

中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
作品說明書

高職組 化工、衛工及環工科

第一名

091101

玫瑰紅中的玄機－維生素C定量方法之改良

學校名稱：國立民雄高級農工職業學校

作者：	指導老師：
職一 鄭少屏	王俊雄
職一 張哲維	呂嬌杏
職一 李家祥	
職一 張雅涵	

關鍵詞：維生素C 離心 分光光度計

壹、摘要

我們發現實驗課本所採用的維生素 C 定量方法有兩個缺點：(1)樣品「過濾」的時間長，(2)澄清度低，滴定終點不易明確判斷。本研究發現改用「離心」的前處理方法，可有效改善過濾法的缺點，而且經離心法處理的樣品，其維生素 C 含量最接近原汁。本研究也發現，將滴定用的靛酚溶液加過量，所呈現的玫瑰紅色，會因樣品中維生素 C 含量不同，而有色澤深淺的變化，若改用分光光度計測定樣品的吸光度，將吸光度的值代入維生素 C 的檢量線方程式中，就可計算出維生素 C 的含量。最後，分別將各種果汁樣品，添加已知量的維生素 C 在其中，結果發現「分光光度計法」的精準性並不比「靛酚滴定法」差，所以「分光光度計法」是一種快速且精準度佳的改良方法。

貳、研究動機

我們在實驗課本中學到使用「靛酚滴定法」測定維生素 C 的含量，但是實際操作時，我們卻面臨兩個問題：

- 一、在「靛酚滴定法」中，果汁的前處理方法是利用「過濾」法，當我們使用 1 號濾紙進行抽氣過濾時，結果所耗費的時間很長。
- 二、樣品若是透明無色的維生素 C，滴定終點較易明確判斷；樣品若是果汁，因為濁度與色澤的干擾，則滴定終點較難明確判斷。

我們在實驗時也發現，當滴定終點過後，靛酚的滴定量若持續增加，其玫瑰紅色會逐漸加深，我們感到很好奇，是否可應用此種現象，去測出樣品中的維生素 C 含量。

參、研究目的

1. 課本的「靛酚滴定法」，果汁的前處理是採用「過濾」法，但是我們發現過濾所耗費的時間太長了。希望透過本研究，探討「離心」法是否為更好的方法。
2. 由於果汁本身有顏色，採用「靛酚滴定法」滴定終點的玫瑰紅色並不易明確判別。希望透過本研究，探討「分光光度計法」是否為更好的方法。
3. 實際測試果汁樣品，比較「靛酚滴定法」與「分光光度計法」的精準性。

肆、研究設備與材料

一、研究設備

1. 手工榨汁器。
2. 濾布。
3. 抽氣過濾裝置。
4. 離心機 (HSIANGTAI C-10000, Taiwan)。
5. 滴定裝置。
6. 分光光度計 (UNICO UV-2100, USA)。
7. 筆記型電腦 (ASUS)。
8. Word 2003 軟體。
9. Excel 2003 軟體。
10. SigmaPlot 10 軟體 (30天試用版)。
11. Photoshop Elements 2.0軟體 (數位相機附贈)。

二、材料

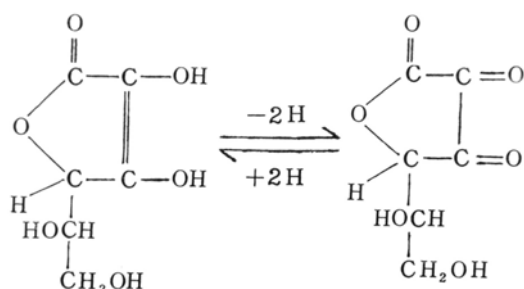
1. 柳丁 (臺灣生產)。
2. 百香果汁 (鋁箔包, 黑松食品公司)。
3. 蘋果汁 (鋁箔包, 黑松食品公司)。
4. 紅芭樂汁 (紙盒, 愛之味食品公司)。
5. 維生素C (L- Ascorbic Acid, Guaranteed Reagent) (關東化學株式會社, 日本)。
6. 濾紙 (1號, 90mm, ADVANTEC, JAPAN; 42號, 90mm, Whatman, England)。
7. 偏磷酸-醋酸溶液: 15g偏磷酸+40ml冰醋酸, 加水至500ml。⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾
8. 維生素C標準溶液(A): 50mg維生素C, 加偏磷酸-醋酸溶液稀釋至50ml。⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾
(維生素C含量: 1mg/ml)。
9. 維生素C標準溶液(B): 取維生素C標準液(A)25ml, 加水稀釋至250ml。
(維生素C含量: 0.1mg/ml)。
10. 靛酚標準溶液: 42mg NaHCO₃+50mg 2, 6-二氯靛酚, 加水至200ml。⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾

伍、研究過程與方法

一、文獻探討

(一) 維生素 C ⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽⁸⁾

維生素 C (vitamin C) 又稱為抗壞血酸 (ascorbic acid)，是一種水溶性維生素，易溶於水而呈酸性，具有還原性，在生化上是優良的還原劑。會造成維生素 C 被氧化或分解的因素很多，包括氧化劑、光線、氧氣、溫度、pH 值、酵素、金屬離子…等，維生素 C 的結構式如下所示⁽⁶⁾。



(二) 維生素 C 的定量方法 ⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾

維生素 C 的定量方法很多，但都不太理想，因為在食品中含有太多的干擾因子，在這些方法中，常使用的方法是利用 2,6-二氯靛酚 (2,6-dichlorophenolindophenol) 來滴定維生素 C ⁽⁶⁾，我們的實驗課本就是採用此方法⁽⁵⁾，在食品工業上，果汁的品管檢驗也常用此法⁽⁷⁾，我們參考許多相關資料後發現，此方法是 AOAC 的定量方法⁽¹⁾。

(三) 比色法 ⁽²⁾

比色法是指對有色溶液之吸光能力，進行定量測定的一種分析方法。比色法通常是測定溶液的透光度 (Transmittance, 簡稱: T) 或吸光度 (Absorbance, 簡稱: A) 做為定量分析的依據。

$$\text{透光度: } T = \frac{I}{I_0}$$

$$\text{吸光度: } A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

I_0 : 入射光的強度

I : 透射光的強度

(四) 分光光度計 ⁽²⁾⁽³⁾

分光光度計是一種可設定光的波長，用來測量透過吸收介質之光的相對量，是一種常用於定量分析的儀器。分光光度計主要包括光源、分光器、試料槽、檢示器、指示器等五部分。

二、研究架構

【研究一】果汁前處理方法之改良

- | | |
|----------------------|---------------------------------|
| (一)各種前處理方法耗費時間之比較 | 目的：現有的過濾法耗費時間太長，希望找出較為省時的前處理方法。 |
| (二)各種前處理方法對果汁色澤之影響 | 目的：用1號濾紙過濾的濾液不夠澄清，希望找出更澄清的處理方法。 |
| (三)各種前處理方法對維生素C定量之影響 | 目的：探討何種前處理方法，較適合維生素C的定量。 |

【研究二】維生素C定量方法之改良

- | | |
|------------------------|---------------------------------|
| (一)維生素C+過量鞣酚對色澤之影響 | 目的：觀察在不同含量的維生素C中，加過量鞣酚所呈現的色澤變化。 |
| (二)維生素C+過量鞣酚最大吸光度波長之探討 | 目的：探討維生素C加過量鞣酚，其最大吸光度的波長。 |
| (三)維生素C+過量鞣酚色澤穩定性之探討 | 目的：探討維生素C加過量鞣酚，其色澤的穩定性。 |
| (四)利用分光光度計定量維生素C可行性之探討 | 目的：探討加過量鞣酚，維生素C含量與吸光度是否會出現線性關係。 |
| (五)利用分光光度計法測定果汁中的維生素C | 目的：利用分光光度計法，實際測定果汁中的維生素C。 |

【研究三】「鞣酚滴定法」與「分光光度計法」之實際測試

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| (一)「柳丁汁」中維生素C含量之測定 | 目的：添加已知量維生素C測試鞣酚滴定法與分光光度計法的精準性。 |
| (二)「百香果汁」中維生素C含量之測定 | 目的：添加已知量維生素C測試鞣酚滴定法與分光光度計法的精準性。 |
| (三)「蘋果汁」中維生素C含量之測定 | 目的：添加已知量維生素C測試鞣酚滴定法與分光光度計法的精準性。 |
| (四)「紅芭樂汁」中維生素C含量之測定 | 目的：添加已知量維生素C測試鞣酚滴定法與分光光度計法的精準性。 |

三、研究方法

【研究一】果汁前處理方法之改良

(一)各種前處理方法耗費時間之比較

步驟：

※ 步驟 2~5 的樣品皆處理 100ml。

1. 原汁：將柳丁對切，使用手工榨汁器進行榨汁，果汁經濾布去除纖維殘渣，如下圖所示。（步驟 2~5 採用的原料，都來自步驟 1，所以原汁處理時間不採計。）



2. 過濾：使用 1 號濾紙，將原汁進行抽氣過濾，將水龍頭轉至固定位置，把流出的水收集一分鐘，再用量筒量取水的體積，計算出每分鐘水流量，如下圖所示。（原汁倒入過濾裝置開始計時，收集到濾液 100ml 停止計時。）



3. 離心：將原汁置入離心機中進行離心，離心條件：6000rpm，10 分鐘，如下圖所示。（原汁裝入離心管開始計時，收集離心澄清液 100ml 停止計時。）



4. 過濾+離心：先過濾，後離心。

（原汁倒入過濾裝置開始計時，收集離心澄清液 100ml 停止計時。）

5. 離心+過濾：先離心，後過濾。

（原汁裝入離心管開始計時，收集到濾液 100ml 停止計時。）

結果：

1. 抽氣過濾的水流量：4070ml/min。
2. 如表 1、圖 1 所示，「離心」所耗費的時間最短。

表 1. 各種前處理方法耗費時間之比較

前處理方法	耗費時間(秒)			
	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
過濾	1689	1537	1506	1544 ±98
離心	1117	1105	1093	1105 ±12
過濾+離心	2761	2730	2722	2738 ±21
離心+過濾	1320	1328	1297	1315 ±16

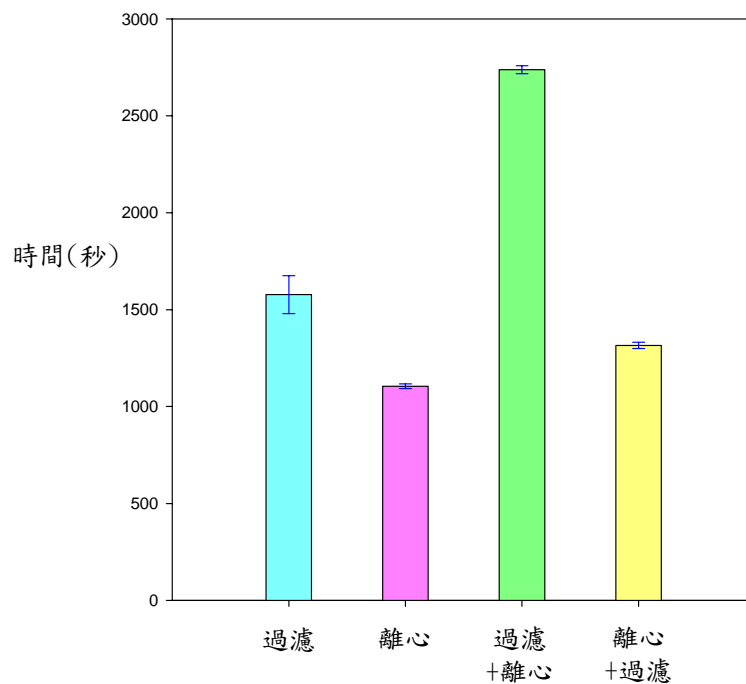


圖 1. 各種前處理方法耗費時間之比較

討論：

1. 大約過濾 1~2 分鐘後，因濾紙上的濾孔逐漸阻塞，過濾速率明顯變慢，若不更換新的濾紙，過濾速率會變得更慢，再持續過濾會導致濾紙產生破洞，如下圖所示，此時濾液會受到污染，又得重新過濾，那就更加費時了。



2. 抽氣過濾時，水流也不可太大，若水流量大於 4070ml/min，濾紙也很容易產生破洞。
3. 「離心+過濾」比「過濾+離心」耗費時間短，應該是因為原汁先離心後，原汁中的懸濁物質已經去除了，所以再進行過濾時，濾孔較無阻塞現象，因此，過濾速率會變得較快。
4. 「離心」所耗費的時間最短，而且我們使用的離心機，一次最多可處理 400ml 的樣品，不僅省時，而且處理量又大，所以「離心」是一個不錯的果汁前處理方法。

(二)各種前處理方法對果汁色澤之影響

步驟：取實驗(一)各種前處理方法的果汁各 10ml，分別裝入試管中，觀察比較其色澤變化。

結果：

1. 如圖 2 所示，經由「過濾」處理的樣品，其色澤較原汁淡了一些，但柳丁汁的黃色還相當明顯，混濁度也很高。
2. 如圖 2 所示，經由「離心」、「過濾+離心」、「離心+過濾」處理的三種樣品，其色澤差異很微小，都只殘留極微量的黃色，澄清度很高。

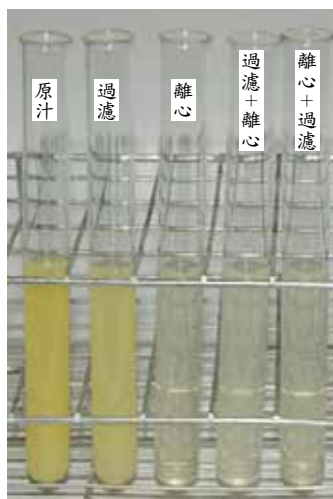


圖 2. 各種前處理方法對果汁色澤之影響

討論：

1. 本實驗採用 1 號濾紙進行抽氣過濾，可能是濾紙的孔徑較大，所以「過濾」的樣品，其澄清度不佳。
2. 我們在預備實驗中，曾經嘗試改用孔徑更小的 42 號濾紙，雖然濾液較澄清透明，如下圖所示，可是所耗費的時間，大約是 1 號濾紙的 5~6 倍，因此在本研究中，42 號濾紙就不再列入考慮。



3. 經過「離心」、「過濾+離心」、「離心+過濾」處理的三種樣品，其澄清度都很高，色澤十分相近，這表示「離心」才是關鍵步驟，果汁只要經過「離心」處理，就可以得到澄清度高的樣品，而且處理時間最短，所以「離心」是一種事半功倍的前處理方法。

(三)各種前處理方法對維生素C定量(靛酚滴定法)之影響

步驟：

1. 參考實驗課本中維生素 C 的定量方法，取 2ml 維生素 C 標準溶液(A) (維生素 C：1mg /ml)，使用靛酚標準溶液滴定至呈現玫瑰紅色，持續 30 秒不褪色，如右圖所示，利用靛酚的滴定量，計算出每 1ml 的靛酚相當於多少 mg 的維生素 C。
2. 取各種前處理方法的果汁樣品 10ml + 5ml 偏磷酸-醋酸溶液；另取蒸餾水 10ml + 5ml 偏磷酸-醋酸溶液進行空白試驗，使用靛酚標準溶液滴定至呈現玫瑰紅色，持續 30 秒不褪色。利用靛酚的滴定量，計算出每 100ml 的樣品，含有多少 mg 的維生素 C。計算方法如下：



$$\text{維生素 C (mg/100ml)} = \frac{(a - b) \times D \times K \times 100}{S}$$

a：靛酚滴定量(ml)

b：空白試驗靛酚滴定量(ml)

D：樣品溶液稀釋倍數

K：1ml 的靛酚相當於維生素 C 的 mg 數

S：樣品溶液的 ml 數

結果：

1. 滴定 2ml 維生素 C，滴定了 16.9ml 靛酚，所以 1ml 靛酚 \div 0.1183mg 維生素 C。
2. 如表 2 所示，靛酚滴定量：原汁 > 離心 > 離心+過濾 > 過濾 > 過濾+離心。
3. 如表 3、圖 3 所示，維生素 C 含量：原汁 > 離心 > 離心+過濾 > 過濾 > 過濾+離心。

表 2. 各種前處理方法對鞣酚滴定量之影響

前處理方法	鞣酚滴定量(ml)			
	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
原汁	22.5	22.3	22.6	22.5 ±0.153
過濾	19.9	19.6	20.1	19.9 ±0.252
離心	22.1	22.2	22.0	22.1 ±0.100
過濾+離心	19.5	19.4	19.7	19.5 ±0.153
離心+過濾	21.9	22.0	22.0	22.0 ±0.058

表 3. 各種前處理方法對維生素 C 含量之影響

前處理方法	維生素 C (mg/100ml)			
	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
原汁	26.618	26.381	26.736	26.578 ±0.181
過濾	23.542	23.187	23.778	23.502 ±0.298
離心	26.144	26.263	26.026	26.144 ±0.118
過濾+離心	23.069	22.950	23.305	23.108 ±0.181
離心+過濾	25.908	26.026	26.026	25.987 ±0.068

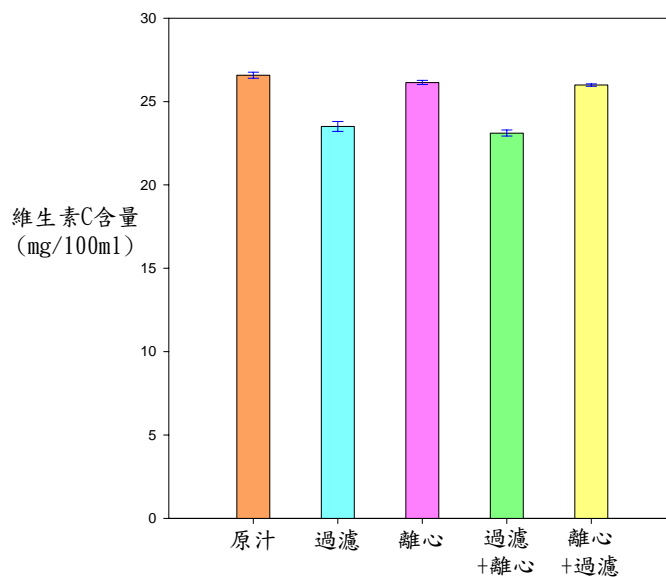


圖 3. 各種前處理方法對維生素 C 含量之影響

討論：

1. 「原汁」的鞣酚滴定量最多，表示處理過程越簡單，對於維生素 C 的損耗越少。
2. 「離心」對維生素 C 損耗，明顯低於「過濾」，表示「離心」是較好的前處理方法。
3. 「離心+過濾」對維生素 C 損耗，明顯低於「過濾+離心」，可能是因先經過離心後，樣品的雜質較少，濾紙比較沒有阻塞的情形，過濾速率較快，維生素 C 被氧化的機率降低所致。
4. 我們推測，抽氣過濾可能造成維生素 C 被氧化的機率升高，而且濾紙也可能殘留維生素 C，至於真像如何，則有待日後再進一步探討。

【研究二】以「分光光度計法」取代「靛酚滴定法」

(一) 維生素C + 過量靛酚對色澤之影響

步驟：

1. 依下表的比例配製各樣品溶液。

※ 單位：ml

靛酚 標準溶液(ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
維生素C 標準溶液(B)(ml)	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
偏磷酸-醋酸 溶液(ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

2. 觀察比較各樣品溶液的色澤變化。

結果：

如圖 4 所示，樣品溶液呈現玫瑰紅的色澤，維生素 C 含量愈少，則玫瑰紅的色澤愈深。



圖 4. 維生素 C + 過量靛酚對色澤之影響

討論：

1. 剛開始我們採用維生素 C 標準溶液(A) (課本中的配法，維生素 C 含量：1 mg/ml)，但是發現維生素 C 標準溶液(A)濃度太高，靛酚使用量太大了。
2. 將維生素 C 標準溶液(A)稀釋 10 倍後，得到維生素 C 標準溶液(B) (維生素 C 含量：0.1 mg/ml)，此時，靛酚用量僅需 10ml。
3. 由於樣品溶液色澤變化呈現很好的規律性，因此，應用此規律性在維生素 C 定量的可行性很高。

(二)維生素C+過量鞣酚最大吸光度波長之探討

步驟：

1. 維生素 C 標準溶液(B)5ml + 1ml 偏磷酸-醋酸溶液 + 9ml 蒸餾水 + 10ml 鞣酚，在燒杯中混合均勻，取適量的樣品注入試料槽中，以分光光度計檢測（如右圖），波長依序設定為 400、450、500、550、600、650、700、750nm，反應 1 分鐘時，讀取吸光度。
2. 參考「步驟 1」的實驗結果，選取最大的波長範圍(100nm)，再以 10nm 為一間隔，更精確找出最大吸光度的波長。



結果：

1. 由表 4、圖 5 顯示，粗略的最大吸光度波長是 500nm。
2. 由表 5、圖 6 顯示，較精密的最大吸光度波長是 510nm。

表 4. 波長與吸光度之關係表 (400~750nm)

波長	吸光度			平均值
	實驗一	實驗二	實驗三	
400	0.401	0.400	0.399	0.400 ±0.001
450	0.729	0.728	0.729	0.729 ±0.001
500	1.308	1.304	1.298	1.303 ±0.005
550	1.068	1.066	1.067	1.067 ±0.001
600	0.422	0.423	0.422	0.422 ±0.001
650	0.156	0.157	0.157	0.157 ±0.001
700	0.114	0.113	0.114	0.114 ±0.001
750	0.106	0.106	0.105	0.106 ±0.001

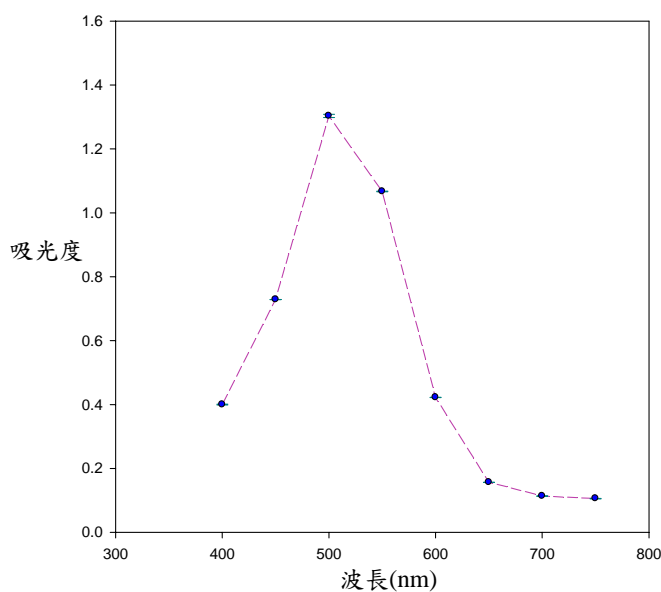


圖 5. 波長與吸光度之關係圖 (400~750nm)

表 5. 波長與吸光度之關係表 (450~550nm)

波長	吸光度			
	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
450	0.729	0.728	0.729	0.729 ±0.001
460	0.865	0.862	0.856	0.861 ±0.005
470	0.972	0.968	0.964	0.968 ±0.004
480	1.110	1.102	1.099	1.104 ±0.006
490	1.215	1.211	1.204	1.210 ±0.006
500	1.308	1.304	1.298	1.303 ±0.005
510	1.362	1.360	1.356	1.359 ±0.003
520	1.327	1.325	1.323	1.325 ±0.002
530	1.287	1.291	1.284	1.287 ±0.004
540	1.210	1.208	1.206	1.208 ±0.002
550	1.068	1.066	1.067	1.067 ±0.001

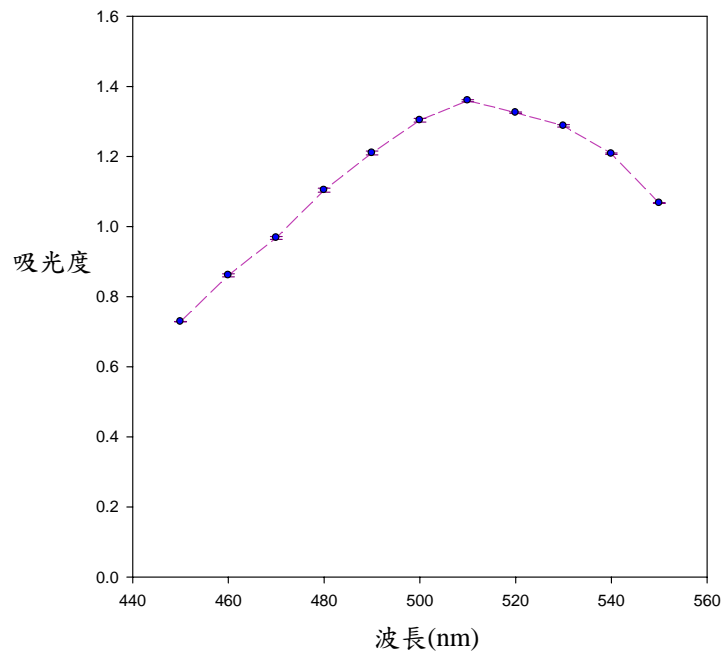


圖 6. 波長與吸光度之關係圖 (450~550nm)

討論：

1. 由於測出的最大吸光度波長是 510nm，所以本研究的實驗，波長皆設定為 510nm。
2. 在分區科展時，評審委員曾建議我們做一 200nm 到 900nm 的全波段吸收光譜掃描(scan)，以確定最佳的吸收波長。我們學校的分光光度計並沒有掃描功能，後來我們借到具有掃描功能的分光光度計(HITACHI, U-1800) (如右圖)。但因樣品的玫瑰紅色會逐漸褪色，且掃描的速度很慢(大約 10nm/min)，造成掃描時間太長，樣品褪色非常明顯，所以仍維持原方法。



3. 使用 Photoshop Elements 2.0 軟體，將圖 4 處理成負片效果，如圖 7 所示，玫瑰紅色的互補色近似綠色，而綠色光的波長大約在 510nm 處，這表示實驗結果相當正確。

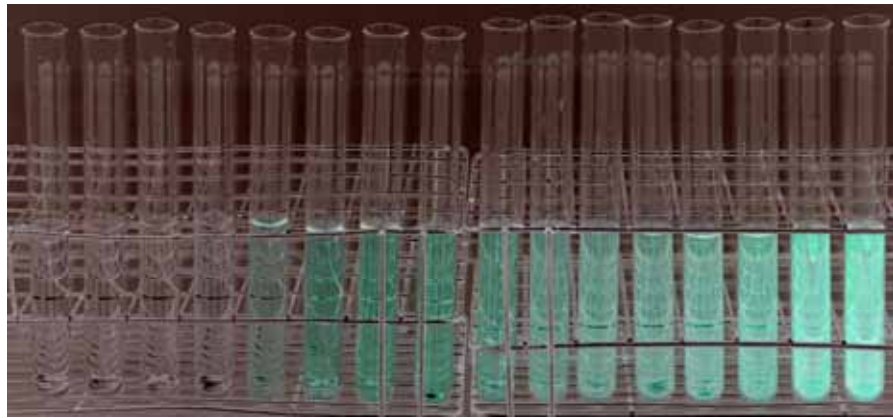


圖 7. 將圖 4 處理成負片效果的色澤

(三) 維生素 C + 過量靛酚色澤穩定性之探討

步驟：

1. 維生素 C 標準溶液(B)5ml + 1ml 偏磷酸-醋酸溶液 + 9ml 蒸餾水 + 10ml 靛酚溶液，在燒杯中混合均勻。
2. 取適量的樣品注入試料槽中，以分光光度計檢測，波長設定為 510nm，反應 1 分鐘時，讀取第一次吸光度，之後每隔 30 秒讀取一次吸光度。

結果：

由表 6 和圖 8 顯示，吸光度會隨時間的增加而緩慢地降低。

表 6. 吸光度與反應時間的關係

時間(秒)	吸光度			平均值
	實驗一	實驗二	實驗三	
60	1.356	1.362	1.358	1.359 ±0.003
90	1.353	1.356	1.354	1.354 ±0.002
120	1.349	1.354	1.347	1.350 ±0.004
150	1.346	1.349	1.345	1.347 ±0.002
180	1.344	1.345	1.337	1.342 ±0.004
210	1.339	1.340	1.335	1.338 ±0.003
240	1.332	1.334	1.331	1.332 ±0.002
270	1.323	1.327	1.326	1.325 ±0.002
300	1.320	1.323	1.321	1.321 ±0.002

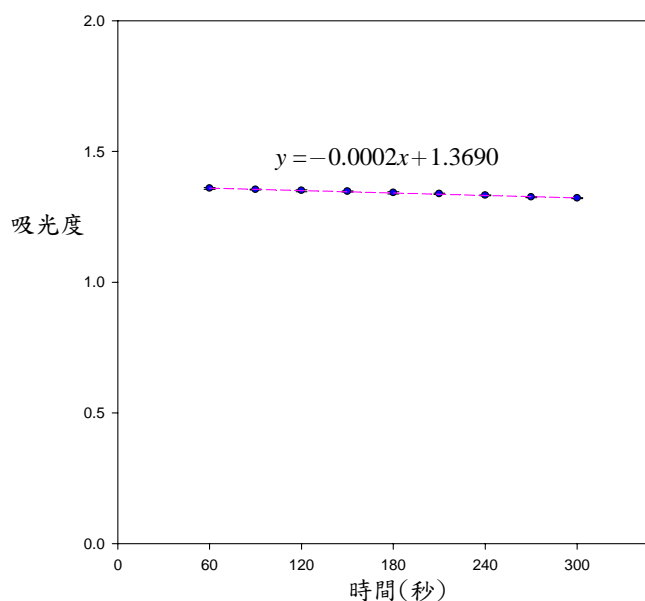


圖 8. 吸光度與反應時間的關係

討論：

1. 由圖 8 顯示，吸光度與時間的線性關係十分顯著，它的趨勢線方程式： $y = -0.0002x + 1.3690$ ，斜率為 -0.0002 ，此斜率非常小，這表示它的吸光度會隨時間的增加而緩慢地降低。
2. 我們使用分光光度計檢測樣品時，都固定反應 1 分鐘讀取吸光度，所以因吸光度緩慢降低所造成的誤差會減少。

(四)利用分光光度計定量維生素C可行性之探討

步驟：

1. 依下表的比例配製各樣品溶液。

靛酚 標準溶液(ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
維生素 C 標準溶液(B) (ml)	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
偏磷酸-醋酸 溶液(ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
蒸餾水(ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	14

2. 取適量的樣品注入試料槽中，以分光光度計檢測，波長設定為 510nm，反應 1 分鐘時，讀取吸光度。
3. 將維生素 C 含量與吸光度之關係以圖形表示，並利用 SigmaPlot 軟體，計算出趨勢線的方程式。

結果：

1. 由表 7 和圖 9 顯示，維生素 C 含量在 0~1.1 mg 的範圍內，維生素 C 含量與吸光度呈現明顯的線性關係。

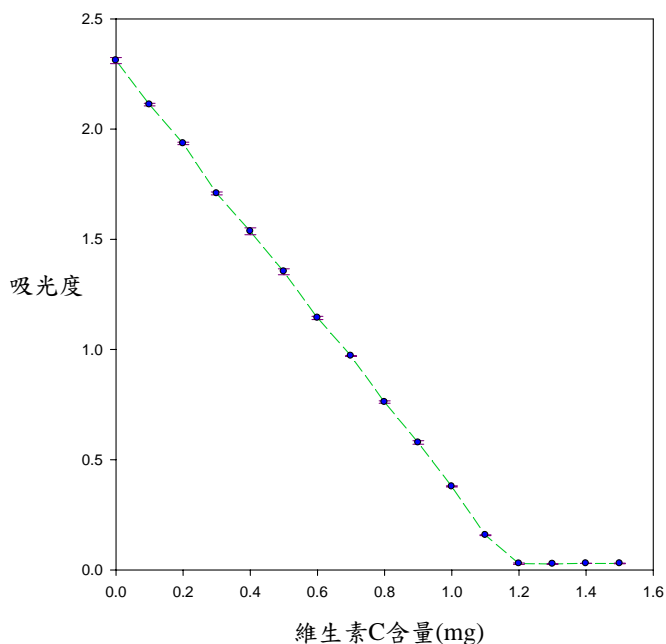


圖 9. 維生素 C 含量與吸光度之關係圖

表 7. 維生素 C 含量與吸光度之關係表

維生素 C 含量(mg)	吸光度			
	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
1.5	0.031	0.029	0.028	0.029 ±0.002
1.4	0.029	0.029	0.030	0.029 ±0.001
1.3	0.028	0.027	0.026	0.027 ±0.001
1.2	0.027	0.032	0.026	0.028 ±0.000
1.1	0.158	0.159	0.156	0.158 ±0.002
1.0	0.378	0.377	0.381	0.379 ±0.002
0.9	0.586	0.577	0.571	0.578 ±0.008
0.8	0.765	0.764	0.755	0.761 ±0.006
0.7	0.970	0.972	0.970	0.971 ±0.001
0.6	1.151	1.143	1.136	1.143 ±0.008
0.5	1.362	1.359	1.338	1.353 ±0.013
0.4	1.553	1.532	1.523	1.536 ±0.015
0.3	1.701	1.715	1.708	1.708 ±0.007
0.2	1.94	1.936	1.929	1.935 ±0.006
0.1	2.107	2.118	2.109	2.111 ±0.006
0.0	2.315	2.322	2.295	2.311 ±0.014

2. 若將維生素 C 含量限定在 0~1.1 mg 的範圍內，可進一步繪出圖 10，其趨勢線的方程式為： $y = -1.9376x + 2.3110$ 。

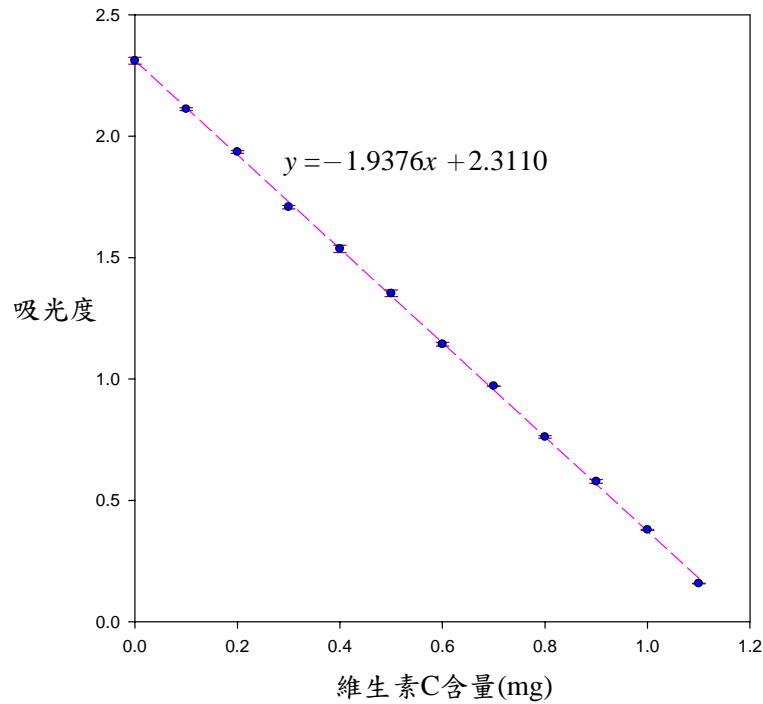


圖 10. 維生素 C 含量與吸光度之線性關係圖

討論：

1. 由表 7 顯示，維生素 C 含量在 1.2 mg 以上時，吸光度已相當小，表示維生素 C 已過量了。
2. 維生素 C 含量若限定在 0~1.1 mg 的範圍內，維生素 C 含量與吸光度的線性關係十分顯著，這表示可利用此趨勢線，做為維生素 C 的檢量線。
3. 我們只要將待測樣品經適當的稀釋，加入定量的靛酚溶液，利用分光光度計測定樣品的吸光度，將吸光度的值代入檢量線方程式中，就可計算出維生素 C 含量。

(五)利用分光光度計法測定果汁中的維生素C

步驟：

1. 「離心」後的樣品 2ml + 1ml 偏磷酸-醋酸溶液 + 12ml 蒸餾水 + 10ml 靛酚標準溶液，在燒杯中混合均勻。
2. 取適量的樣品注入試料槽中，以分光光度計檢測，波長設定為 510nm，反應 1 分鐘時，讀取吸光度。
3. 將樣品的吸光度，代入實驗(四)的檢量線方程式： $y = -1.9376x + 2.3110$ ，以 Excel 計算出維生素 C 含量(mg/2ml)，進一步乘以 50 換算維生素 C 含量(mg/100ml)。

結果：

1. 由表 6、圖 11 顯示，2ml 樣品的維生素 C 含量是 0.518 mg。
2. 將 2ml 樣品的維生素 C 含量換算後，得到 100ml 樣品的維生素 C 含量是 25.869mg。

表 8. 以分光光度計法測定的維生素 C 含量

	實驗一	實驗二	實驗三	平均值
吸光度	1.305	1.312	1.308	1.308 ±0.004
維生素 C 含量(mg/2ml)	0.519	0.515	0.518	0.517 ±0.002
維生素 C 含量(mg/100ml)	25.955	25.774	25.877	25.869 ±0.091

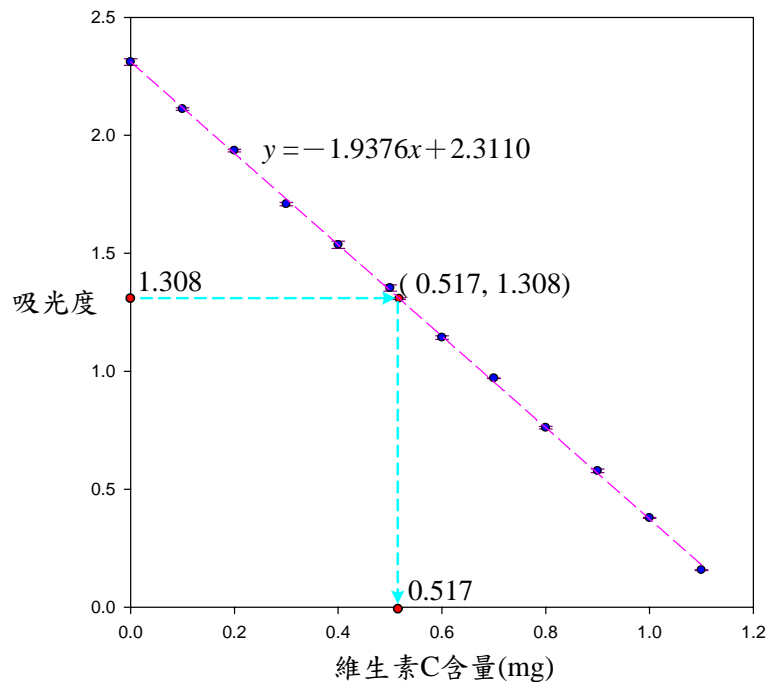


圖 11. 以分光光度計法測定的維生素 C 含量

討論：

1. 「分光光度計法」測出的維生素 C 含量是 25.869mg/100ml；「靛酚滴定法」測出的維生素 C 含量是 26.144 mg/100ml，二者的結果很接近。
2. 在「分析化學」滴定分析法中，明白指出「滴定終點」與「當量點」不一定恰好符合，它們之間存在的分析誤差稱為「滴定誤差」，也稱為「終點誤差」。⁽³⁾
3. 「分光光度計法」測出的 25.869mg/100ml，稍微低於「靛酚滴定法」測出的 26.144 mg/100ml，這可能是「終點誤差」所造成。因為辨別出滴定終點的顏色時，很可能稍微滴定過量了。

【研究三】「靛酚滴定法」與「分光光度計法」之實際測試

(一)「柳丁汁」中維生素C含量之測定

步驟：

A. 靛酚滴定法：

1. 將柳丁汁依下表的的比例配製待測樣品：

樣品	果汁(ml)	偏磷酸-醋酸 溶液(ml)	維生素 C 標 準溶液 B (ml)	蒸餾水(ml)
空白試驗	0	1	0	24
加 0mg 維生素 C	2	1	0	12
加 0.1mg 維生素 C	2	1	1	11
加 0.2mg 維生素 C	2	1	2	10
加 0.3mg 維生素 C	2	1	3	9

2. 分別將待測樣品置入錐形瓶中，使用靛酚來進行滴定。
3. 將靛酚滴定量(ml)，代入下列計算公式，利用 Excel 計算出樣品中的維生素 C 含量(mg)及標準差，並計算出相對偏差。

樣品中的維生素 C 含量 (mg)=(a-b)×K

a：靛酚滴定量(ml)

b：空白試驗靛酚滴定量(ml)

K：1ml 的靛酚相當於維生素 C 的 mg 數



B. 分光光度計法：

1. 同【研究二】實驗(四)的方法，利用維生素 C 含量與吸光度的關係，計算出維生素 C 的檢量線方程式。
2. 將柳丁汁依下表的的比例配製待測樣品：

樣品	果汁(ml)	靛酚 標準溶液(ml)	偏磷酸-醋酸 溶液(ml)	維生素 C 標 準溶液 B (ml)	蒸餾水(ml)
空白試驗	2	0	1	0	22
加 0mg 維生素 C	2	10	1	0	12
加 0.1mg 維生素 C	2	10	1	1	11
加 0.2mg 維生素 C	2	10	1	2	10
加 0.3mg 維生素 C	2	10	1	3	9

3. 分別取適量的待測樣品注入試料槽中，以分光光度計檢測，波長設定為 510nm，反應 1 分鐘時，讀取吸光度。
4. 將樣品的吸光度，代入檢量線方程式，以 Excel 計算出樣品中的維生素 C 含量(mg)及標準差，並計算出相對偏差。

結果：

1. 維生素 C 含量與吸光度之關係如圖 12 所示，其檢量線方程式： $y = -2.0055x + 2.3248$ 。

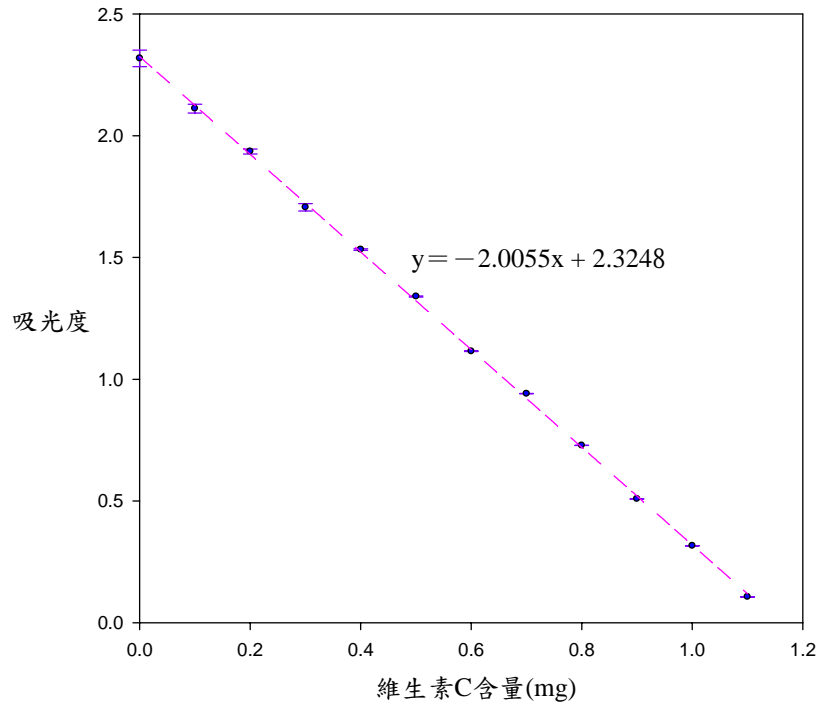


圖 12. 維生素 C 含量與吸光度之關係圖

2. 在維生素 C 含量方面，「靛酚滴定法」稍大於「分光光度計法」。

3. 在相對偏差方面，「靛酚滴定法」與「分光光度計法」差異不大。

A. 靛酚滴定法：

表 9. 以靛酚滴定法測定柳丁汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：0ml (只要一滴靛酚就變色)

維生素 C 添加量(mg)	靛酚滴定量(ml)			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	4.5	4.6	4.5	0.559	0.571	0.559	0.563	0.007
0.100	5.3	5.4	5.4	0.658	0.671	0.671	0.667	0.007
0.200	6.2	6.3	6.2	0.770	0.783	0.770	0.774	0.007
0.300	7.0	7.2	7.1	0.870	0.894	0.882	0.882	0.012

表 10. 以靛酚滴定法測定柳丁汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B-A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.1035	0.0035	3.5%
0.200	0.2112	0.0112	5.6%
0.300	0.3188	0.0188	6.3%

B. 分光光度計法：

表 11. 以分光光度計法測定柳丁汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：吸光度 0.023 (表中的吸光度已扣除 0.023)

維生素 C 添加量(mg)	吸光度			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	1.287	1.266	1.267	0.517	0.528	0.527	0.524	0.006
0.100	1.068	1.067	1.044	0.627	0.627	0.639	0.631	0.007
0.200	0.866	0.838	0.839	0.727	0.741	0.741	0.737	0.008
0.300	0.630	0.656	0.642	0.845	0.832	0.839	0.839	0.006

表 12. 以分光光度計法測定柳丁汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.1065	0.0065	6.5%
0.200	0.2122	0.0122	6.1%
0.300	0.3145	0.0145	4.8%

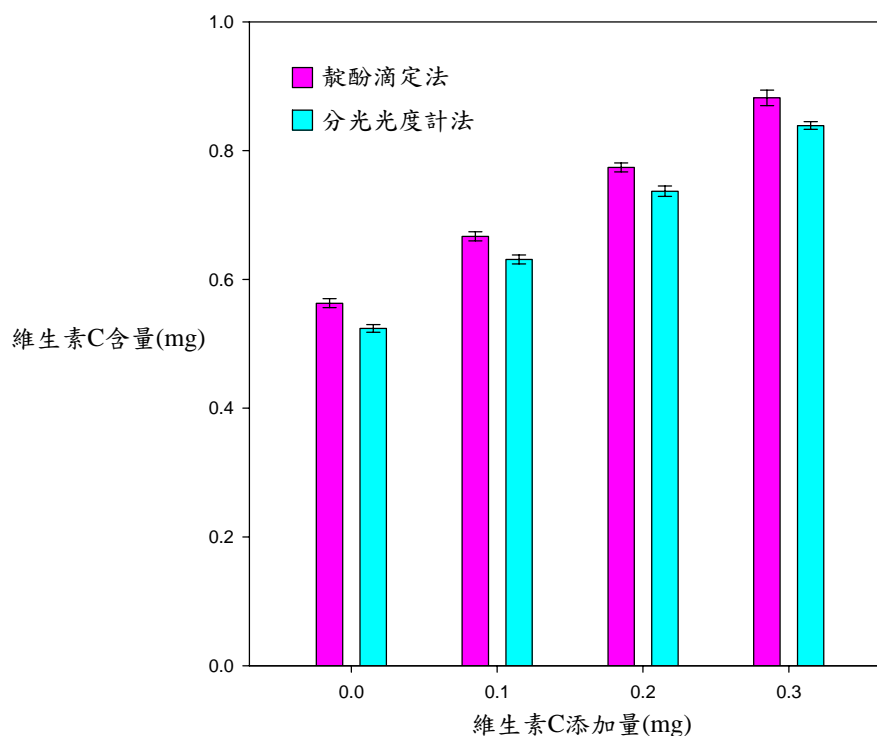


圖 13. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」測定柳丁汁中維生素 C 含量之比較

討論：

1. 在實驗設計上，「靛酚滴定法」與「分光光度計法」條件要一致，所以樣品量都採用是 2ml。
2. 測出的維生素C含量，「靛酚滴定法」稍大於「分光光度計法」，這可能是「終點誤差」所造成⁽³⁾，因為辨別出滴定終點的顏色時，很可能已經稍微滴定過量了。
3. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」的相對偏差沒有明顯差異，這表示此二種方法的實驗精密性相似。

(二)「百香果汁」中維生素C含量之測定

步驟：

- A. 靛酚滴定法：同實驗(一)步驟 A，果汁改採百香果汁。
- B. 分光光度計法：同實驗(一)步驟 B，果汁改採百香果汁。



結果：

- 1. 在維生素 C 含量方面，「靛酚滴定法」僅稍微大於「分光光度計法」，二者的測定結果十分接近。
- 2. 在相對偏差方面，「靛酚滴定法」與「分光光度計法」差異不大，二者都不錯。

A. 靛酚滴定法：

表 13. 以靛酚滴定法測定百香果汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：0ml

維生素 C 添加量(mg)	靛酚滴定量(ml)			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	2.3	2.3	2.4	0.286	0.286	0.298	0.290	0.007
0.100	3.2	3.2	3.2	0.398	0.398	0.398	0.398	0.000
0.200	4.1	4.2	4.0	0.509	0.522	0.497	0.509	0.012
0.300	5.0	4.9	4.9	0.621	0.609	0.609	0.613	0.007

表 14. 以靛酚滴定法測定百香果汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B - A }{A}$
0.100	0.1077	0.0077	7.7%
0.200	0.2195	0.0195	9.7%
0.300	0.3230	0.0230	7.7%

B. 分光光度計法：

表 15. 以分光光度計法測定百香果汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：吸光度 0.016（表中的吸光度已扣除 0.016）

維生素 C 添加量(mg)	吸光度			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	1.751	1.735	1.742	0.286	0.294	0.291	0.290	0.004
0.100	1.541	1.519	1.523	0.391	0.402	0.400	0.397	0.006
0.200	1.306	1.316	1.322	0.508	0.503	0.500	0.504	0.004
0.300	1.123	1.135	1.127	0.599	0.593	0.597	0.597	0.003

表 16. 以分光光度計法測定百香果汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B-A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.1072	0.0072	7.2%
0.200	0.2134	0.0134	6.7%
0.300	0.3063	0.0063	2.1%

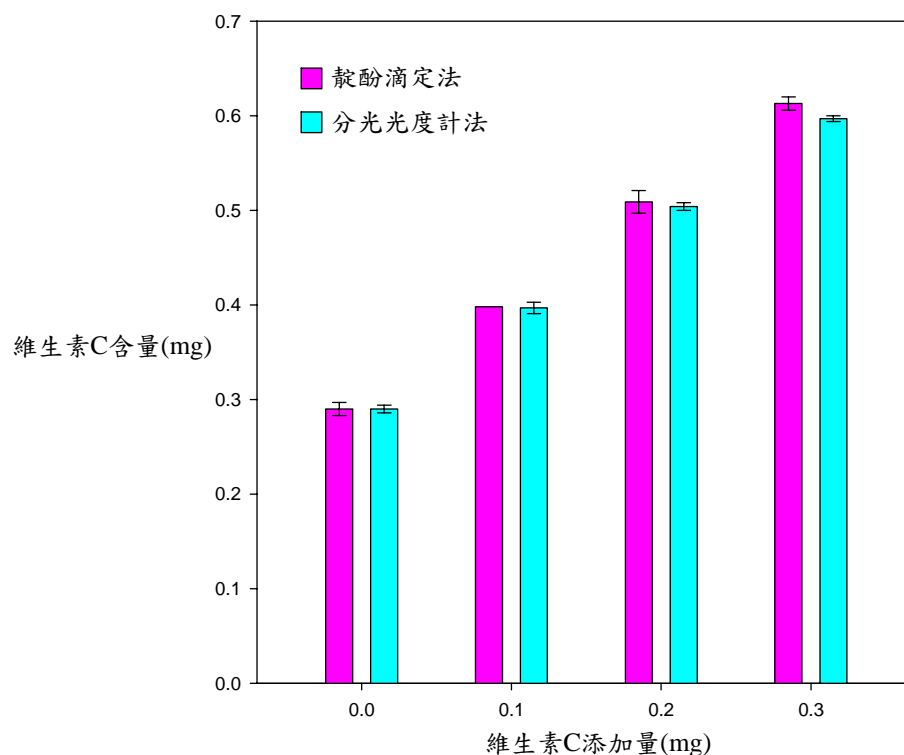


圖 14. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」測定百香果汁中維生素 C 含量之比較

討論：

1. 「靛酚滴定法」測出的維生素 C 含量，十分接近「分光光度計法」，這可能是百香果汁較淡，因「終點誤差」造成滴定過量的誤差較小。
2. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」的相對偏差沒有明顯差異，這表示此二種方法的實驗精密性都不錯。

(三) 「蘋果汁」中維生素C含量之測定

步驟：

A. 靛酚滴定法：同實驗(一)步驟 A，果汁改採蘋果汁。

B. 分光光度計法：同實驗(一)步驟 B，果汁改採蘋果汁。



結果：

1. 在維生素 C 含量方面，「靛酚滴定法」稍微大於「分光光度計法」。
2. 在相對偏差方面，「靛酚滴定法」比「分光光度計法」稍微大一些。

A. 靛酚滴定法：

表 17. 以靛酚滴定法測定蘋果汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：0ml

維生素 C 添加量(mg)	靛酚滴定量(ml)			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	2.1	2.1	2.2	0.261	0.261	0.273	0.265	0.007
0.100	2.9	3.1	3.0	0.360	0.385	0.373	0.373	0.012
0.200	3.8	3.7	3.9	0.472	0.460	0.484	0.472	0.012
0.300	4.8	4.7	4.8	0.596	0.584	0.596	0.592	0.007

表 18. 以靛酚滴定法測定蘋果汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.1077	0.0077	7.7%
0.200	0.2070	0.0070	3.5%
0.300	0.3271	0.0271	9.0%

B. 分光光度計法：

表 19. 以分光光度計法測定蘋果汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：吸光度 0.021（表中的吸光度已扣除 0.021）

維生素 C 添加量(mg)	吸光度			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	1.806	1.797	1.812	0.259	0.263	0.256	0.259	0.004
0.100	1.616	1.596	1.618	0.353	0.363	0.352	0.356	0.006
0.200	1.391	1.383	1.395	0.466	0.470	0.464	0.466	0.003
0.300	1.244	1.230	1.242	0.539	0.546	0.540	0.542	0.004

表 20. 以分光光度計法測定蘋果汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.0972	0.0028	2.8%
0.200	0.2071	0.0071	3.5%
0.300	0.2824	0.0176	5.9%

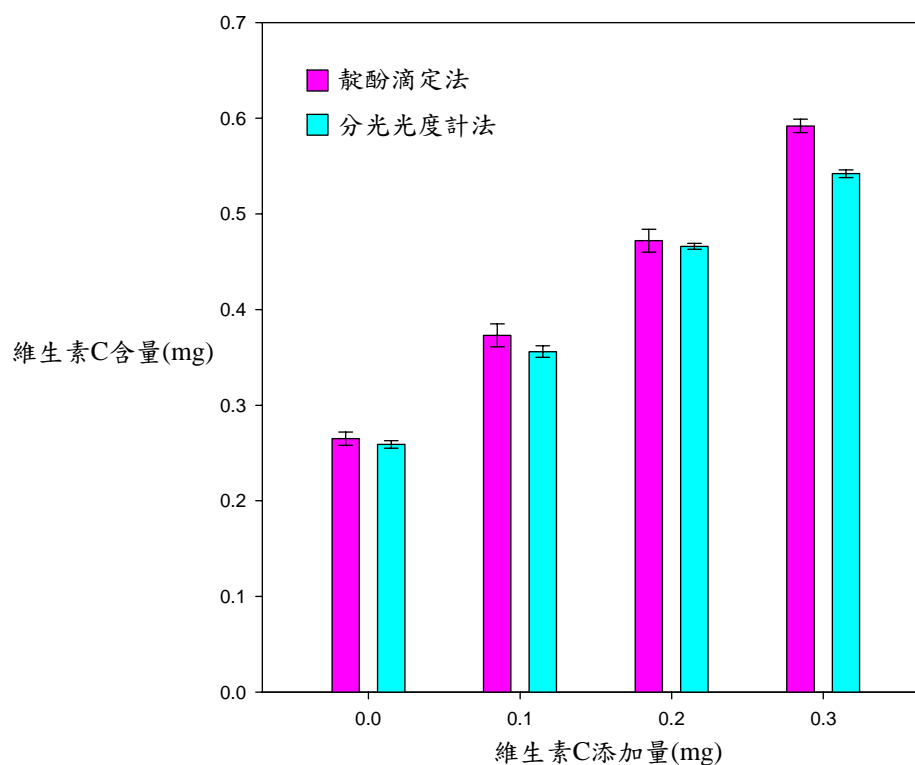


圖 15. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」測定蘋果汁中維生素 C 含量之比較

討論：

1. 「靛酚滴定法」測出的維生素 C 含量，稍大於「分光光度計法」，這可能是因為蘋果汁的色澤較深一些，造成「終點誤差」導致稍微滴定過量。
2. 「靛酚滴定法」的相對偏差，稍大於「分光光度計法」，這可能也是因為蘋果汁的色澤稍微深一些所造成。

(四) 「紅芭樂汁」中維生素C含量之測定

步驟：

A. 靛酚滴定法：同實驗(一)步驟 A，果汁改採紅芭樂汁(離心處理)。

B. 分光光度計法：同實驗(一)步驟 B，果汁改採紅芭樂汁(離心處理)，果汁、維生素 C 標準溶液(B)均先稀釋 2 倍。



結果：

1. 在維生素 C 含量方面，「靛酚滴定法」明顯大於「分光光度計法」。
2. 在相對偏差方面，「靛酚滴定法」也明顯大於「分光光度計法」。

A. 靛酚滴定法：

表 21. 以靛酚滴定法測定紅芭樂汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：0ml

維生素 C 添加量(mg)	靛酚滴定量(ml)			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	6.8	6.7	6.8	0.845	0.832	0.845	0.841	0.007
0.100	7.7	7.6	7.7	0.957	0.944	0.957	0.952	0.007
0.200	8.7	8.5	8.6	1.081	1.056	1.068	1.068	0.012
0.300	9.5	9.4	9.6	1.180	1.168	1.193	1.180	0.012

表 22. 以靛酚滴定法測定紅芭樂汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B-A }{A}$
0.100	0.1118	0.0118	11.8%
0.200	0.2277	0.0277	13.9%
0.300	0.3395	0.0395	13.2%

B. 分光光度計法：

表 23. 以分光光度計法測定紅芭樂汁中維生素 C 含量

※ 空白試驗：吸光度 0.041 (表中的吸光度已扣除 0.041)

維生素 C 添加量(mg)	吸光度			維生素 C 含量(mg)				
	一	二	三	一	二	三	平均	標準差
0.000	1.566	1.573	1.586	0.757	0.750	0.737	0.748	0.010
0.100	1.472	1.464	1.475	0.850	0.858	0.847	0.852	0.006
0.200	1.359	1.377	1.368	0.963	0.945	0.954	0.954	0.009
0.300	1.256	1.278	1.265	1.066	1.044	1.057	1.056	0.011

表 24. 以分光光度計法測定紅芭樂汁中維生素 C 含量之相對偏差

A：實際維生素 C 添加量(mg)	B：測出維生素 C 增加量(mg)	B - A	相對偏差(%)： $\frac{ B - A }{A}$
0.100	0.1044	0.0044	4.4%
0.200	0.2064	0.0064	3.2%
0.300	0.3078	0.0078	2.6%

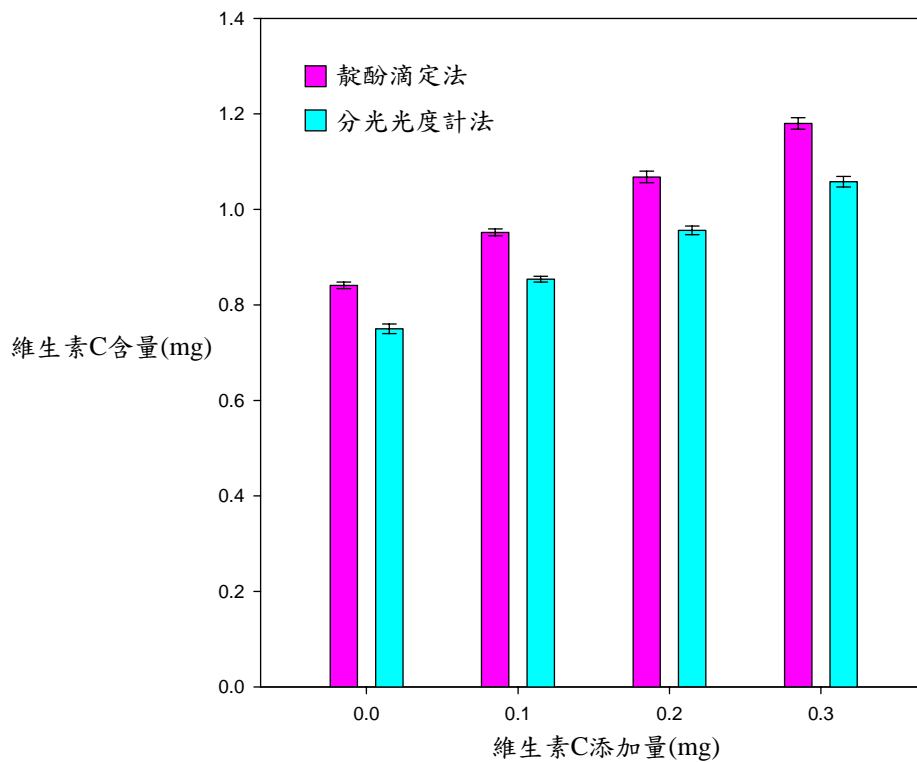


圖 16. 「靛酚滴定法」與「分光光度計法」測定紅芭樂汁中維生素 C 含量之比較

討論：

1. 由於紅芭樂汁中維生素 C 含量較高，使用「分光光度計法」時，樣品都先稀釋 2 倍，再取 2ml 稀釋果汁進行測定。
2. 「靛酚滴定法」測出的維生素 C 含量，明顯大於「分光光度計法」，這可能是因為紅芭樂汁的色澤較深，造成「終點誤差」導致滴定過量。
3. 測定柳丁汁、百香果汁、蘋果汁時，「靛酚滴定法」與「分光光度計法」的相對偏差

差異不明顯；但是測定紅芭樂汁時，「鞣酚滴定法」的相對偏差明顯大於「分光光度計法」(如圖 17、圖 18 所示)，這可表示當樣品的色澤較深時，「分光光度計法」仍然保有較低的相對偏差。

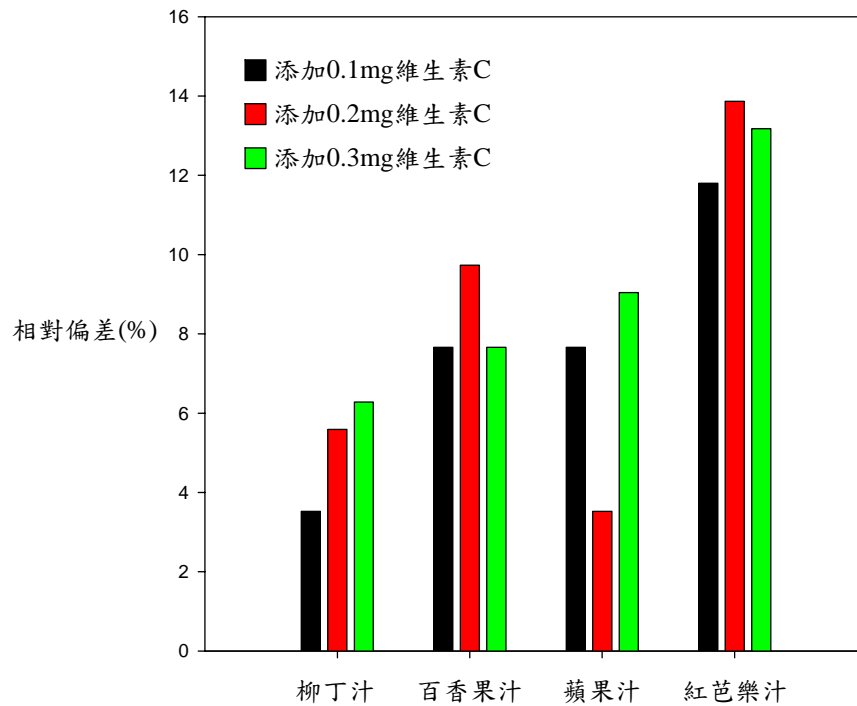


圖 17. 「鞣酚滴定法」的相對偏差

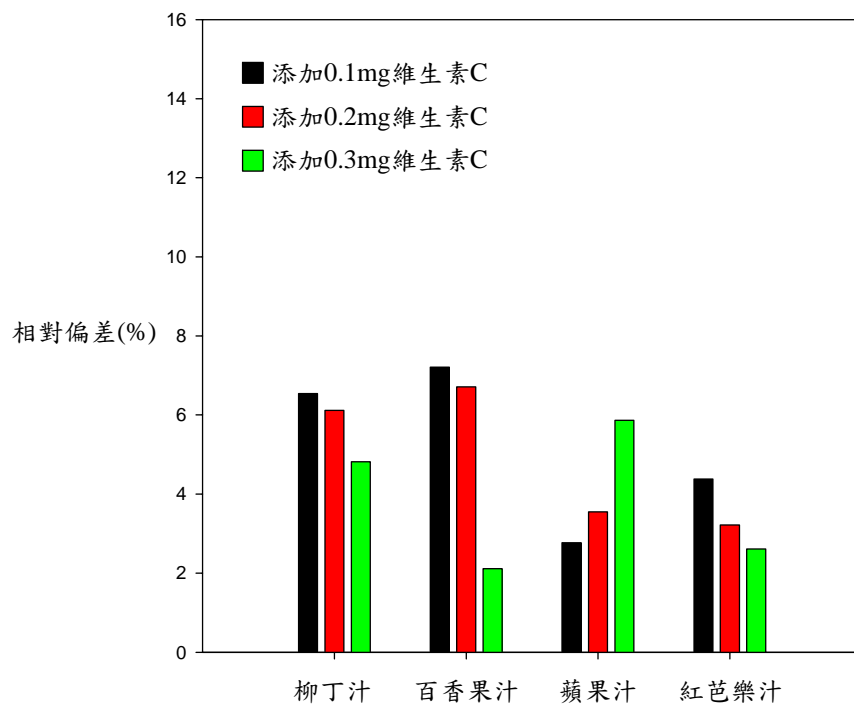


圖 18. 「分光光度計法」的相對偏差

陸、結論

一、研究之結論

【研究一】果汁前處理方法之改良

1. 採「離心」的處理方法，明顯比「過濾」節省時間。
2. 採「離心」的處理方法，其樣品的澄清度明顯優於「過濾」。
3. 利用靛酚滴定法測定維生素C含量，結果是「離心」最接近「原汁」。

【研究二】以「分光光度計法」取代「靛酚滴定法」

1. 過量的靛酚溶液+維生素C，由於色澤變化與維生素C含量呈現很好的規律性，所以應用此規律性在維生素C定量的可行性很高。
2. 維生素C+過量靛酚最大吸光度波長是510nm。
3. 維生素C+過量靛酚的吸光度，會隨時間的增加而緩慢的降低。
4. 維生素C含量在特定範圍內，會與吸光度呈現明顯的線性關係，其趨勢線方程式為： $y = -1.9376x + 2.3110$ 。
5. 利用分光光度計測定樣品的吸光度，將吸光度的值代入趨勢線方程式中，就可以計算出維生素C的含量。

【研究三】「靛酚滴定法」與「分光光度計法」之實際測試

1. 使用「靛酚滴定法」所測出的維生素C含量，通常稍微大於「分光光度計法」，當果汁樣品的色澤愈深時，所呈現的差異愈明顯。
2. 測定色澤較淺的果汁時，「靛酚滴定法」與「分光光度計法」的差異不明顯，但是測定色澤較深的紅芭樂汁時，「靛酚滴定法」的相對偏差明顯大於「分光光度計法」，這表示當樣品的色澤較深時，「分光光度計法」仍然保有較好的精密性。

二、研究之貢獻

1. 本研究發現果汁樣品前處理時，「離心」法可有效改善「過濾」法的缺點，具備節省時間、澄清度高、處理量大等優點，不過其缺點是離心機較抽氣過濾裝置較昂貴，如果實驗室已有離心機，則可善加利用。
2. 本研究發現「分光光度計法」可有效改善「靛酚滴定法」終點不易明確辨別的缺點，而且「分光光度計法」的精準性與「靛酚滴定法」相近。
3. 測定飲料中維生素C含量的方法有很多種，一般採用AOAC (1984) 的「靛酚滴定法」⁽⁷⁾，在工業生產品管上，若採用「分光光度計法」來測定維生素C含量，則具有快速與精準的優點。

柒、參考資料

1. AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th ed, The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., USA, p844 ~845, 1984。
2. 朱紫雲 李淑芬 編著, 定量分析及實驗, 二版, 台北, 文京圖書股份有限公司, p403, p408~413, 1993。
3. 李俊義 編著, 分析化學, 初版, 台北, 科技圖書股份有限公司, p159~160, p498 ~502、p513~518, 1990。
4. 林清騫 編著, 食品化學與分析, 三版, 雲林, 文昌書店, p104~105, 2004。
5. 林清騫 編著, 食品化學與分析實習, 三版, 雲林, 文昌書店, p125~128, 2004。
6. 張為憲 編著, 食品化學, 六版, 台北, 華香園出版社, p143~146, 1992。
7. 葉正茂 編著, 果蔬汁加工學, 二版, 台北, 瑩圃電腦出版社, p292~294, 1993。
8. 趙世彬 鄒煦欅 蔡東璣 陳河吉 周大中 李文齡 編譯, 生物化學, 二版, 台北, 藝軒圖書出版社, p216~218, 1993。

【評語】

091101

玫瑰紅中的玄機－維生素 C 定量方法
之改良

本研究設計嚴謹，文獻探討詳實，具創意及應用性，成果豐碩，學生
表達亦清晰，表現可圈可點。