

文章编号 :1003-8701(2014)02-0074-04

# 黑穗醋栗抗坏血酸含量测定方法的比较

李曙雷 ,霍俊伟 \* ,李芳晓 ,秦 栋 \*

(东北农业大学园艺学院 ,哈尔滨 150030)

**摘 要** :通过对钼蓝比色法、碘滴定法、2,6-二氯靛酚滴定法和高效液相色谱法等不同的测定抗坏血酸方法之间回收率、重复性以及精密度的比较,选出最佳的测定方法。结果表明,高效液相色谱法与其他方法相比,具有较好的线性关系和较高的回收率、精密度以及可重复性。

**关键词** :黑穗醋栗 ;抗坏血酸 ;含量 ;比较

中图分类号 :S663.9

文献标识码 :A

## Comparing of Methods for Determination of Ascorbic Acid Content of Black Currant

LI Shu-lei, HUO Jun-wei\*, LI Fang-xiao, QIN Dong\*

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract**: The recovery rate, repeatability and accuracy of determining ascorbic acid content by the molybdenum blue colorimetric method, iodine titration, 2, 6-two chlorine indigo phenol titration and high performance liquid chromatography were compared to select a optimal method. The results showed that: high performance liquid chromatographic method has a good linear relationship and high rate of recovery, precision and repeatability compared with other methods.

**Keywords**: Black currant; Ascorbic acid; Content; Comparison

抗坏血酸(Ascorbic Acid, AsA)即维生素 C,对于促进人体正常生长发育,提高人体对疾病的抵抗力等方面发挥着重要的作用,是正常的人体生命活动所必需的<sup>[1-2]</sup>。在果实中属于高丰度的小分子抗氧化物质,也是果品以及其他许多食品中的重要功能成分,对于植物的生长发育有着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

黑穗醋栗 (*Ribes nigrum* L.) 俗称黑加仑 (Black currant),属于虎耳草科(Saxifragaceae)茶藨子属(Ribes)。黑穗醋栗的营养物质含量极其丰富,尤其是 AsA 含量非常高<sup>[5]</sup>,仅次于猕猴桃,每 100 g 成熟鲜果中含有 100~300 mg。但是,在不同

的品种之间以及果实不同的成熟期,AsA 的含量差异很大,这就给黑穗醋栗中 AsA 的利用带来了诸多不便。

目前,对于水果中 AsA 含量的测定方法有很多种,主要包括:荧光分析法、2,4-二硝基苯肼法、2,6-二氯靛酚滴定法、高效液相色谱法、电位滴定法、紫外分光光度法、碘滴定法等。这些方法各有特点,但是,对于黑穗醋栗这样的有色果实中 AsA 含量的测定,尚没有一种准确有效的方法。本实验以黑穗醋栗果实为实验材料,首次利用高效液相色谱法对黑穗醋栗果实中的 AsA 含量进行测定,并对多种 AsA 含量测定方法进行比较,以期选出一种快速有效的 AsA 含量的测定方法,为黑穗醋栗中 AsA 的研究提供参考。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与仪器

本试验于 2011 年在东北农业大学进行,试材为 8 年生的黑穗醋栗品种布劳德、亚德和露得克,

收稿日期 :2013-08-03

基金项目 :东北农业大学博士启动基金(2010RBC21);农业部公益性行业专项基金(201103037);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511050)

作者简介 :李曙雷(1987-),男,在读硕士,主要从事果实品质分析及采后加工研究。

通讯作者 :霍俊伟,男,博士,教授, E-mail: junweihuo@yahoo.com.cn

秦 栋,男,博士,讲师, E-mail: dongq9876@126.com

于果实成熟期,在生长健壮的植株上随机采取成熟果,将同一品种混合后带回实验室进行抗坏血酸的测定。

仪器:T6新世纪紫外分光光度计,waters breeze™2 高效液相色谱仪;实验所用标准品购自 sigma 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 钼蓝比色法<sup>[6-7]</sup>

准确称取 5.0 g 样品,加入草酸 EDTA 溶液研磨成匀浆,转入容量瓶定容。取 10 mL 匀浆液经 3 000 g 离心 10 min 后,取上清液 1 mL 转入具塞刻度试管中,加草酸 -EDTA 4 mL、偏磷酸 - 乙酸 0.5 mL、50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 mL、5% 钼酸铵 2.0 mL,摇匀后,置于 30℃ 水浴中保温 15 min,在 760 nm 波长下比色,记录吸光度。计算公式如下:

$$V_c \text{ 含量}(\text{mg}/100 \text{ g} \cdot \text{FW}) = C \cdot V_t \cdot 100\% / V_s \cdot \text{FW}$$

其中,C:标准曲线上查的样品中 V<sub>c</sub> 含量(mg/100 g);V<sub>t</sub>:样品提取液总体积(mL);V<sub>s</sub>:测定时用样品提取液体积(mL);FW:鲜重(5.0 g)。

### 1.2.2 碘滴定法<sup>[8-9]</sup>

准确称取样品 5.0 g 放入研钵中,加 2% 的 HCl 研磨至匀浆,转入 100 mL 容量瓶中。用清洁干燥二层纱布过滤入干燥的烧杯中,滤液作测定用。

在 50 mL 的烧杯中,用移液管注入 1% 的 KI 0.5 mL,0.5% 淀粉液 2 mL,以及上述制得的试液 5 mL;再加蒸馏水至总体积 10 mL(加 2.5 mL)。用 0.001 M 的 KIO<sub>3</sub> 液滴定,滴定至微蓝并且 30 s 不褪色即为终点。计算公式如下:

$$V_c \text{ 含量}(\text{mg}/100 \text{ g} \cdot \text{FW}) = V \cdot 0.088 \cdot b \cdot 100 / B \cdot a$$

式中,V:滴定样品所用的 KIO<sub>3</sub> 毫升数;0.088:1 毫升 0.001 M 碘酸钾溶液相当的抗坏血酸的量(mg/mL);B:滴定时所用样品溶液毫升数;b:制成样品液的总毫升数;a:样品的克数。

### 1.2.3 2,6-二氯靛酚滴定法<sup>[10-11]</sup>

准确称取样品 5.0 g 放入研钵中,加入 2% 的草酸研磨至匀浆,转入 100 mL 容量瓶中定容。取 10 mL 离心后,加入白陶土吸附色素,过滤后用已经标定的 2,6-二氯靛酚滴定,直至溶液变成粉红色,并且 30 s 内不褪色即为滴定终点。同时,用 10 mL 2% 的草酸做空白对照试验。计算公式如下:

$$V_c \text{ 含量}(\text{mg}/100 \text{ g} \cdot \text{FW}) = (V_1 - V_2) \cdot K \cdot V \cdot 100 / W \cdot V_3$$

式中,V<sub>1</sub>:滴定样品液所用去染料体积(mL);V<sub>2</sub>:滴定空白所用去染料体积(mL);V<sub>3</sub>:样品测定

时所用滤液体积(10 mL);K:1 mL 染料氧化维生素 C 的量(mg);W:称取样品重量(5.0 g)。

### 1.2.4 高效液相色谱法<sup>[12-13]</sup>

用标准 AsA 制作标准曲线后,准确称取样品 5.0 g,加草酸后研磨至匀浆,转入 100 mL 容量瓶中并定容。抽滤,用一次性微孔滤膜打入进样瓶中,4℃ 冰箱保存待测。每个样品重复 5 次,根据标准曲线,计算出 AsA 的含量,求平均值。

色谱条件:流动相为 0.1% 的草酸,经 0.45 μm 滤膜过滤后超声,流速为 1.0 mL/min;检测波长 254 nm,进样 10 μL,柱温为室温。

## 2 结果与分析

### 2.1 回收率

测定方法是否准确、可靠,可以通过回收率来反映。从表中可以看出,4 种方法测得的回收率以高效液相法为最高,钼蓝比色法次之,碘滴定法和 2,6-二氯靛酚滴定法较低。对数据进行显著性差异分析,结果显示,用 4 种方法测定的 3 种黑穗醋栗果实 AsA 含量的回收率都达到了显著水平。

表 1 4 种方法测定的黑穗醋栗果实 V<sub>c</sub> 含量的回收率

测定方法	回收率(%)		
	布劳德	亚德	露得克
钼蓝比色法	84.29**	87.36**	90.33**
碘滴定法	79.35	91.88	85.47
2,6-二氯靛酚滴定法	81.59**	78.30**	89.52**
高效液相色谱法	98.64**	99.61**	98.79**

注:\*\* 显著水平 α=0.05。

### 2.2 含量对比

表 2 4 种方法测定的黑穗醋栗果实 AsA 的含量

测定方法	AsA 的含量(mg/100 g)		
	布劳德	亚德	露得克
钼蓝比色法	134.79**	185.33**	247.59**
碘滴定法	119.34	169.45	219.37
2,6-二氯靛酚滴定法	95.33	157.82	186.37
高效液相色谱法	155.07**	204.15**	279.28**

注:\*\* 显著水平 α=0.01。

从表 2 中可以看出,4 种方法中,用高效液相色谱法测得的黑穗醋栗果实中 AsA 含量最高,布劳德、亚德、露得克 3 个品种的 AsA 含量分别为 155.07 mg/100 g、204.15 mg/100 g、279.28 mg/100 g。其次为钼蓝比色法,分别为 134.79 mg/100 g、185.33 mg/100 g、247.59 mg/100 g。碘滴定法居第三,分别为 119.34 mg/100 g、169.45 mg/100 g、219.37 mg/100 g。

2,6-二氯酚酞滴定法,分别为 95.33 mg/100 g、157.82 mg/100 g、186.37 mg/100 g。对数据进行显著性差异分析,结果表明,4 种方法测得的 3 种黑

穗醋栗果实中 AsA 含量的差异都达到了极显著水平。

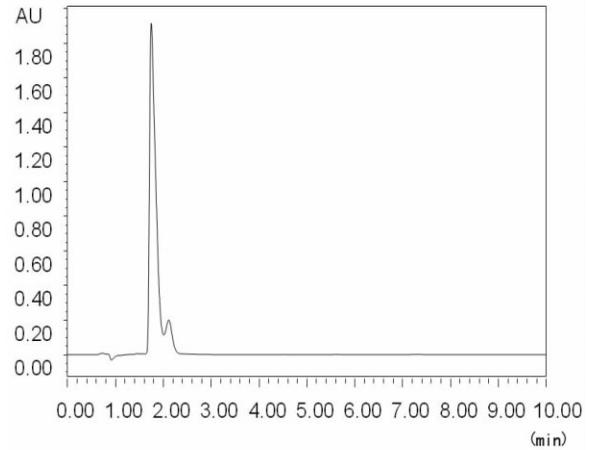
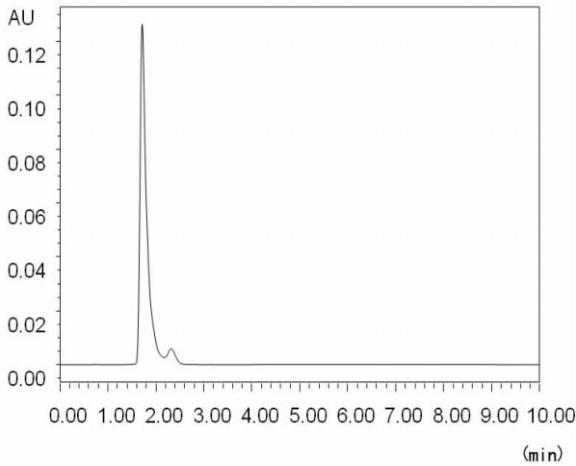


图 1 高效液相色谱法测定 AsA 标准液与样品液

### 3 讨论与结论

本研究中分别采用了 2,6-二氯酚酞滴定法、碘滴定法、钼蓝比色法和高效液相色谱法 4 种方法,对黑穗醋栗 3 个品种布劳德、亚德和露得克果实中的 AsA 含量进行了测定。其中,2,6-二氯酚酞滴定法、碘滴定法和钼蓝比色法都需要 AsA 与不同的药品反应后,通过间接的方法来测定 AsA 的含量,这就有可能受反应进行程度的影响。而高效液相色谱法是通过直接检测的方法测定样品中 AsA 的含量,与其他 3 种方法相比,AsA 没有参与化学反应,减少了中间过程对最后测定结果的影响。

由于成熟的黑穗醋栗中含有丰富的花青素等色素,所以成熟的果实呈现浓郁的深紫黑色,AsA 提取液也有较深的颜色,因此在采用 2,6-二氯酚酞滴定法和碘滴定法进行测定时,滴定终点的判断受到很大的影响<sup>[15]</sup>。虽然在试验中可以采用加入活性炭或者白陶土的方法进行脱色处理,但是,加入活性炭进行吸附色素的同时也会吸附 AsA,会使测定结果偏小<sup>[16]</sup>。而加入白陶土则不会吸附 AsA,同样白陶土也不会把色素吸附完全,因此依然存在滴定终点判断不准确的问题,而且还会影响测定结果。在采用钼蓝比色法时,磷酸盐被还原剂 AsA 还原后,生成亮蓝色的钼蓝络合物,同样会与深紫红色的样品提取液相互掩盖颜色,缺点仍然明显。

高效液相色谱法是近年来发展起来的一种新型的分离分析技术,具有高柱效、高灵敏度、高选

择性、分析速度快和应用范围广的特点,从本试验中可以看出,高效液相色谱法另一个优点是不受样品液颜色的影响,即不需要对样品液进行脱色处理,直接就可以测定出样品中 AsA 的含量,而且峰形良好(图 1)。从图中可以看出,试样与标准样的保留时间一致,而且基本没有杂峰。在本方法中没有特殊试剂,样品处理简单,操作简便,无需脱色,减少了试验过程中 AsA 的损失,准确度高。而且结果的重现性好,准确度和回收率高。

由于 AsA 极其不稳定,易分解,因此整个试验要求操作迅速,防止 AsA 的氧化。本试验中,除必要的步骤外,其余时间样品均保存在冰箱里,减少了 AsA 的氧化损失,保证了结果的准确性。

#### 参考文献:

- [1] 马春花. 干旱胁迫和衰老过程中苹果抗坏血酸代谢的研究[D]. 西北农林科技大学, 2007.
- [2] 马玉华. 逆境胁迫对苹果抗坏血酸代谢相关酶活性及基因表达的影响[D]. 西北农林科技大学, 2007.
- [3] 李明军. 苹果和猕猴桃抗坏血酸形成与积累的生理和分子机理研究[D]. 西北农林科技大学, 2007.
- [4] 邹礼平. 番茄抗坏血酸生物合成与代谢途径中相关酶基因的克隆与调控[D]. 华中农业大学, 2005.
- [5] 霍俊伟, 李著花, 秦 栋. 黑穗醋栗营养成分和保健功能及产业发展前景[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 139-144.
- [6] 宁正祥, 赵谋朋, 祁荣泽. 新鲜果蔬保健作用的探讨[J]. 营养学报, 1992, 14 (3): 260-265.
- [7] 刘绍俊, 牛 英, 刘冰浩, 等. 钼蓝比色法测定沙田柚果肉中还原型维生素 C 含量的研究[J]. 北方园艺, 2011(1): 8-12.
- [8] 柯德森, 孙谷畴, 王爱国, 等. 抗坏血酸与种子萌发的关系[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 497-500.
- [9] 叶 青, 江志波. 酸碱滴定法与碘滴定法测定维生素 C[J]. 知识与经验, 2007, 43(5): 410-412.

- [10] 赵晓梅,江英,吴玉鹏,等.果蔬中V<sub>c</sub>含量测定方法的研究[J].食品科学,2006,27(3):197-198.
- [11] 陈秀云,李湘鸣.两种维生素C测定方法的比较[J].现代预防医学,2004,31(3):448-449.
- [12] 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(4):252-253.
- [13] 胡应杰,潘康标,陈昌云,等.高效液相色谱法测定辣椒中维生素C的含量[J].南京晓庄学院学报,2008(11):30-32.
- [14] 张红梅,温中平,田俊学.高效液相色谱法测定沙棘中维生素C的含量[J].国际沙棘研究与开发,2004(9):21-23.
- [15] 阎树刚,韩涛.果蔬及其制品中维生素C测定方法的评价[J].Chinese Agricultural Science Bulletin,2002,18(4):110-112.
- [16] 杜鹏飞,杨国慧.树莓果实维生素C含量测定方法的研究[J].东北农业大学学报,2009,40(2):31-33.

(上接第64页)

- [2] 张学敏,杨集昆,谭琦.食用菌病虫害防治[M].北京:金盾出版社,1994.
- [3] 罗远蝉,张道敬,魏鸿刚,等.多粘类芽孢杆菌农用活性研究进展[A].第四届中国植物细菌病害学术研讨会论文集[C].杭州,2008:59-60.
- [4] 李波,孙思,王翠颖,等.多粘类芽孢杆菌对木麻黄青枯病的抑菌防病作用[J].林业科技开发,2012,26(3):65-67.
- [5] 齐爱勇,赵绪生,刘大群.芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J].中国农学通报,2011,27(12):277-280.
- [6] 孙卉.枯草芽孢杆菌对扩展青霉的抑制特性及其活性物质研究[D].西北农林科技大学,2009.
- [7] 刘雪,穆常青,蒋细良,等.枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用[J].中国生物防治,2006,22(增刊):179-184.

(上接第70页)基因进行基因累加,达到广谱抗病的效果,延缓抗病品种感病化的进程。

参考文献:

- [1] 李杨,王耀雯.水稻稻瘟病菌研究进展[J].广西农业科学,2010,41(8):789-792.
- [2] 雷财林,凌忠专.北方稻区稻瘟病菌生理小种变化与抗病育种策略[J].作物杂志,2000(3):14-16.
- [3] 刘伟.水稻稻瘟病抗性的研究进展[J].中国稻米,2010,16(5):32-35.
- [4] 孙国昌,杜新法.水稻稻瘟病防治研究进展和21世纪初研究设想[J].植物保护,2000(26):33-35.
- [5] 雷财林,张国民.黑龙江省稻瘟病菌生理小种毒力基因分析与抗病育种策略[J].作物学报,2011,37(1):18-27.
- [6] 刘永峰,陈志谊.2001-2010年江苏省稻瘟病菌种群变化分析[J].江苏农业科学,2010,26(6):1233-1237.
- [7] 郭晓莉.吉林省稻瘟病菌生理小种的分布与消长动态[J].吉林农业科学,2009,34(3):33-35.
- [8] 陆凡.江苏省稻瘟病菌生理小种的演变及与水稻品种的相互关系[J].南京农业大学学报,1999,22(4):31-34.
- [9] 全国稻瘟病生理小种联合实验组.我国稻瘟病菌生理小种研究[J].植物病理学报,1980,10(2):71-82.