

## 维生素 A 的测定方法

### 比色法

#### 1.原理

维生素 A 在三氯甲烷中与三氯化铈相互作用，产生蓝色物质，其深浅与溶液中所含维生素 A 的含量成正比。该蓝色物质虽不稳定，但在一定时间内可用分光光度计于 620nm 波长处测定其吸光度。

#### 2.仪器

实验室常用设备 分光光度计 回流冷凝装置

#### 3.试剂

本实验所用试剂皆为分析纯，所用水皆为蒸馏水

- (1) 无水硫酸钠  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- (2) 乙酸酐
- (3) 乙醚 不含有过氧化物
- (4) 无水乙醇 不含有醛类物质
- (5) 三氯甲烷 应不含分解物，否则会破坏维生素 A

检查方法：三氯甲烷不稳定，放置后易受空气中氧的作用生成氯化氢和光气。检查时可取少量三氯甲烷置试管中加水振摇，使氯化氢溶到水层。加入几滴硝酸银溶液，如有白色沉淀即说明三氯甲烷中有分解产物。

(1) 25%三氯化铈-三氯甲烷溶液 用三氯甲烷配制 25%三氯化铈溶液，储于棕色瓶中（注意避免吸收水分）

(6) 50%氢氧化钾溶液（KOH） W/V

(7) 维生素 A 标准液 视黄醇（纯度 85% Sigma）用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品，使其浓度大约为 1ml 相当于 1mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

(8) 酚酞指示剂 用 95%乙醇配制 1%溶液

#### 4. 操作步骤

维生素 A 极易被光破坏，实验操作应在微弱光线下进行。

4.1 样品处理：根据样品性质，可采用皂化法或研磨法。

##### (1)皂化法：

皂化：根据样品中维生素 A 含量的不同，称取 0.5g~5g 样品于三角瓶中，加入 20~40ml 无水乙醇及 10ml 1:1 氢氧化钾，于电热板上回流 30min 至皂化完全为止。（皂化法适用于维生素 A 含量不高的样品，可减少脂溶性物质的干扰，但全部实验过程费时，且易导致维生素 A 损失）

提取：将皂化瓶内混合物移至分液漏斗中，以 30ml 水洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗。如有渣子，可用脱脂棉漏斗滤入分液漏斗内。用 50ml 乙醚分二次洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗中。振摇并注意放气，静置分层后，水层放入第二个分液漏斗内。皂化瓶再用约 30ml 乙醚分二次冲洗，洗液倾入第二个分液漏斗中。振摇后，静置分层，水层放入三角瓶中，醚层与第一个分液漏斗合并。重复至水液中无维生素 A 为止。

洗涤：用约 30ml 水加入第一个分液漏斗中，轻轻振摇，静置片刻后，放去水层。加 15~20ml 0.5mol/L 氢氧化钾液于分液漏斗中，轻轻振摇后，弃去下层碱液，除去醚溶性酸皂。继续用水洗涤，每次用水约 30ml，直至洗涤液与酚酞指示剂呈无色为止（大约洗涤 3 次）。醚层液静置 10~20min，小心放出析出的水。

浓缩：将醚层液经过无水硫酸钠滤入三角瓶中，再用约 25ml 乙醚冲洗分液漏斗和硫酸钠两次，洗液并入三角瓶内。置水浴上蒸馏，回收乙醚。待瓶中剩约 5ml 乙醚时取下，用减压抽气法至干，立即加入一定量的三氯甲烷使溶液中维生素 A 含量在适宜浓度范围内。

# 上海洪纪仪器设备有限公司

---

## (2) 研磨法:

研磨: 精确称 2~5g 样品, 放入盛有 3~5 倍样品重量的无水硫酸钠研钵中, 研磨至样品中水分完全被吸收, 并均质化。(研磨法适用于每克样品维生素 A 含量大于 5~10 $\mu$ g 样品的测定, 如肝样品的分析。步骤简单, 省时, 结果准确)

提取: 小心地将全部均质化样品移入带盖的三角瓶内, 准确加入 50~100ml 乙醚。紧压盖子, 用力振摇 2min, 使样品中维生素 A 溶于乙醚中。使其自行澄清(大约需 1~2h), 或离心澄清(因乙醚易挥发, 气温高时应在冷水浴中操作。装乙醚的试剂瓶也应事先置于冷水浴中)。

浓缩: 取澄清提取乙醚液 2~5ml, 放入比色管中, 在 70~80 $^{\circ}$ C 水浴上抽气蒸干。立即加入 1ml 三氯甲烷溶解残渣。

4.2 标准曲线的制备: 准确取一定量的维生素 A 标准液于 4~5 个容量瓶中, 以三氯甲烷配制标准系列。再取相同数量比色管顺次取 1ml 三氯甲烷和标准系列使用液 1ml, 各管加入乙酸酐 1 滴, 制成标准比色列。于 620nm 波长处, 以三氯甲烷调节吸光度至零点, 将其标准比色列按顺序移入光路前, 迅速加入 9ml 三氯化铈-三氯甲烷溶液。于 6 秒内测定吸光度, 将吸光度为纵坐标, 以维生素 A 含量为横坐标绘制标准曲线图。

4.3 样品测定: 于一比色管中加入 10ml 三氯甲烷, 加入一滴乙酸酐为空白液。另一比色管中加入 1ml 三氯甲烷, 其余比色管中分别加入 1ml 样品溶液及 1 滴乙酸酐。其余步骤同标准曲线的制备。

## 6. 计算

$$X = C/m \times V \times 100/1000;$$

式中

X: 样品中含维生素 A 的量, mg/100g (如按国际单位, 每 1 国际单位= 0.3 $\mu$ g 维生素 A);

C: 由标准曲线上查得样品中含维生素 A 的含量,  $\mu$ g/ml;

m: 样品质量, g;

V: 提取后加三氯甲烷定量之体积, ml;

100: 以每百克样品计。。