

# 阻抑动力学分光光度法快速测定 保健品中的维生素 C

刘 瑛<sup>1</sup>, 田志壮<sup>2</sup>, 朱逸雯<sup>1</sup>, 姜子卿<sup>1</sup>, 商少明<sup>1</sup>

(1.江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2.郑州轻工业学院材料与化学工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 研究保健品中 VC 含量的快速测定方法。以 Fe(II)为催化剂、双氧水为氧化剂, 在酸性介质中将无色的邻苯二胺溶液迅速氧化成橙红色溶液, 该产物于 450nm 波长处有最大吸收。结果表明, VC 对该反应有显著抑制作用, 当 VC 加入到反应体系中时, 产物的吸光度明显下降, 产物于 450nm 波长处的吸光度随着加入到体系中的 VC 浓度的增加而线性降低, 线性范围为  $4.0 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-4}$  mol/L。本方法操作简单、成本低、选择性好、结果准确, 适合保健品中 VC 的快速测定。

**关键词:** 邻苯二胺; 分光光度法; 过氧化氢; 硫酸亚铁; 维生素 C

## Rapid Inhibitory Kinetic Spectrophotometric Determination of Vitamin C in Healthcare Products

LIU Ying<sup>1</sup>, TIAN Zhi-zhuang<sup>2</sup>, ZHU Yi-wen<sup>1</sup>, JIANG Zi-qing<sup>1</sup>, SHANG Shao-ming<sup>1</sup>

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou Institute of Light University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to explore a rapid determination method for vitamin C in healthcare products, colorless *o*-phenylenediamine (*o*-PD) solution was subjected to oxidation to form a soluble orange-red product by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the oxidant and Fe(II) as the catalyst in an acidic environment. The maximum absorbance of the product was located at 450 nm. However, ascorbic acid exhibited an obvious inhibitory effect on that reaction system and could result in the decreased absorbance of the product. The reduction of the absorbance was inversely proportional to the concentration of ascorbic acid in the linear range of  $4.0 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-4}$  mol/L, which was suitable for the rapid determination of vitamin C in healthcare products with the advantages including convenient operation, low-cost reagents and instruments, high selectivity and high accuracy.

**Key words:** *o*-phenylenediamine; spectrophotometry; hydrogen peroxide; ferrous sulfate; vitamin C

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0251-03

VC 又称抗坏血酸, 能维持正常的新陈代谢以及骨骼、肌肉和血管的正常生理功能, 增强机体的抵抗力<sup>[1]</sup>。在测定 VC 的国标方法中, 荧光法为测定食物中 VC 含量的第一标准方法<sup>[2-4]</sup>, 2,4-二硝基苯肼法<sup>[3]</sup>为第二标准方法。荧光法是将还原型抗坏血酸经活性炭或 2,6-二氯酚靛酚氧化为脱氢抗坏血酸, 然后与邻苯二胺反应生成有荧光的喹啉, 其荧光强度与抗坏血酸的浓度在一定条件下呈正比, 该法操作简单、快速, 但要用到比较昂贵的荧光光度计; 2,4-二硝基苯肼法是用活性炭将还原型抗坏血酸氧化为脱氢抗坏血酸, 再与 2,4-二硝基苯肼作用生成红色脎, 根据脎在硫酸溶液中的含量与抗坏血酸含量呈正比, 进行比色测定, 该法仪器成本低, 但显色时间长(大于 3h), 且显色后要用 85% 的硫

酸处理, 操作繁琐, 不能满足快速分析的要求。本实验拟建立一种快速测定 VC 的可见光分光光度法, 该法基于对邻苯二胺显色反应的抑制作用, 对还原型抗坏血酸进行直接测定, 无需活性炭或 2,6-二氯酚靛酚对其进行氧化, 方法简单易行。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

艾兰得 VC 含片(VC 的标示值为 60mg) 常州亚邦君达莱生物科技有限公司。

0.10mol/L 邻苯二胺标准溶液, 现用现配; 0.10mol/L 双氧水标准贮备液, 棕色瓶中避光保存, 每次使用前

收稿日期: 2010-08-01

作者简介: 刘瑛(1971—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为分析化学。E-mail: kusao@sina.com

稀释至所需浓度; 0.010mol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液, 棕色瓶中避光保存; 1.0mol/L 盐酸贮备液, 每次使用时稀释成 0.10mol/L; 0.010mol/L 抗坏血酸溶液, 用时稀释至所需浓度; 试剂均为分析纯, 实验用水为蒸馏水。

## 1.2 仪器与设备

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 数显恒温水浴锅 上海跃进医疗器械厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 邻苯二胺的显色反应

于 25mL 容量瓶中依次加入 HCl 溶液, 邻苯二胺溶液,  $\text{FeSO}_4$  溶液和过氧化氢溶液各若干毫升后, 加水定容, 置于一定温度的水浴中反应一段时间, 既得橙红色产物。以蒸馏水为参比, 测产物的吸收光谱或 450nm 处的吸光度。

### 1.3.2 抗坏血酸标准曲线的绘制

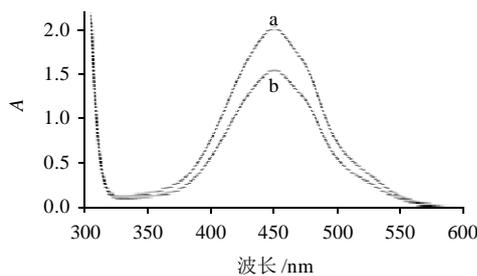
按优化条件, 于 25mL 容量瓶中依次加入一定量的 HCl 溶液, 邻苯二胺溶液,  $\text{FeSO}_4$  溶液, 抗坏血酸标准溶液及过氧化氢溶液后, 加水定容, 置于 20℃ 水浴中反应 20min。以蒸馏水为参比, 测产物于 450nm 的吸光度。以吸光度对抗坏血酸浓度作图既得标准曲线。

### 1.3.3 样品测定

取含片样品 1 片, 溶于水, 过滤, 滤液转移至 100mL 容量瓶, 稀释, 定容, 得样品溶液。用 1.0mL 样品溶液代替 1.3.2 节中的抗坏血酸标准溶液, 并按实验方法 1.3.2 节进行实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 吸收曲线



a.  $\text{HCl}+o\text{-PD}+\text{H}_2\text{O}_2+\text{Fe}(\text{II})$ ; b.  $\text{HCl}+o\text{-PD}+\text{H}_2\text{O}_2+\text{Fe}(\text{II})+\text{VC}$ 。

图1 吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra

在强氧化剂过氧化氢和催化剂硫酸亚铁的作用下, 无色的邻苯二胺溶液常温下迅速被氧化成橙红色的吩嗪类化合物<sup>[5]</sup>。将含 0.010mol/L HCl、0.010mol/L 邻苯二胺、0.30mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、0.60mmol/L 过氧化氢的混合液于 20℃ 水浴中反应 20min 后, 测量产物的吸收光谱(图 1 曲线 a)。在同一反应体系中加入 0.060mmol/L 的抗坏血酸溶液, 于 20℃ 水浴中反应 20min 后, 测量产物的吸

收光谱(图 1 曲线 b)。比较曲线 a 和 b 可知, 加入抗坏血酸不会改变吸收光谱的形状, 二者均于 450nm 处出现最大吸收, 说明抗坏血酸的加入没有改变产物的结构; 但是加入抗坏血酸后, 产物的吸光度明显下降, 这是由于抗坏血酸为典型的抗氧化剂<sup>[6-8]</sup>, 能抑制过氧化氢的氧化能力, 从而使产物的产量降低, 吸光度降低。

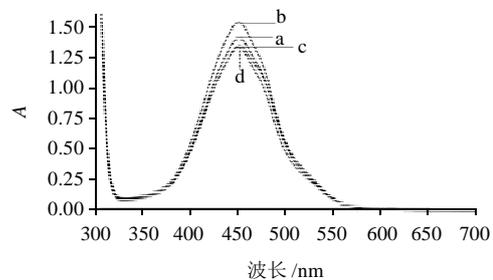
### 2.2 最佳显色条件的确定

本实验对抗坏血酸的测定基于抗坏血酸对邻苯二胺氧化反应的抑制, 在抗坏血酸的加入前, 邻苯二胺氧化产物的吸光度越高, 则测定抗坏血酸的灵敏度就越高。因此在不加抗坏血酸的情况下, 首先探讨了实验条件对邻苯二胺产物吸光度的影响。

#### 2.2.1 反应介质的影响

采用盐酸作为反应介质, 探讨盐酸浓度分别为  $1.0 \times 10^{-4}$ 、 $1.0 \times 10^{-3}$ 、0.010、0.030、0.10、0.30、1.0mol/L 时对反应的影响。结果表明, 当盐酸浓度低于  $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 时, 有沉淀生成; 当盐酸浓度在  $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内时, 产物为浅黄色溶液; 当盐酸浓度值高于 0.010mol/L 时, 产物为在可见光区有强吸收的橙红色溶液。测量不同酸度下产物的吸收光谱, 发现氧化产物的吸收光谱随着盐酸浓度的增加而发生红移, 且相应的吸光度也发生变化。当盐酸为 0.010mol/L 时, 产物的吸光度最大。因此, 选择 0.010mol/L 盐酸溶液为最佳反应介质。

#### 2.2.2 催化剂的影响



a. 0.15mmol/L; b. 0.30mmol/L; c. 0.65mmol/L; d. 1.0mmol/L。

图2 不同 Fe(II) 浓度时的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra at various concentrations of Fe(II)

实验发现, 当在反应体系中只加双氧水而不加 Fe(II) 时, 反应极其缓慢; 当不加双氧水、只加入 Fe(II) 时, 没有反应发生; 而当双氧水和 Fe(II) 同时加入时, 反应立即发生, 溶液迅速变为稳定的橙红色。究其原因, Fe(II) 与过氧化氢混合得到具有强氧化性的 Fenton 试剂<sup>[9]</sup>。Fenton 试剂之所以具有非常高的氧化能力, 是因为在 Fe(II) 的催化作用下, 过氧化氢的分解活化能低 (34.9kJ/mol), 能够分解产生羟自由基。同其他一些氧化剂相比, 羟自由基具有更高的氧化电极电位<sup>[10-12]</sup>, 因而能迅速氧化邻苯二胺。

固定 HCl 和邻苯二胺浓度均为 0.010mol/L, 过氧化氢浓度 0.50mmol/L, 反应温度 20℃, 反应时间 20min, 考

察不同 Fe(II) 浓度对反应产物的影响, 结果见图 2。由图 2 可知, 当 Fe(II) 浓度从 0.15mmol/L 增加到 0.30mmol/L 时, 产物于 450nm 波长处的吸光度快速增加; Fe(II) 的浓度增加到 1.0mmol/L 时, 吸光度急剧下降, 得到的产物颜色相应变浅, 可能是由于过量的 Fe(II) 与双氧水反应生成过多的羟自由基, 导致部分产物发生降解。因此, 采用 0.30mmol/L 的 Fe(II) 溶液作为催化剂开展后续实验。

### 2.2.3 反应温度和反应时间的影响

固定其他反应条件, 考察反应温度对产物吸光度的影响。结果表明, 温度增高, 产物的吸收曲线的形状不变, 这是因为温度只改变了氧化反应的速度, 而不影响产物的结构。当反应温度从 20℃ 增加到 80℃ 时, 产物的吸光度也相应增加, 但增幅并不显著。从绿色化学的角度考虑, 选择 20℃ 为最佳反应温度。

固定其他反应条件, 考察反应时间对产物吸光度的影响。结果表明, 当反应时间小于 20min 时, 产物的吸光度随着反应时间的增加而增加; 但是当反应时间大于 20min 后, 吸光度不再变化。因此选择 20min 为最佳反应时间。

### 2.2.4 过氧化氢浓度的影响

固定 HCl 和邻苯二胺浓度均为 0.010mol/L、FeSO<sub>4</sub> 0.30mmol/L、反应温度 20℃、反应时间 20min, 考察双氧水浓度对产物的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 当双氧水用量大于 0.60mmol/L 时, 曲线的吸光度变化趋于平缓, 且过高的双氧水浓度会导致产物中出现橙红色针状物质。故选择 0.60mmol/L 的双氧水浓度为最佳氧化剂用量。

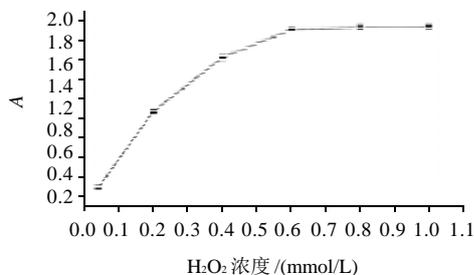


图 3 双氧水浓度与产物吸光度关系

Fig.3 Relationship between the absorbance of the product and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.3 抗坏血酸的标准曲线

抗坏血酸为高效的羟自由基清除剂, 将其加入到含有 Fenton 试剂的反应体系中, 会消耗 Fenton 体系产生的羟自由基, 从而抑制产物的生成, 导致产物的吸光度下降, 产物的吸光度随着抗坏血酸浓度的增加而线性下降, 线性范围为  $4.0 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-4}$  mol/L, 线性回归方程为  $A = -5.6909c + 1.8814$ , 线性相关系数  $R^2 = 0.9977$ 。

### 2.4 干扰实验

在选定的实验条件下, 对  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 抗坏血酸的测定, 在相对误差不超过 5% 的前提下, 得到各干扰物质的共存倍数为: Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>(10),

K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>(2000), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(1000), SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Br<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>(100), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>(50), NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(20), 尿素、山梨醇、葡萄糖(200), 天门冬酰苯丙氨酸甲酯(300)。干扰实验结果表明, 对于组成简单的 VC 含片样品, 在过滤分离掉不溶的硬脂酸镁后, 可直接测定。

### 2.5 样品测定

采用 1.2.3 节方法, 对样品做 5 次平行测定, 将吸光度代入线性回归方程中, 求得样品溶液中抗坏血酸的平均含量为  $1.35 \times 10^{-4}$  mol/L、相对标准偏差为 2.7%。分别于样品溶液中加入  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 抗坏血酸标准溶液 2.5mL, 进行加标回收实验, 回收率为 98%~102%。样品分析结果见表 1。

根据抗坏血酸的相对分子质量及平均含量  $1.35 \times 10^{-4}$  mol/L, 可求得每片样品含 VC 59.4mg, 相对于产品标示值(60mg)的相对误差是 1.0%。

表 1 样品分析结果

Table 1 Results of sample analysis

实验号	实测值 / (mol/L)	加入量 / (mol/L)	加标后测得值 / (mol/L)	回收率 %
1	$1.36 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.37 \times 10^{-4}$	101.0
2	$1.32 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.30 \times 10^{-4}$	98.0
3	$1.39 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.39 \times 10^{-4}$	100.0
4	$1.35 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.37 \times 10^{-4}$	102.0
5	$1.33 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.35 \times 10^{-4}$	102.0

注: 实测值指的是按照 1.3.2 节配制的 25mL 样品溶液中的 VC 浓度。

## 3 结论

利用抗坏血酸对邻苯二胺氧化反应的抑制效应, 建立了快速检测抗坏血酸的可见光分光光度法。该体系有望推广到其他抗氧化剂如 VE、类胡萝卜素、黄酮类物质等的测定, 有关该体系的应用拓展研究正在进行中。

### 参考文献:

- NAIDU K A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview[J]. Nutrition Journal, 2003, 2(7): 7-16.
- 国家标准化管理委员会. GB/T 9695.29—2008 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- 国家标准化管理委员会. GB/T 5009.86—2003 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 卫生部. GB 5413.18—2010 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 焦奎, 孙刚, 张书圣. OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP 伏安酶联免疫分析体系酶催化反应的研究[J]. 中国科学: B 辑, 1998, 28(2): 157-163.
- CARR A C, FREI B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 69(6): 1086-1107.
- 赵艳红, 李建科, 李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 64-69.
- GUO Qingqing, JI Shujun, YUE Qiaoli, et al. Antioxidant sensors based on iron diethylenetriaminepentaacetic acid, hematin, and hemoglobin modified TiO<sub>2</sub> nanoparticle printed electrodes[J]. Anal Chem, 2009, 81(13): 5381-5389.
- LLOYD R V, HANNA P M, MASON R P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 22(5): 885-888.
- FANG Yanfen, DENG Anping, HUANG Yingping. Determination of hydroxyl radical in Fenton system[J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20(10): 1235-1240.
- 梁爱惠, 张南南, 蒋治良, 等. 银纳米微粒共振散射光谱法测定羟基自由基及其应用[J]. 中国科学: B 辑, 2008, 38(1): 35-42.
- 方艳芬, 黄应平, 陈和春, 等. 二氧化钛光催化体系中的羟基自由基的测定[J]. 分析化学, 2006(9): 83-86.