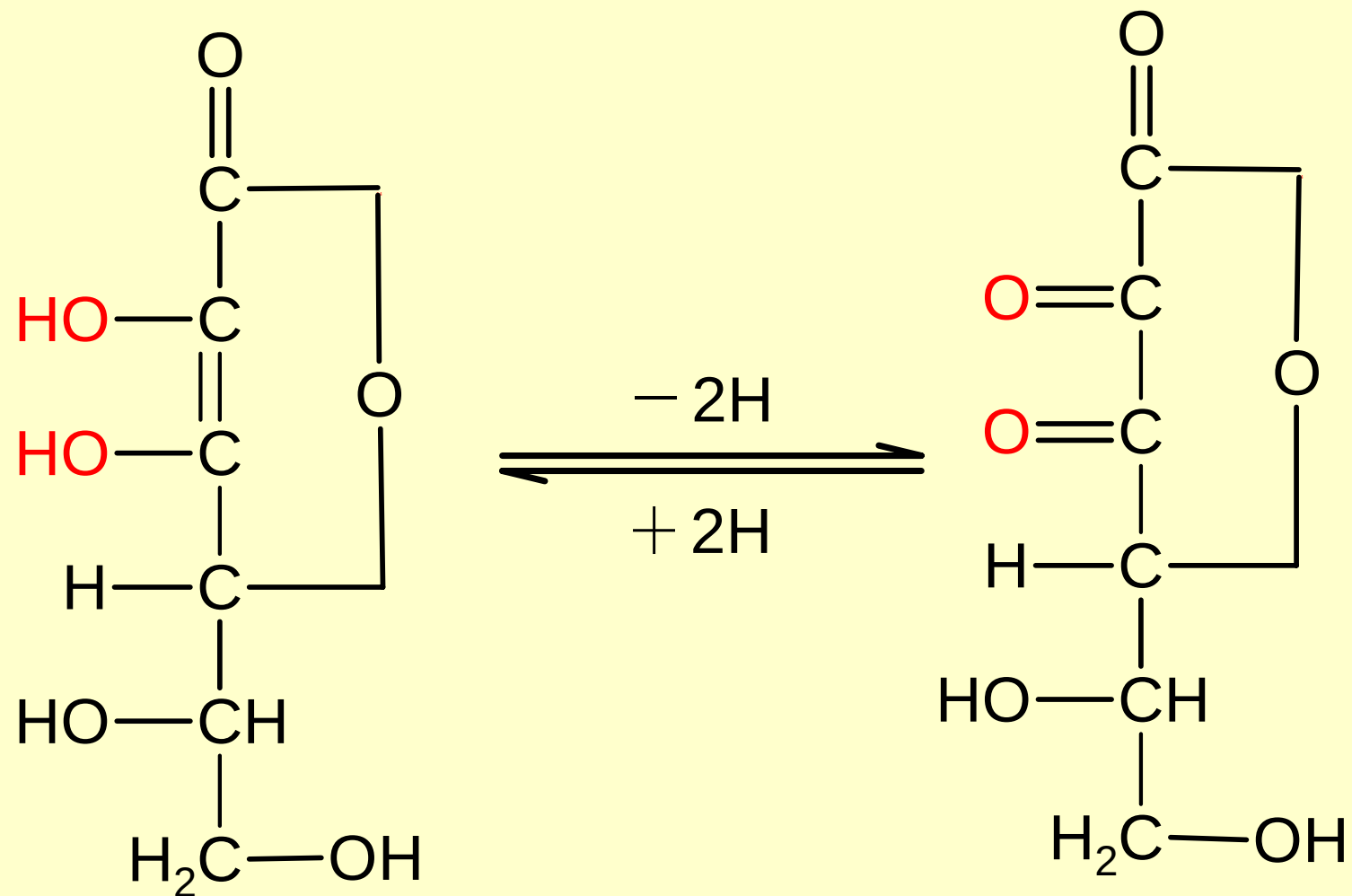
结构与性质

维生素C/ L-抗坏血酸(ascorbic acid)

多羟基，内酯；酸性；

易被氧化：中、碱性，热，光，重金属破坏





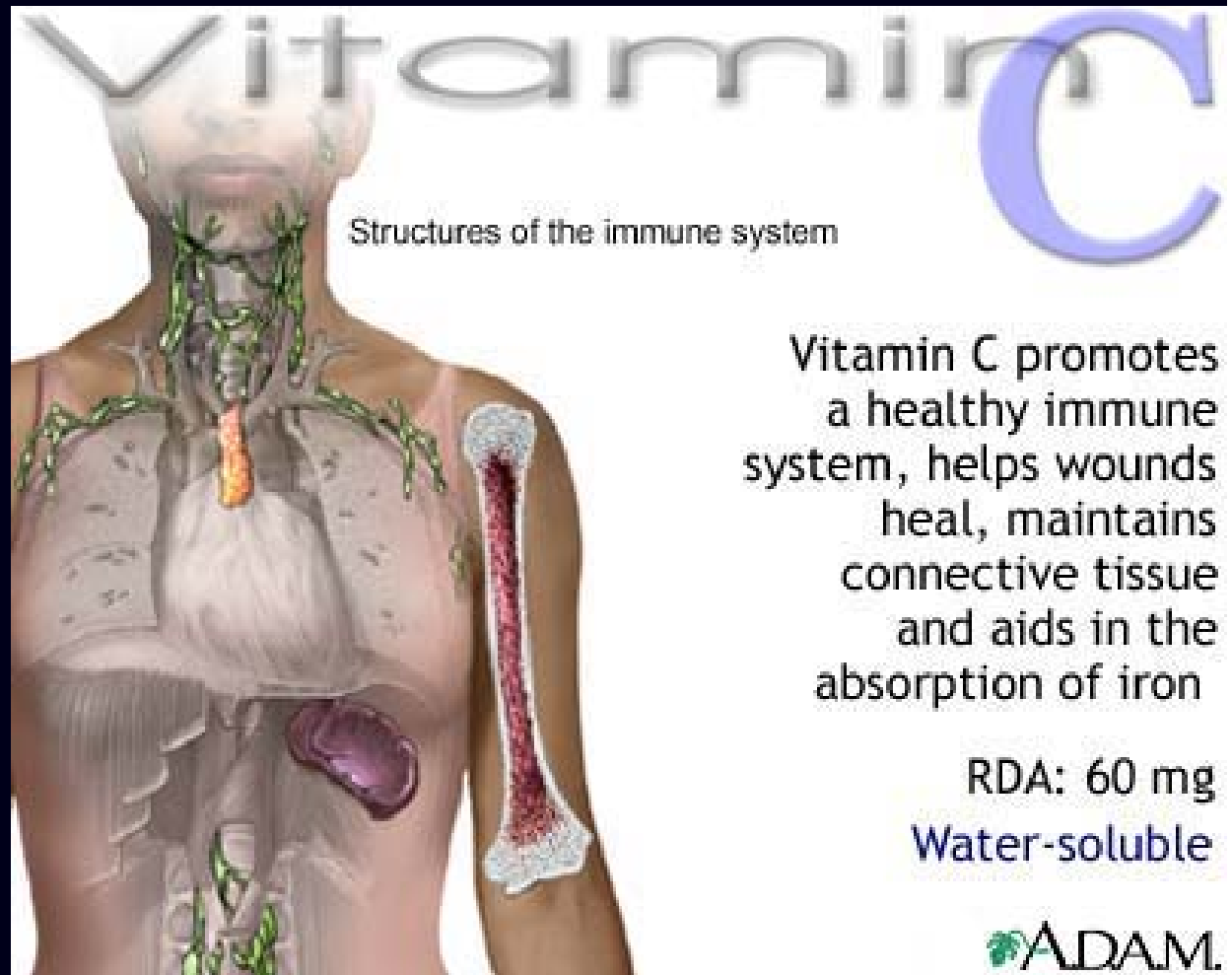
L-抗坏血酸

脱氢抗坏血酸

***若脱氢维生素C进一步氧化，则失去活性**

维生素C的功能

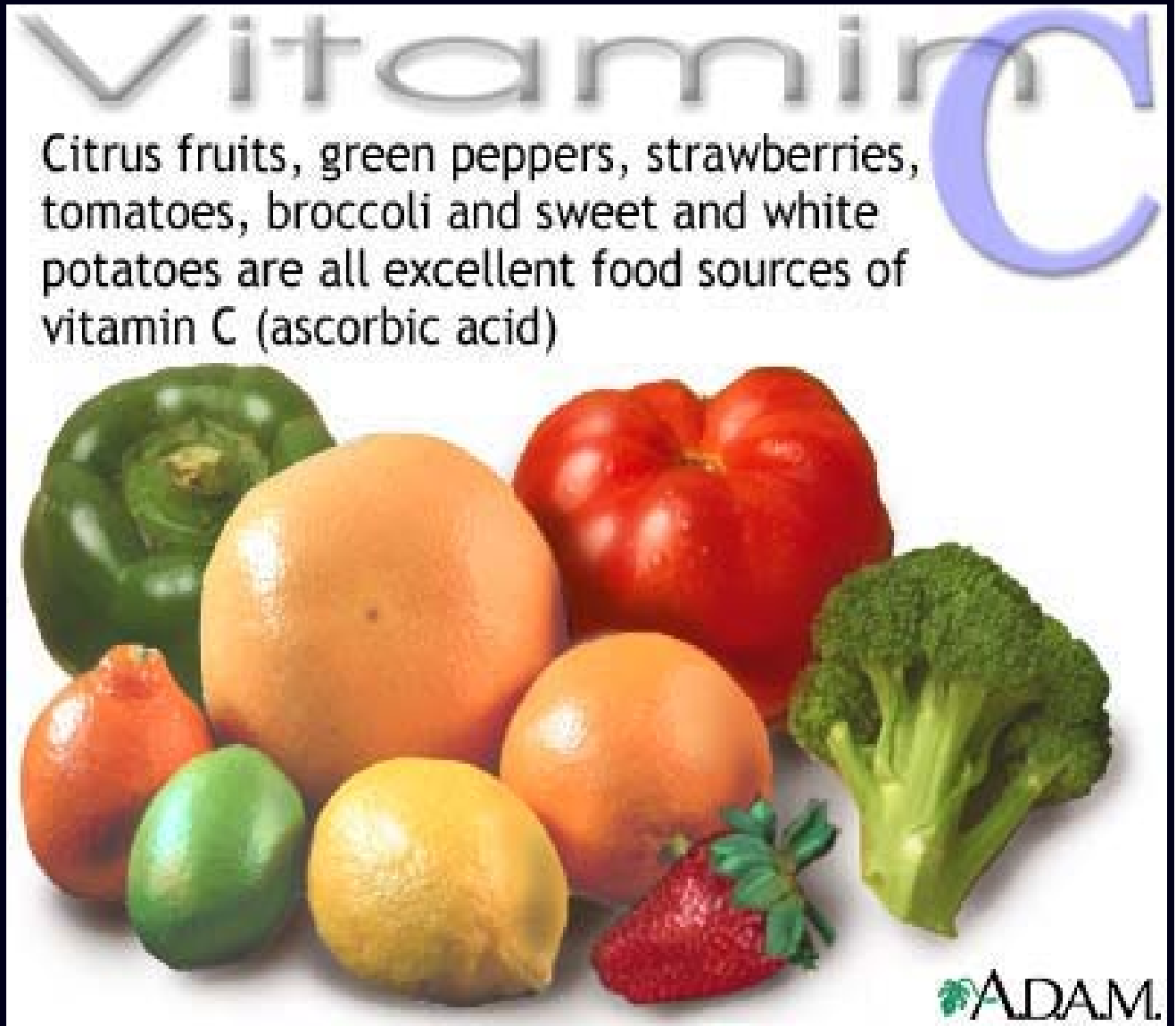
- 维生素C是重要的供氢体
- 促进胶原合成——坏血病



来源

新鲜水果及

蔬菜: 橙类、番茄、辣椒



富含维生素C量高的食物（毫克/100克食物）

酸 枣——830-1170

猕猴桃——568

枣 ——549

辣 椒——185

山 楂——89

柿子椒——89

菜 花——88

金花菜——85

苦 瓜——84

雪里红——83

豌豆苗——53

油 菜——51

橙 ——49

柚 ——41

柠 檬——40

柑 橘——34

水萝卜——34

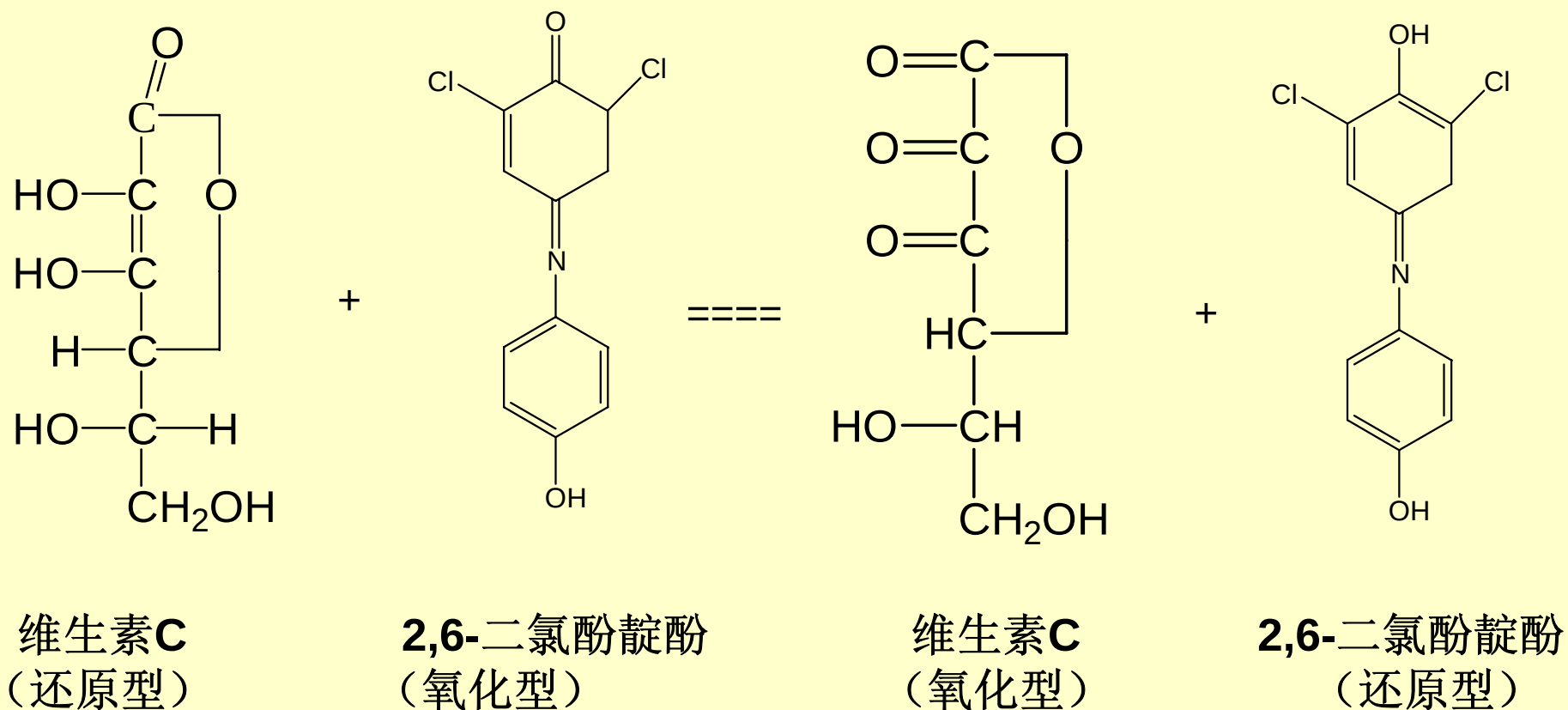
大白菜——19

西红柿——12

芥菜头——80

青 蒜——77

2,6-二氯酚靛酚 —— 氧化还原指示剂



2,6-二氯酚靛酚染料的钠盐 (2,6D) 在碱性溶液中显蓝色，在酸性溶液中呈红色，被还原后无色。

三、实验内容

样品处理:

- 2.0g猕猴桃
- 5~10ml 2%的草酸研磨成浆状
- 50ml的容量瓶定容
- 过滤

标准液滴定:

- 5ml 1% 草酸 + 5ml 0.001mol / L 维生素C (176.13)
- 2,6-D 滴定到浅红色, 30s ; 3次 (10x2,6-D)
- 计算1ml 2,6-D 相当于维生素C的mg数——T

$$\text{滴定数}(T) = \frac{CV_1}{V_2}$$

C: 抗坏血酸的浓度 (mg/ml)

V1: 抗坏血酸的量 (ml)

V2: 消耗染料溶液的量 (ml)

样品滴定:

- 50ml 锥形瓶: 滤液5ml (移液管)
- 2,6-D滴定到浅红色, 30s ; 3次

空白滴定:

- 50ml 锥形瓶: 5ml 1% 草酸
- 2,6-D滴定到浅红色, 30s ; 3次

计算结果

100g 样品含维生素C的mg数 = $B \times (A - E) \times T \times 100 / C \times D$

- **A**——滴定样品所消耗的2,6-二氯酚靛酚钠的平均毫升数；
- **E**——滴定空白所消耗的2,6-二氯酚靛酚钠的平均毫升数；
- **B**——样品提取液的总体积（50ml）；
- **C**——每次滴定所用的提取液的毫升数（5ml）；
- **D**——提取所用的样品重量（2g）；
- **T**——1ml 2,6-D相当于维生素C的mg数。

四、操作要点

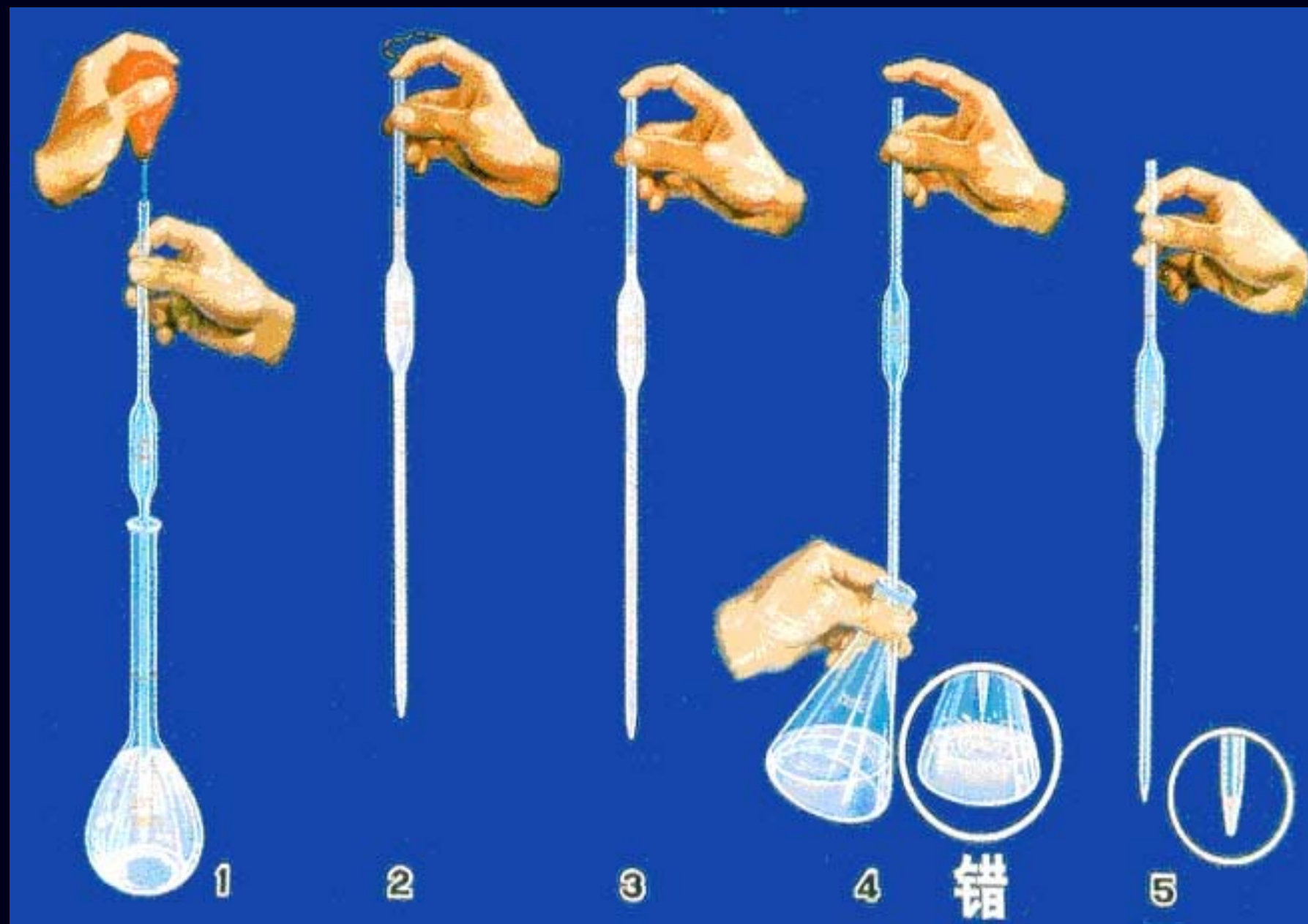
- 定容



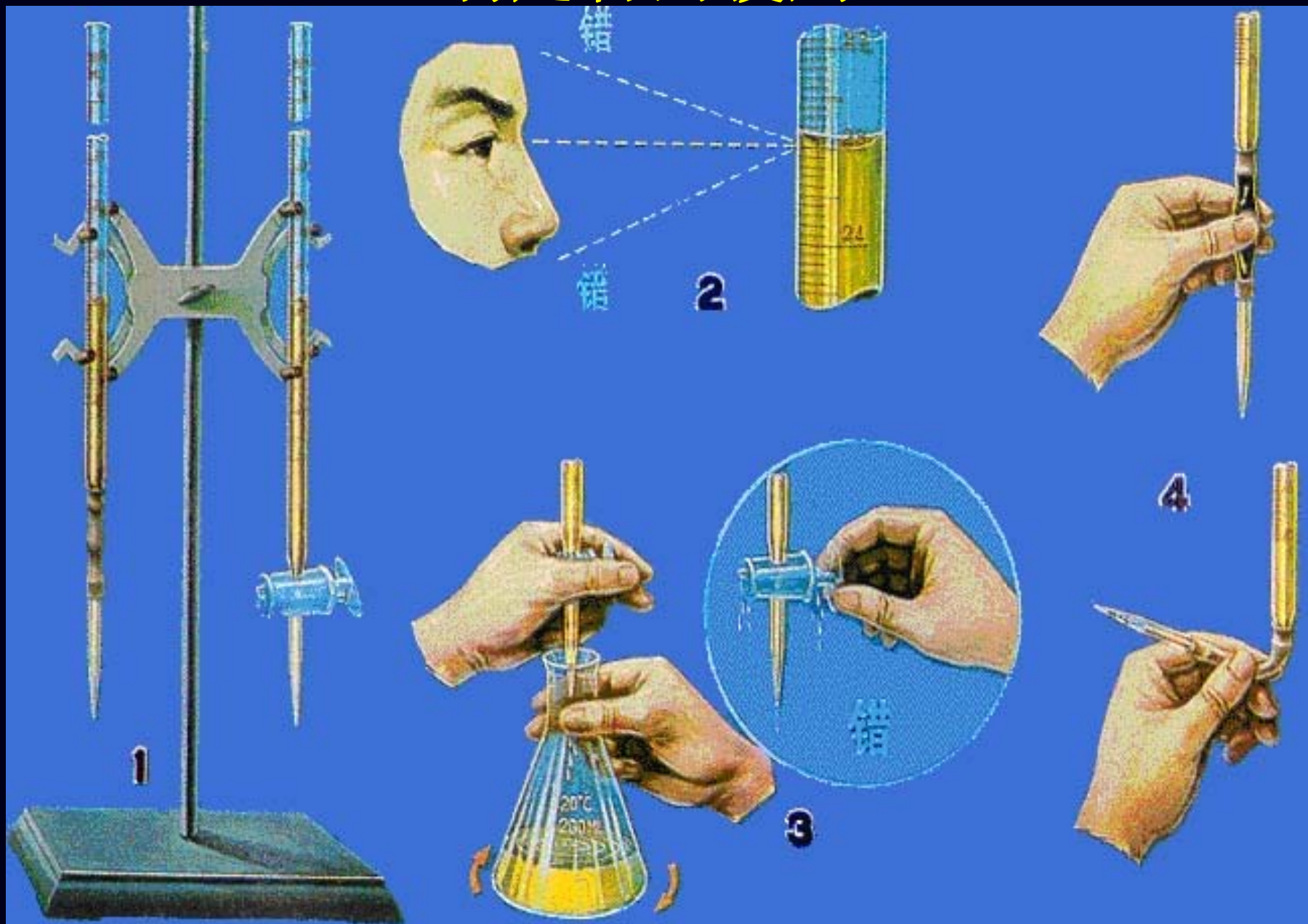
过滤



移液管使用



滴定管的使用



滴定



思考题

- 为什么维生素C标准溶液要用新鲜配制的？
- 为准确测得维生素C的含量，实验时要注意那些操作步骤？

多酚氧化酶的制备 和性质研究

一、实验目的

- 了解植物组织褐变和多酚氧化酶的关系。
- 学习多酚氧化酶的提取和活力测定方法
- 了解影响酶促反应速度的各种因素

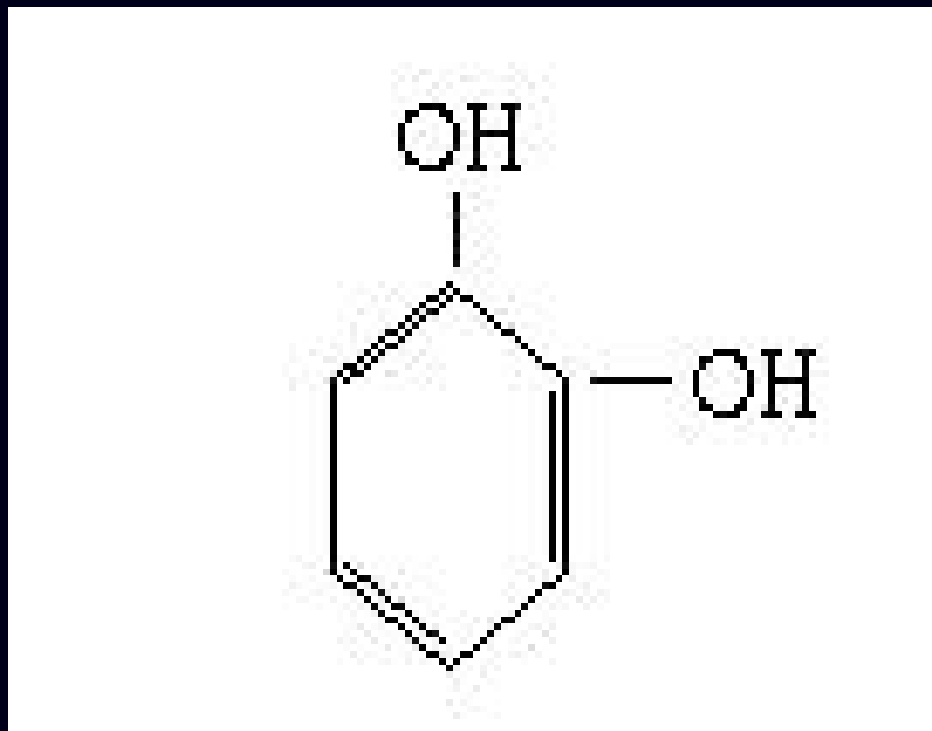
二、实验原理

酶的分离纯化:

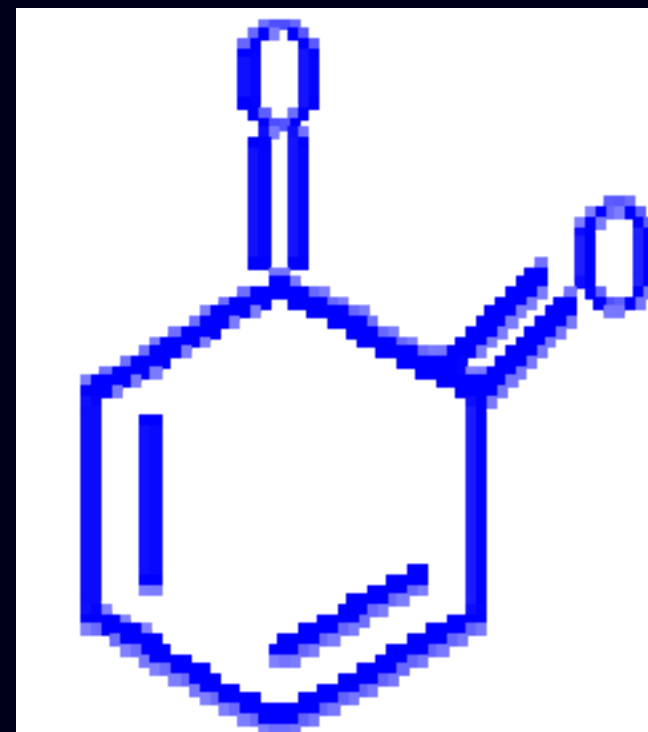
- 材料的选择（新鲜、目的蛋白含量高）
- 分离过程中避免一切可能引起变性的条件
- 蛋白质的纯化一般在低温下进行（4°C）
- 细胞破碎：机械破碎
- 分离目的蛋白：盐析法



多酚氧化酶催化的反应



邻苯二酚



邻苯醌

三、实验内容

多酚氧化酶的制备:

- 50g小块土豆 + 50ml氯化钠（600g/班）
- 捣碎机中研磨30s
- 3-5层纱布过滤（40-45ml滤液/组）
- 等体积饱和硫酸铵，4℃，30min
- 离心4℃，4000r/min，20min
- 沉淀 + 15ml柠檬酸缓冲液
- 离心4℃，4000r/min，15min
- 上清→多酚氧化酶粗制品

多酚氧化酶的性质

- 多酚氧化酶的作用：催化的反应
- 多酚氧化酶的化学性质：稳定性
- 底物专一性（邻苯二酚，对苯二酚，间苯二酚）
- 底物浓度
- 酶浓度
- 氢离子浓度（移液管）

四、操作要点

- 公用试剂的使用、玻璃器皿清洁、定量、定时



离心机及其使用

离心机是利用离心力对混合液（含有固形物）进行分离和沉淀的一种专用仪器。

- 普通（非冷冻）离心机：转速小于4000rpm，台式高速离心机最大转速可达18000rpm。
- 低速冷冻离心机：转速一般不超过4000rpm
- 高速冷冻离心机：转速可达20000rpm，收集微生物、细胞碎片、细胞、大的细胞器、硫酸沉淀物以及免疫沉淀物等。
- 超速离心机：转速可达50000rpm，能使亚细胞器分级分离，并用于蛋白质、核酸分子量的测定等。



转头



JA17 Rotor



JA 20.1 Rotor

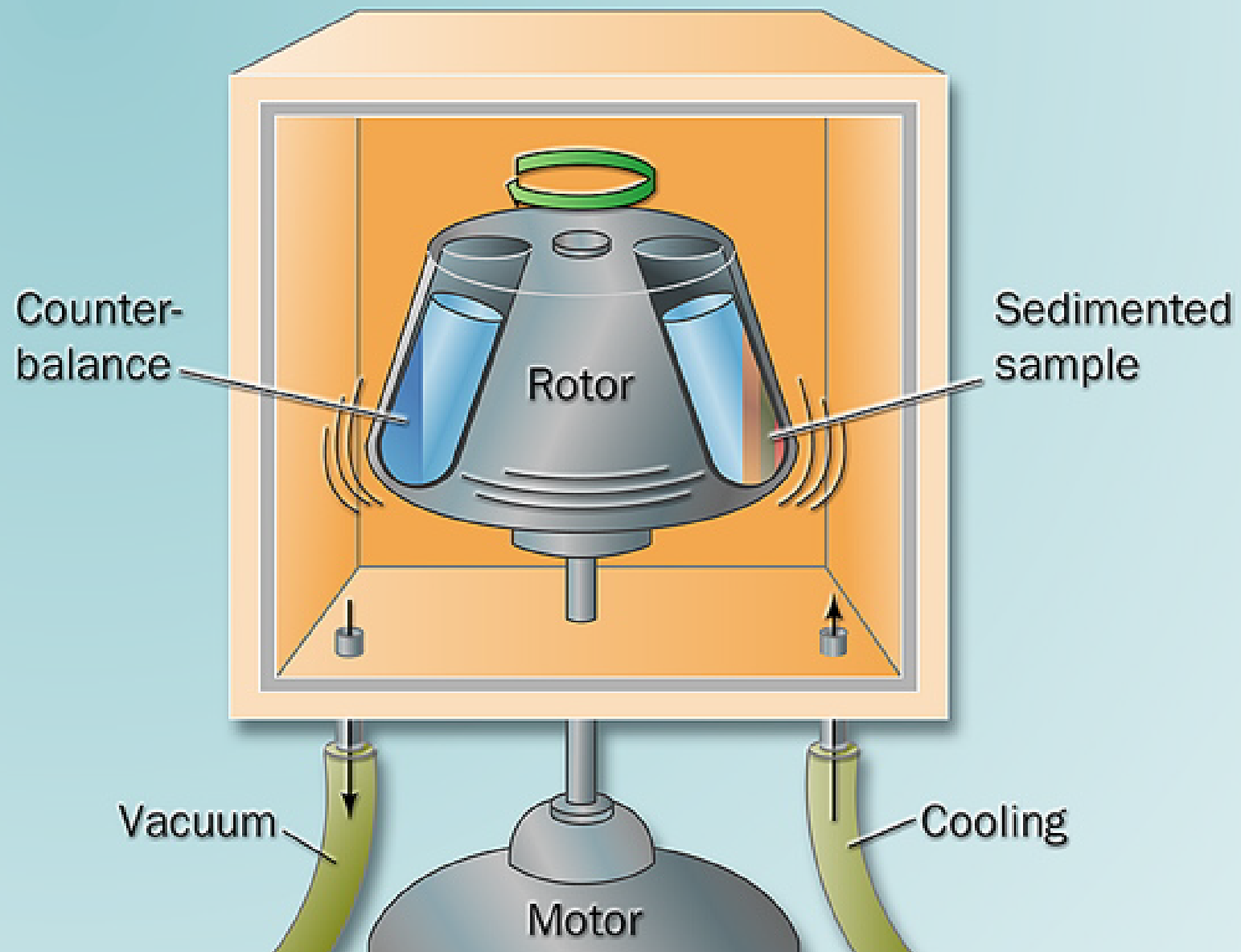


JA-18 Rotor



50 Ti Rotor

Ultracentrifuge



离心管



开启离心机控制电闸



打开离心机电源开关



选择转头



平衡离心管



离心管放入转头、拧紧转头盖



关闭离心机盖



设定离心转头速度、温度、时间，开始离心



离心结束后

- 取出离心样品管
- 取出转头，擦干、清洁转头
- 关闭离心机电源开关
- 关闭离心机控制电闸

五、思考题

- 为什么滤液为红色时应重新取材提取多酚氧化酶？
- 怎样可以使切好的土豆丝不变色？
- 怎样配制1000ml柠檬酸缓冲液（0.05mol/L, pH4.8）