

紫外法直接测定维生素 C

彭玉麟 史延茂

(河北省科学院生物研究所, 石家庄)

提 要

利用维生素 C 在波长 267nm 处有较大吸收值这一特点, 用铜离子氧化破坏溶液中的维生素 C 为对照, 可以有效地消除测定中的背景误差, 因此可以用来直接测定一些样品中的维生素 C 的含量, 而无需进行前处理。本文并对此测试方法的一些条件进行了摸索和比较。

维生素 C (又叫抗坏血酸) 是人类营养中最重要的维生素之一。在很多工作中, 特别是对一些饮料和食品都需要测定它的含量。各种测定

维生素 C 的方法都有一定的缺陷, 如滴定法, 虽然简单快速, 但试剂不稳定, 并且不适于测定有色样品^[1]。荧光法测定较为麻烦费时^[2], 抗坏血

3a, 见封 3), 其余转移至 NC 膜上, 一份考马斯亮蓝染色作对照, 另两份, 一份加兔抗鼠 IgG 血清结合、显色(图 3b, 见封 3), 一份加兔抗鼠 IgM 血清结合、显色(图 3c, 见封 3), 鉴定结果如下:

1. McAb IgG 的 γ 链和轻链与抗鼠 IgG₁ 血清作用后, 显色都很深, 表明此份 McAb 为 IgG₁ 亚类, (见图 3b.1)。除此尚有分子量小于 γ 链的 8—9 条区带 (因含量较低, 图 3a 未染出) 也显色, 这可能是抗体不够稳定, 在贮存过程发生部分降解形成碎片所致; 从图 3c.1 看到, 其与抗鼠 IgM 血清作用后, 除轻链弱显色, 显示与之有交叉反应外, 未检出相当 μ 链的区带, 表明该抗体不含 IgM 杂质。

2. McAb IgM 与抗鼠 IgM 血清作用后, μ 链与轻链显色很深, 确证该抗体为 IgM 类。(见图 3c.2) 尚有两条区带 (图 3a 未染出) 也显色的问题, 我们过去的实验曾发现此二区带, 可能是 IgM 分子在贮存过程形成的降解产物。由图 3b.2 看出, McAbIgM 与抗鼠 IgG₁ 作用的结果, 仅轻链与之显色, 显示有交叉反应外, 未检出相当 γ 链的区带, 证明该抗体不含鼠血清

IgG 中的主要成分 IgG₁ 亚类。

3. 对照鼠血清 IgG 与抗鼠 IgG₁ 血清作用, 仅 γ 链显色, 且较弱(见图 3b.3)。原因是鼠血清 IgG 中, IgG₁ 仅是其成分之一, 其余为其他 IgG 亚类。虽然加样量与 McAb IgG 相近 (皆约 1.5 μ g), 而显色远比 McAbIgG 浅, 至于轻链未显色, 可能是非同种之故; 由图 3c.3 (见封 3)。看出, 其与抗鼠 IgM 血清未显色, 无作用, 证明此鼠血清 IgG 中不含 IgM 杂质。

参 考 文 献

- [1] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 4350.
- [2] Walker, J. M. et al.: *Technique in molecular biology*, Groom Helm LTd, 1983, 273—285, 287—307.
- [3] 罗玉芳等: 中国人兽共患病杂志 1987, **4**(3), 19.
- [4] Laemmli, U. K.: *Nature (London)* 1970, **227**, 680.
- [5] Andersen, K.: *J. Biophys. Biochem. Methods*, 1984, **10**, 203.
- [6] 卫生部药品生物制品检定所血清生化室: 生物制品通讯, 1976, **2**(1), 134.
- [7] 罗玉芳等: 生物制品通讯 1979, **8**(6), 286.

[本文于 1988 年 4 月 1 日收到]

酸在波长为 243—267nm 处有较高的吸收值,但在样品成分比较复杂时有较强烈的背景吸收而不适用。用碱加热法和处理法都存在试剂较贵,操作复杂,时间较长等一系列问题而不能广泛使用^[3,4]。我们试用了铜离子氧化消除背景误差法^[5],并对反应条件进行了摸索,此方法能直接测定葡萄汁样品而不需要进行前处理,操作简单,干扰少,是快速测定维生素 C 的一种较好的方法。

一、仪器与试剂

仪器用 751 型分光光度计;所用试剂均为分析纯。

1. 抗坏血酸贮液的配制 100mg 抗坏血酸溶于 100ml 蒸馏水中,配成 100 μ g/ml 贮存液 4℃ 保存,用它配制不同浓度的抗坏血酸溶液。

2. 5 μ g/ml 的铜离子溶液 首先配制 1000 μ g/ml 铜离子的硫酸铜溶液,然后取铜溶液 5 ml 加入 7ml 1mol/L 醋酸溶液,200ml 1mol/L 醋酸钠溶液用蒸馏水稀释到 1000ml, pH 6,不同 pH 的铜离子溶液用 6mol/L HCl 和 2.5mol/L NaOH 将溶液调到所需 pH 值。

3. 5×10^{-4} mol/L 的 EDTA 溶液 36.5 mg EDTA 溶于 250ml 蒸馏水中,并用此溶液稀释成其它浓度的 EDTA 溶液。

4. 铜离子-EDTA 混合液 (6.2×10^{-5} mol/L) 在使用前将上述铜离子溶液和 EDTA 溶液以 4:1(V/V) 比例混合而成。每次试验均使用新配制的混合液。

二、方 法

751 型分光光度计波长定在 267nm。

1. 标准曲线的制作 用上述 1000 μ g/ml 的抗坏血酸贮液配制成 0—120 μ g/ml 的抗坏血酸溶液,取 1ml 此溶液,加入 5ml 铜离子-EDTA 混合液,测定其吸收值,1ml 蒸馏水加入 5ml 铜离子-EDTA 混合液作空白对照,作出标准曲线,斜率为 S_0 。

2. 山葡萄样品的测试 山葡萄挤压成汁,12000r/min 离心 5 分钟,取出上清液并稀释 10

倍,取 1ml 已稀释的样品溶液,加入 5ml 铜离子-EDTA 混合液 (pH6) 于波长 267nm 处测定其吸收值,结果为 $J_{(1)}$,另取 1ml 已稀释的样品溶液加入 4ml 铜离子溶液 (5 μ g/ml),50℃ 水浴中加热 15 分钟,以破坏所有维生素 C,然后加入 1ml 5×10^{-4} mol/L EDTA 溶液,于波长 267nm 处测定其吸收值,结果为 $J_{(11)}$ 。

样品中抗坏血酸含量 = $6 \times 10 \times \Delta J / S$,其中 6 是用铜-EDTA 溶液稀释的倍数,10 是样品稀释倍数, $\Delta J = J_{(1)} - J_{(11)}$, S 是标准曲线的斜率。

三、结果及讨论

1. 标准曲线 如图 1 所示,抗坏血酸浓度在 0—120 μ g/ml 范围内,吸收值与浓度呈线性关系,斜率 $S = 0.0125$ 。

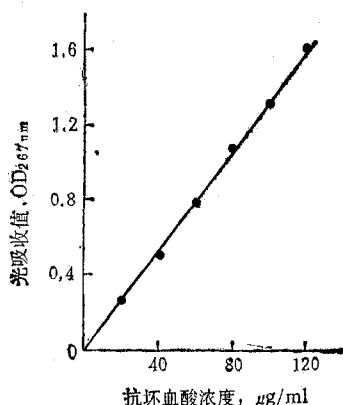


图 1 抗坏血酸标准曲线

2. 铜离子对抗坏血酸的氧化破坏作用 此方法的关键是用铜离子氧化抗坏血酸来消除背景误差,因此氧化是否完全,直接影响到测量的结果,用 1ml 50 μ g/ml 的抗坏血酸溶液加入 4ml 5 μ g/ml 的铜离子溶液,在不同温度下放置 15min,然后加入 1ml 5×10^{-4} mol/L EDTA,结果见表 1。

表 1 不同温度下铜离子对抗坏血酸的氧化破坏作用

温度	30℃	40℃	50℃
O.D. 267 nm	0.042	0.025	0.005
氧化率	93.2%	96%	99.2%

在 50℃ 加热 15min, 溶液中的抗坏血酸几乎全部被破坏, 在 30℃ 及 40℃ 时也只有少量抗坏血酸未被破坏, 说明用此方法消除背景误差是可靠的。

3. pH 对此测量方法的影响 在不同 pH 值中, 抗坏血酸的离解程度不同, 我们测定了在不同 pH 值下抗坏血酸的吸收曲线, 结果见图 2。在各种 pH 值下均呈线性关系。在 pH6 和 pH7 时, 波长 267nm 处的吸收值高, 曲线斜率大, $S = 0.0125$ 。在 pH5 和 pH8 时, 吸收值降低, $S = 0.0115$ 。在 pH4 时, $S = 0.0075$ 。这主要是因为 pH4 时, 维生素 C 的最大吸收波长在 250nm 左右, 因此在波长 267nm 处吸收值较低^[5]。

在 pH = 4, 5, 6, 7, 8 时, 进一步试验了 pH 对溶液稳定性的影响, 结果见图 3。由于在 pH5 和 pH6, pH7 和 pH8 时结果大致相同, 因此图 3 只给出了 pH4, pH6 和 pH7 时的试验结果。由图 3 可以看出, 当溶液 pH 值较低时 (pH4, 6) 在 1h 内, 波长 267nm 处的吸收值无明显变化, 随着溶液 pH 值的升高, 在抗坏血酸浓度较高时其吸收值降低较多。这主要是由于

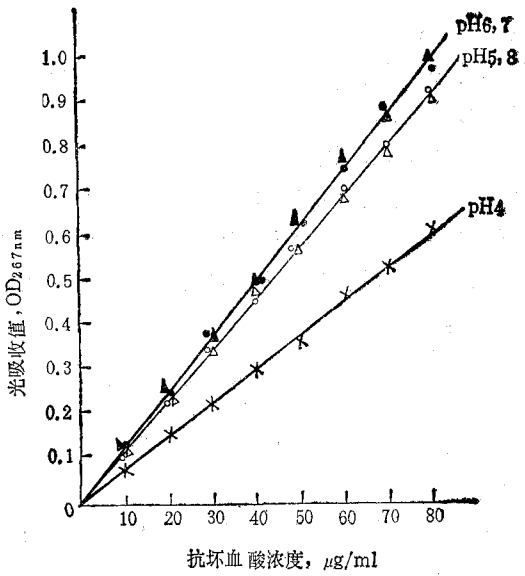


图 2 铜离子氧化法测定维生素 C 时 pH 对波长 267nm 处吸收值的影响

在碱性溶液中抗坏血酸较易被氧化的缘故。可以看出, 当 pH6 时, 在 1h 内吸收值无明显变化, 但在 2h 时随着溶液浓度的增加, 其吸收值降低, 说明此方法在 1h 内测定其结果是可靠的。

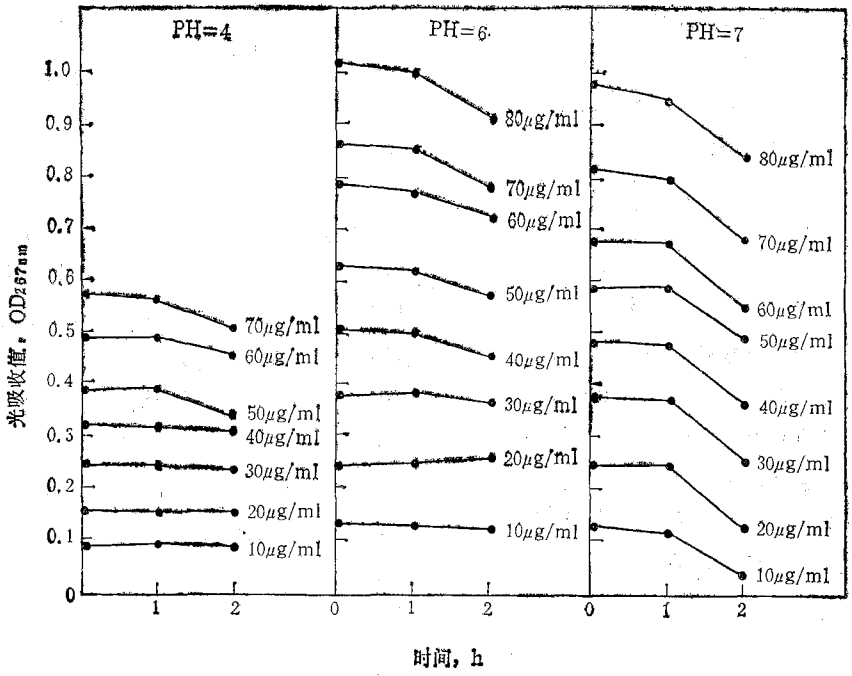


图 3 不同 pH 值下不同浓度抗坏血酸溶液在波长 267nm 处吸收值稳定性比较

4. EDTA 可以保护抗坏血酸^[6], 保持溶液的稳定性。我们在室温下 pH6 时用抗坏血酸和山葡萄提取液测定了不同 EDTA 浓度下溶液的稳定性(波长 267nm 处吸收值随时间的变化), 结果见表 2。

表 2 EDTA 浓度对抗坏血酸稳定性的影响

时间 (h)	EDTA 浓度 (10^{-3} mol/L)	溶液浓度 $\mu\text{g/ml}$				
			5	6	8	10
0.15	10	10	0	0.124	0.12	0.13
	50	50	0.05	0.62	0.62	0.63
	山葡萄样品	山葡萄样品	未测	0.97	0.97	0.98
1	10	10	0	0.13	0.12	0.12
	50	50	0	0.61	0.62	0.61
	山葡萄样品	山葡萄样品	未测	0.97	0.96	0.99
2	10	10	0	0.11	0.09	0.11
	50	50	0	0.57	0.56	0.56
	山葡萄样品	山葡萄样品	未测	0.90	0.90	0.91

溶液中铜离子浓度为 6.2×10^{-3} mol/L。由表 2 可以看出, 当 EDTA 浓度为 5×10^{-3} mol/L, 低于溶液中铜离子浓度时, 抗坏血酸很快被氧化, 而当 EDTA 浓度等于或大于铜离子浓度时, 溶液基本保持稳定。尤其是抗坏血酸浓度较低的溶液吸收值基本上没有变化。但对于抗坏血酸浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 的溶液及山葡萄提取液来说, 进一步增加 EDTA 浓度, 其效果并不十分显著, 即使 EDTA 浓度达到 10×10^{-3} mol/L, 其溶液吸收值仍随时间在逐渐降低。因此在进行测试时应尽可能争取时间, 最好能在 1h 内测完, 以减少由于抗坏血酸被破坏所带来的实验误差。

5. 用此方法测定了山葡萄样品中维生素 C 的含量及回收率, 结果见表 3。由表 3 可以看出, 加入的抗坏血酸几乎全部被测出, 说明本方法灵敏度高, 抗干扰性好。

表 3 山葡萄中维生素 C 的含量及回收率试验结果

加入抗坏血酸 ($\mu\text{g/ml}$)	实测值 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)
0	136	
50	184	96
125	264	102.4
250	400	105.6
500	640	100.8

测样品中维生素 C 含量时, 最好先用不同量的样品做实验, 看其是否与维生素 C 含量成直线关系, 这样可检验样品中是否存在干扰物质。

由实验结果可以看出, 用铜离子氧化法可以直接测定样品中维生素 C 的含量, 而无需对样品溶液进行前处理。方法简单, 灵敏度高, 重复性也较好, 只是溶液不是十分稳定, 要求在反应后 1h 内完成测试工作。

参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系生物化学教研室: 《生物化学 试验指导》人民教育出版社, 1979, 194—197。
- [2] 张旦民, 张琦行: 《食品发酵工业》, 1986, 6, 50。
- [3] Tono, T. and Fvjita, S.: *Agric. Sol. Chem.*, 1981, 45, 2947.
- [4] Fung, Y. S. and Luk, S. F.: *Analysts*, 1985, 110, 201.
- [5] Oil-Wah, Lau et al.: *Analysts*, 1986, 111, 665.
- [6] Fogy, A. G. and Summan, A. M.: *Analyst*, 1983, 108, 691.

[本文于 1988 年 3 月 29 日收到]