

郑小曼,顾明华,沈方科,等.二硫苏糖醇还原-高效液相色谱法测定蔬菜中的还原型维生素 C 和总维生素 C 含量[J].江苏农业科学,2016,44(7):304-307.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.089

# 二硫苏糖醇还原-高效液相色谱法测定蔬菜中的还原型维生素 C 和总维生素 C 含量

郑小曼,顾明华,沈方科,路丹,韦燕燕,王学礼

(广西大学农学院农业环境与农产品质量安全重点实验室,广西南宁 530004)

**摘要:**研究建立高效液相色谱法(HPLC)快速检测蔬菜中还原型维生素 C 含量的方法,并通过二硫苏糖醇(DTT)还原脱氢型维生素 C,从而得到总维生素 C、脱氢型维生素 C 含量。以 3% 偏磷酸为提取液,乙腈-0.015 mol/L 磷酸二氢铵溶液(体积比 85:15)为流动相,流速为 1.5 mL/min,采用 Waters C-18(150 mm×3.9 mm,5 μm)反相色谱分离,用紫外检测器于 254 nm 波长下检测。结果表明:在 1~500 mg/L 浓度范围内线性良好( $r=0.9996$ ),所有蔬菜样品检测相对标准偏差为 0.63%~1.83%,平均加标回收率为 99.89%。用该方法测定蔬菜中维生素 C 含量,结果稳定、重现性良好,适用于维生素 C 含量范围较大及颜色各异的多种蔬菜。

**关键词:**高效液相色谱法(HPLC);二硫苏糖醇(DTT);蔬菜;总维生素 C;还原型维生素 C

**中图分类号:**S132;O652.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)07-0304-03

维生素 C 是一种人类必需的营养素<sup>[1]</sup>,其主要形式为 L-还原型、L-脱氢型,最主要的功能是参与胶原蛋白质的合成,动物缺乏维生素 C 会造成坏血病<sup>[2]</sup>。作为一种抗氧化剂和高活性物质,维生素 C 参与许多新陈代谢过程,可以保护人体免于自由基的威胁,具有提高免疫力,预防癌症、心脏病、中风,保护牙齿和牙龈,抗衰老等许多生理作用<sup>[2-4]</sup>。有研究表明:一定剂量的维生素 C 可抗细胞 DNA 损伤<sup>[5]</sup>;在老鼠铅中毒的同时及其后,补充维生素 C 可降低血铅浓度<sup>[6]</sup>;此外,维生素 C 还具有预防乙醇对脑、肝损伤的作用<sup>[7]</sup>。人类自身不能够制造维生素 C,其广泛的食物来源为各类新鲜果蔬,并且蔬菜中的总维生素 C 含量相比还原型维生素 C 更能够表征蔬菜的营养价值。因此,建立能够快速检测蔬菜中总维生素 C 含量的方法十分重要,能为人们的膳食营养提供更为确切的参考,从而有效预防和抵制因体内缺少维生素 C 而带来的不利影响,提高人们的工作效率和生活质量。

维生素 C 的测定方法有多种,各有优缺点。如《中华人民共和国药典》规定的碘量法因其试验操作时不易把握滴定度、碘易挥发等,使得测定结果准确度降低,不适于微量分析;而大多数水果、蔬菜的提取液具有一定色泽,又使得以颜色变化来辨别其滴定终点的国标法 2,6-二氯酚酚滴定法(GB/T 6195—1986《水果、蔬菜维生素 C 含量测定法(2,6-二氯酚酚滴定法)》)具有一定的局限性;此外,还包括容量法、苯肼

比色法、荧光光度法、电位法、紫外分光光度法等,但是这些方法或存在所需试剂较多、试剂不稳定、操作繁琐等缺点<sup>[8-10]</sup>,或只能测定还原型维生素 C 含量,不能测定具有同样生理功能的脱氢型维生素 C 含量,如荧光法、苯肼比色法<sup>[11]</sup>。

高效液相色谱(HPLC)是近年来发展起来的一种快速高效且稳定可靠、发展较快的分离技术,因其处理样品简单快速,且能同时测定几种维生素而被广泛应用于食品药品中维生素含量的测定<sup>[8-17]</sup>。但是,该方法目前主要测定的是还原型维生素 C<sup>[11]</sup>,而对蔬菜中同样具有生理功能的脱氢型维生素 C 含量的检测报道较少。本研究通过利用二硫苏糖醇(DTT)能够将脱氢型维生素 C 还原而不具有生理活性的二酮古洛糖酸则不会被还原<sup>[17-18]</sup>,并且与高效液相色谱法结合,可测定出还原型维生素 C、总维生素 C 含量,从而得出脱氢型维生素 C 含量,以总维生素 C 含量表征蔬菜的营养价值更为准确。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

乙腈,色谱纯;磷酸二氢铵,分析纯;维生素 C 标准品,分析纯,维生素 C 含量≥99.7%,国药集团化学试剂有限公司;偏磷酸,分析纯;二硫苏糖醇(DTT);超纯水,笔者所在实验室自制;0.45 μm 滤膜,国药集团化学试剂有限公司。小白菜、番茄,市购。

### 1.2 仪器与设备

Waters e2695 型高效液相色谱,美国;Waters DELTA-PAK C18 色谱柱,日本;Waters 2998 PAD 紫外检测器;DP-01 隔膜真空泵,天津市东康科技有限公司;KQ2200 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;MILLI-Q 型超纯水装置。

### 1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件 Waters DELTA-PAK C18 色谱柱,柱长

收稿日期:2015-05-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:41401574);广西大学博士启动资金(编号:XJZ140314)。

作者简介:郑小曼(1991—),女,福建霞浦人,硕士研究生,研究方向为作物环境与生态。E-mail:xiaoman\_zheng@126.com。

通信作者:韦燕燕,博士,讲师,主要从事植物营养环境生态等研究,E-mail:yanyanwei2008@163.com;王学礼,博士,讲师,主要从事作物环境及生态等研究,E-mail:wxl0224@126.com。

150 mm, 内径 3.9 mm, 颗粒大小 5  $\mu\text{m}$ ; 检测波长为 254 nm。根据本试验高效液相色谱仪的性能特点, 选择乙腈 - 0.015 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (体积比 85 : 15) 作为流动相; 流速为 1.5 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 以保留时间定性, 待液相色谱稳定后进样分析, 以峰面积定量。

1.3.2 样品制备 称取新鲜小白菜、番茄样品各 4.00 g, 迅速剪碎后加入少量 3% 偏磷酸研磨制成匀浆, 用 3% 偏磷酸定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 过滤, 再吸取一部分滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 然后按“1.3.1”节色谱条件进行 HPLC 测定, 所得数值为还原型维生素 C 含量。脱氢型维生素 C 含量 = 维生素 C 总量 - 还原型维生素 C 含量, 前提是将样品中脱氢型维生素 C 还原为还原型维生素 C。因此, 另吸取 0.5 mL 滤液, 加入 1.00 mL 1% 二巯苏糖醇溶液 (DTT), 反应还原 0.5 h 后, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜进样, 同样按“1.3.1”节色谱条件进行测定, 所测数值为样品溶液中的总维生素 C 量。

1.3.3 线性关系分析 准确称取 50 mg 维生素 C, 用 1.5% 偏磷酸溶液定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 得到 500 mg/L 维生素 C 标准储备液; 将其逐级稀释得到 50、10 mg/L 标准溶液, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 调整进样量, 稀释得到 1、5、10、20、30、50、100、200、300、400、500 mg/L 系列浓度对应的峰面积, 以峰面积的积分值对进样浓度 (mg/L) 进行直线回归。

1.3.4 精密度试验 取所制得样品 4 个, 重复进样 5 次, 测定维生素 C 含量的精密度。

1.3.5 回收率试验 采用加标回收法, 取 2.00 mL 匀浆样品, 分别加入 2.00 mL 浓度为 50、100、500 mg/L 的维生素 C 标准品, 重复进样 3 次, 取 3 次测定的平均值作为测定结果。将测定结果扣除样品溶液的测定值, 从而得到加入标准物质的回收率, 其计算公式为:

回收率 = (加标试样测定值 - 试样测定值) / 加标量  $\times 100\%$ 。

1.3.6 最低检测限的计算 以产生 3 倍仪器噪声水平的进样量为检出限。

## 2 结果与分析

### 2.1 维生素 C 提取剂的选择

考察不同提取剂 (3% 草酸、3% 偏磷酸) 对维生素 C 峰型的影响, 结果表明: 当选择 3% 草酸作为本研究蔬菜样品提取剂时, 出现维生素 C 峰尖圆滑不尖锐、基线不平等现象; 而以 3% 偏磷酸作为提取剂能够得到更好的峰形 (图 1), 因此选择 3% 偏磷酸作为蔬菜样品提取剂。

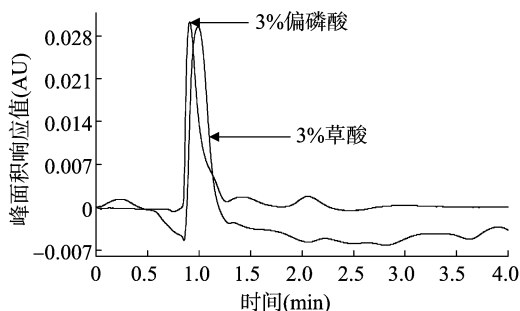


图1 不同提取剂的维生素C色谱结果比较

### 2.2 流动相的选择

考察乙腈 - 0.015 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  不同比例 (体积比

50 : 50, 75 : 25, 85 : 15) 对检测时维生素 C 的峰形、保留时间等出峰情况的影响。结果表明: 当选择乙腈 - 0.015 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (体积比 85 : 15) 作为流动相时, 不仅出峰时间提前, 峰形也更好, 也不存在峰形重叠等问题, 因此选择乙腈 - 0.015 mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (体积比 85 : 15) 作为流动相。

### 2.3 色谱条件的选择

用 Waters 2998 PAD 紫外检测器检测发现, 维生素 C 在 245 ~ 255 nm 波长下吸光度较高, 在 254 nm 吸光度最大, 因此选择 254 nm 作为检测波长。在超过样品的检测时间 (4 min) 后的 6 min 内, 没有发现有明显的信号强度, 因此确定样品检测时间为 4 min。由图 2 可以看出, 所有样品均能实现基线分离, 而且峰形能满足测定要求, 维生素 C 的保留时间为 0.866 ~ 0.929 min, 检测限为 0.86  $\mu\text{g/L}$ 。

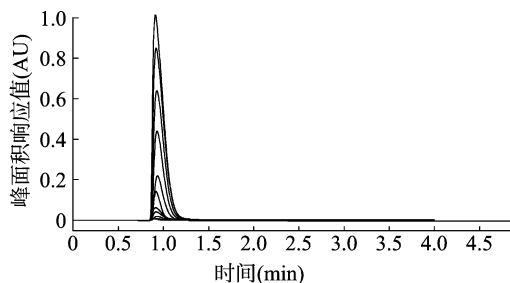


图2 维生素C标准样品色谱结果

### 2.4 标准工作曲线

以 1、5、10、20、30、50、100、200、300、400、500 mg/L 系列浓度对应峰面积的积分值对进样浓度 (mg/L) 进行直线回归。以浓度 ( $x$ , mg/L) 为自变量、峰面积 ( $y$ ) 为因变量, 方程式:  $y = 16733x - 26203$ ,  $r = 0.9996$ , 说明标准曲线在 1 ~ 500 mg/L 范围内线性良好, 维生素 C 标准品的色谱结果见图 2, 标准曲线见图 3。

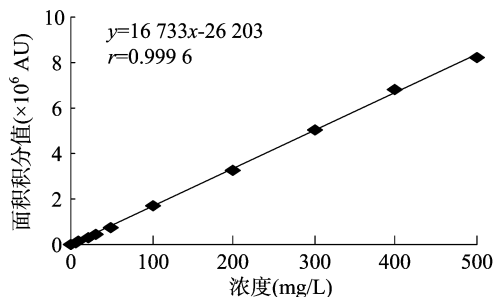


图3 维生素C标准曲线

### 2.5 蔬菜中维生素 C 含量的测定

由图 4、图 5 可以看出, 经过 DTT 的还原, 总维生素 C 的峰高于还原型维生素 C。由表 1 小白菜、番茄中还原型维生素 C、总维生素 C、氧化型维生素 C 的检测结果可见, 各提取液中维生素 C 的保留时间在 0.898 ~ 0.995 min。

### 2.6 精密度试验

对同一小白菜、番茄提取液分别连续进样 5 次, 由表 2 可见, 精密度试验标准差为 0.49 ~ 3.29, 变异系数为 0.63% ~ 1.83%, 表明该方法重现性较好。

### 2.7 回收率试验

各取 3 份 2 mL 维生素 C 含量为 25.106 mg/kg 的小白菜

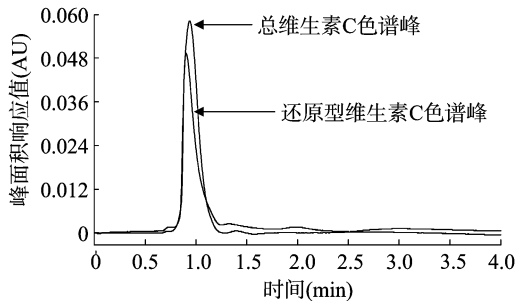


图4 小白菜提取液色谱结果

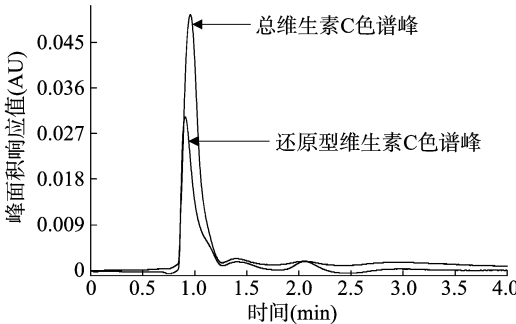


图5 番茄提取液色谱结果

表 1 蔬菜中维生素 C 含量的测定结果

样品	维生素 C 含量( mg/100 g )		
	还原型	氧化型	总和
小白菜	62.297	211.092	273.390
番茄	45.888	151.518	197.406

注:表中检出量为 5 次平行测定结果的平均值。

提取液、维生素 C 含量为 18.248 mg/kg 的番茄提取液,分别加入 2 mL 不同浓度的维生素 C 标准液,测定混合液中维生素 C 含量,每种混合液测定 3 次,取其平均值。由表 3 可见,回收率范围为 96.58% ~ 103.59%,平均回收率为 99.89%。

3 讨论与结论

维生素 C 在 pH 值 >7.6 以上的溶液中非常不稳定,但是在 pH 值 <4 的酸性溶液中较稳定,3% 草酸、3% 偏磷酸皆满足 pH 值 <4 的要求。已有研究以 0.1 mol/L 盐酸、3% 偏磷酸、3% 草酸、3% 三氯乙酸为提取剂,考察 24 h 内维生素 C 的稳定性,结果发现 3% 偏磷酸结果较为理想,3% 草酸稍弱<sup>[19]</sup>;另有试验也比较了 3% 偏磷酸、3% 草酸、0.03 mol/L 盐酸 3 种提取液的提取效果,结果表明,因偏磷酸具有明显的沉淀蛋白质和保护维生素作用,使其提取效果更为理想<sup>[20]</sup>。由于偏

表 2 精密度试验结果

样品	维生素 C 含量( mg/100 g )					标准差 ( mg/100 g )	变异系数 ( % )
	进样 1	进样 2	进样 3	进样 4	进样 5		
小白菜还原型维生素 C	62.43	62.12	61.80	62.07	63.07	0.49	0.78
小白菜总维生素 C	270.57	271.40	277.30	271.05	276.63	3.29	1.20
番茄还原型维生素 C	44.58	45.60	46.50	46.07	46.69	0.84	1.83
番茄总维生素 C	196.71	196.83	196.52	199.54	197.44	1.24	0.63

表 3 回收率试验结果

样品	样品提取液维生素 C 含量( mg/kg )	加标量 ( mg/kg )	测定值 ( mg/kg )	回收率 ( % )
小白菜	25.106	50.00	76.899	103.59
	25.106	100.00	127.887	102.78
	25.106	500.00	522.945	99.57
番茄	18.722	50.00	67.450	97.46
	18.722	100.00	118.092	99.37
	18.722	500.00	501.614	96.58

注:表中检出量均为 3 次平行测定的平均值。

磷酸与维生素 C 的这些特点,本研究采用 3% 偏磷酸提取番茄、小白菜中的维生素 C 后,其峰形更为尖锐、基线相对平稳,可见以 3% 偏磷酸作为提取剂能够得到更好的峰形。但是,由于偏磷酸不稳定,需要现配现用才能保证提取效果。

利用高效液相色谱与二硫苏糖醇还原维生素 C 相结合,对小白菜、番茄的还原型维生素 C、总维生素 C 含量进行测定。结果表明,新鲜小白菜中含有还原型维生素 C 含量为 62.297 mg/100 g,总维生素 C 含量为 273.390 mg/100 g;新鲜番茄中还原型维生素 C 含量为 45.888 mg/100 g,总维生素 C 含量为 197.406 mg/100 g。总维生素 C、还原型维生素 C 二者之差为脱氢型维生素 C,本研究中小白菜、番茄的脱氢型维生素 C 含量分别为 211.092、151.518 mg/100 g。可以看出,在本研究的小白菜、番茄中,脱氢型维生素 C 含量在总维生素 C 含量中占很大的比重,而脱氢型维生素 C 与还原型维生素 C 同样具有生理功能,对人体健康的贡献不可忽视。本研

究认为,只利用高效液相色谱法测定的还原型维生素 C 不足以说明蔬菜中维生素 C 的营养状态,应利用二硫苏糖醇的还原作用,得到的总维生素 C 含量更能表征蔬菜的营养价值。

本研究标准工作曲线的相关系数  $r=0.999\ 6$ ,曲线在 1 ~ 500 mg/L 范围内线性良好,说明曲线的线性关系较好,且测定浓度范围较广,分析中受样品中其他杂质的影响较小。测定小白菜、番茄中维生素 C 的含量,回收率为 96.58% ~ 103.59%,说明该方法具有所需试剂少、稳定、操作简便等特点。从本研究还可以看出,精密度试验的相对标准偏差小于 2%,说明该方法重复性、再现性都是比较高的;而且从样品色谱图中看出,该方法分析维生素 C 的含量大约需要 3 min,具有灵敏、快速的特点。本研究所用的这个分析方法是可靠的,它适用于维生素 C 含量范围较大及颜色各异的广泛蔬菜中还原型维生素 C、总维生素 C 含量的测定。

参考文献:

[1]郝学宁,郝婧婧,刘雪莲. HPLC 法测定果蔬中维生素 C[J]. 现代农业科技,2011(3):30-31.  
[2]王立家,李宽阁,刘淑兰,等. 维生素 C 的营养功能及应用[J]. 畜牧兽医科技信息,2009(2):106-107.  
[3]余琼,齐卫华,于研,等. 维生素 C 保健功能的研究[J]. 黑龙江医药,2008,21(6):24-26.  
[4]王艳颖,姜国斌,胡文忠,等. 高效液相色谱法测定草莓中维生素 C 含量[J]. 大连大学学报,2006,27(2):21-22,26.

曹剑锋,任朝辉,芦静波,等. 矮冷水花成分预试验及不同溶剂提取物的抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):307-311.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.090

# 矮冷水花成分预试验及不同溶剂提取物的抗氧化活性

曹剑锋<sup>1,2</sup>, 任朝辉<sup>3</sup>, 芦静波<sup>4</sup>, 朱磊<sup>4</sup>, 梁志远<sup>1</sup>, 夏丽莎<sup>1</sup>

(1. 贵州师范学院贵州省生物资源开发利用特色重点实验室, 贵州贵阳 550018; 2. 贵州师范学院转化与分离研究所, 贵州贵阳 550018;  
3. 贵州师范大学, 贵州贵阳 550001; 4. 皖南医学院, 安徽芜湖 241002)

**摘要:**通过对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、·OH 的清除活性、还原力、螯合能力、总抗氧化能力的测定,评价矮冷水花水提取物、95%乙醇提取物及其石油醚相、乙酸乙酯相和水溶性 3 个不同极性部位的抗氧化活性;测定总黄酮、总酚含量;采用化学反应鉴别法对矮冷水花提取物进行化学成分预试验。预试验结果表明:矮冷水花可能含有酚类、鞣质、黄酮类、挥发油或油脂、氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、苷类、甾体、萜类内酯、香豆素及其苷类化学成分。试验结果表明:水提取物、95%乙醇提取物以及其石油醚相、乙酸乙酯相、水溶性部位提取物均表现出一定抗氧化活性,其中乙酸乙酯部位黄酮、总酚含量最高,分别为 28.43%、2.16%,清除 DPPH 自由基、·OH 的能力、还原力、螯合力及总抗氧化能力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.142、0.598、0.328、1.008、0.298 mg/mL,并且随着浓度的增加,清除活性增强。综合试验结果可知,矮冷水花提取物具有很好的抗氧化活性,乙酸乙酯部位抗氧化活性最强。

**关键词:**矮冷水花;化学成分;提取物;抗氧化活性;药用价值

**中图分类号:** S132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0307-05

矮冷水花 [*Pilea peploides* (Gaudich.) Hook. et Arn.] 属荨麻科,为一年生草本,别称地油仔、苔水花。矮冷水花分布于我国华东、西南等地,常被作为蔬菜食用,因具有清热解毒、祛痰止痛、消炎、褪肿、通便、利尿等功效,民间用于清热解毒祛

瘀止痛、跌打损伤、无名肿毒、毒蛇咬伤、疮疖等症<sup>[1]</sup>。陈谢生等研究矮冷水花并制成了适合防治多种毒蛇的蛇伤草药<sup>[2]</sup>;张浩等对矮冷水花进行了生药学鉴定研究<sup>[3]</sup>。有关矮冷水花的研究报道较少,本研究对矮冷水花的化学成分和对水提物、乙醇提取物不同萃取物抗氧化活性进行初步研究,以期对矮冷水花植物药用价值的开发应用提供一定参考。

收稿日期:2016-01-05

基金项目:贵州省科技厅自然科学基金(编号:黔科合 J 字[2013]2233);贵州师范学院博士基金(编号:12BS032);贵州省应用化学特色重点学科建设项目(编号:黔教科研发[2012]442);教育部生物资源科学专业综合改革试点项目(编号:2012287)。

作者简介:曹剑锋(1971—),男,甘肃天水人,博士,副教授,主要从事天然药物研究。Tel:(0851)85816647;E-mail:cj1266@126.com。

[5]梁建成,汪春红. 维生素 C 抗 DNA 损伤作用的研究进展[C]. 武汉:营养学会第十届学术会议论文摘要汇编,2004.

[6]龙宇红. 维生素 C、维生素 E 对生长期大鼠铅中毒保护作用的实验研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.

[7]孙不健. 维生素 C 对大鼠酒精性脑和肝损伤的保护作用研究[D]. 苏州:苏州大学,2011.

[8]徐琅,宋晓峰,钱志余. HPLC 法测定野生蔬菜中维生素 C 的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(34):19277-19278.

[9]赵昕梅,远凌威,陈世锋,等. 高效液相色谱法测定果蔬中维生素 C 含量[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版,2013,26(1):49-53.

[10]宁德生,梁小燕,方宏. 高效液相色谱法对罗汉果中 VC 含量的检测[J]. 食品科学,2010,31(20):311-313.

[11]裴云逸. 高效液相色谱法快速测定蔬菜中 Vc 含量的研究[J]. 食品与机械,2012,28(5):91-93,162.

[12]陈振挺,许开国,涂杰峰,等. 几种果蔬抗坏血酸的高效液相色谱分析[J]. 福建省农科院学报,1987,2(1):78-83.

[13]侯冬岩,回瑞华,刘晓媛,等. 苹果汁中 Vc 的 HPLC 分析及抗氧化性的测定[J]. 食品科技,2006,31(7):238-240.

[14]谷雪贤. 蔬果中维生素 C 含量的检测方法[J]. 广东化工,

## 1 材料与仪器

### 1.1 试验材料

矮冷水花,采自贵阳市乌当区,经贵州师范学院朱富寿教授鉴定为荨麻科植物矮冷水花 [*Pilea peploides* (Gaudich.)

2010,37(7):98.

[15]吴海燕. 微波提取高效液相色谱法测定花椰菜中的维生素 C [J]. 江苏农业科学,2014,42(4):256-257.

[16]甘振威,武广恒,刘国良,等. 自动电位滴定法和高效液相色谱法测定深颜色果蔬中维生素 C 浓度的比较[J]. 吉林大学学报:医学版,2014,40(2):441-445.

[17]Bergquist S A, Gertsson U E, Noadmark L Y, et al. Ascorbic acid, carotenoids, and visual quality of baby spinach as affected by shade netting and postharvest storage[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(21):8444-8451.

[18]Shohag M J I, Wei Y Y, Yang X. Changes of folate and other potential health-promoting phytochemicals in legume seeds as affected by germination[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(36):9137-9143.

[19]赵文君. HPLC 法检测有机酸和水溶性维生素的方法研究[D]. 南京:南京工业大学,2011.

[20]潘建国,王开发,郑尧隆,等. 高效液相色谱法同步测定花粉中的水溶性维生素[J]. 同济大学学报:自然科学版,2001,29(5):581-583.