

· 化学与分析 ·

贵州刺梨中总维生素 C 及还原型维生素 C 含量 检测方法的建立与比较

周涛¹, 江维克^{1*}, 艾强¹, 郭培果²

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州科瑞特医药科技开发研究所, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 建立刺梨中具有品质特征的维生素 C 的含量测定方法, 测定不同产地刺梨的维生素 C。方法: 采用反相高效液相色谱法测定, DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸 (5:95) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长为 242 nm; 样品不经 DTT 还原直接测定还原型维生素 C; 经 DTT 还原后测定总维生素 C。结果: 测定还原型维生素 C 在 0.074 1 ~ 0.666 9 μg, $r=0.999 9$, 平均回收率为 102.64%, RSD 为 1.13%; 测定总维生素 C 在 0.050 3 ~ 0.804 0 μg, $r=0.999 9$, 平均回收率为 98.32%, RSD 为 1.12%。结论: 该方法可准确测定刺梨中还原型维生素 C 和总维生素 C 的含量。利用 HPLC 法检测贵州中山海拔、相似生境下的野生刺梨成熟果实发现, 维生素 C 含量差异不大, 平均含量在 1 142.11 g·L⁻¹。

[关键词] 刺梨; 维生素 C; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0037-04

HPLC Determination of Reduced and Total Vitamin C for *Rosa roxburghii* Tatt. in Guizhou province

ZHOU Tao¹, JIANG Wei-ke¹, AI Qiang¹, GUO Pei-guo²

(1. Guiyang Collage of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Guizhou Creat Institute of Pharmaceutical Science and Technology Development, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple, accurate method of HPLC to determine reduced and total vitamin C from *Rosa roxburghii*. **Method:** The method was developed with the condition as follows: DiamonsilTM C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), methanol-0.1% phosphoric acid (5:95) as the mobile phase with the speed of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 225 nm. Reduced and total vitamin C was detected before and after DTT reduction respectively. **Result:** The linear range of determination for reduced vitamin C was 0.074 1 ~ 0.666 9 μg ($r=0.999 9$) with the average recovery of 102.64%, RSD 1.13%, and the linear range of determination for total vitamin C was 0.050 25 ~ 0.804 μg ($r=0.999 9$) with the average recovery of 98.32%, RSD 1.12%. **Conclusion:** The method was simple, specific, and suitable for the determination of reduced and total vitamin C in *R. roxburghii*. By using HPLC method to detect the vitamin C contents of *R. roxburghii* with the similar wildlife habitats and altitudes in Guizhou province, it was found they that the content of vitamin C had no difference, and their average content was 1 142.11 g·L⁻¹.

[Key words] *Rosa roxburghii* Tatt.; vitamin C; HPLC

[收稿日期] 2010-01-29

[基金项目] 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21000)

[第一作者] 周涛, 副教授, 博士, 主要研究方向为中药资源开发与利用, Tel: 13985175215, E-mail: taozhou88@163.com

[通讯作者] * 江维克, 副教授, E-mail: jwk_88@163.com

刺梨为蔷薇科植物缙丝花 *Rosa roxburghii* Tatt. 的果实, 是家喻户晓的药食两用品种, 因富含维生素 C 而誉为维 C 大王。而目前所报道的测定维生素 C 方法大多为碘量法、滴定法、分光光度法^[1-2]。实际上, 这些方法所测定的要么是还原性物质(其中主要包括了维生素 C、酚性成分、水溶性单宁)的总和, 要么是在一定波长具有吸光作用的相关物质(其中主要包括了氨基多糖、糠醛相关物质、单宁、黄酮类)的总和, 不仅缺乏特征性, 而且测定结果受到多种成分的影响。

贵州是刺梨的主要分布及产区, 有效建立“维生素 C”的检测方法是使其原料和相关产品生产规范化的前提。本文通过利用二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)可以选择性地将脱氢维生素 C 全部还原为抗坏血酸, 而二酮古洛糖酸则不会被还原的原理^[3], 成功地将刺梨药材样品经 DTT 还原后, 利用 HPLC 法建立了刺梨中还原型维生素 C 和总维生素 C 的检测方法, 并对贵州相同生境、中山海拔地区(800 ~1 500 m)采集的刺梨成熟果实进行了维 C 含量测定比较, 对贵州刺梨的品质控制提供了很好的科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-10 ATvp, SPD-6A 紫外可见检测器, 岛津 CS-Light 中文版色谱工作站, CTO-10 Asvp 色谱柱恒温箱; 岛津 AUW220 型(分度值 0.01 mg)电子天平; TCQ-250 超声波清洗器(北京新惠超声电子研究所); 800 型台式离心机(上海手术器械厂), 电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂)。

1.2 试剂 维生素 C 对照品(供含量测定用), 购于中国药品生物制品检定所, 批号 100425-200301; 刺梨样品为 2008 年 9 月下旬至 10 月上旬, 采集贵州相同生境、中山海拔地区的刺梨成熟鲜果, 由贵阳中医学院药学系生药教研室魏升华副教授鉴定。鲜果压榨取汁, 计算榨汁率, 4℃冰箱冷藏。甲醇和乙腈为色谱纯, 超纯水, 其余为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈ 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm; 柱号 8034813); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸(5:95), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长为 242 nm。在此条件下维生素 C 与其他组分均能达到基线分离。见图 1。

2.2 试液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取维生素 C 对照品适量, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液制成

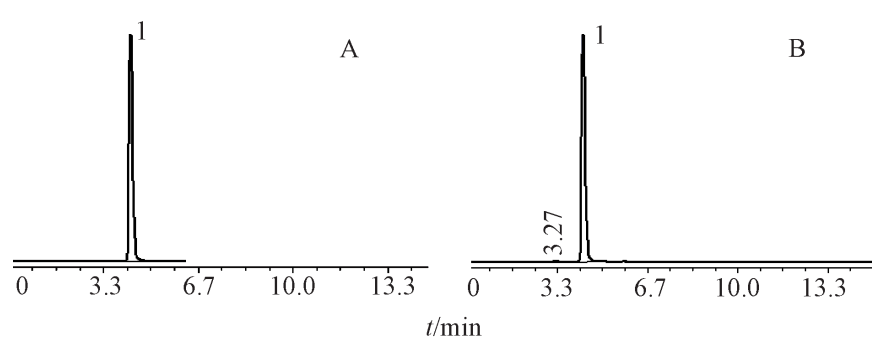


图 1 刺梨 HPLC 图(A. 对照品, B. 样品)
1. 维生素 C

0.07 g·L⁻¹ 的溶液, 即得, 当天使用。

2.2.2 维生素 C 对照品溶液的配制 精密称取维生素 C 对照品适量, 加水(用稀盐酸调节 pH 为 6.0)制成 0.1 g·L⁻¹ 的溶液, 即得, 当天使用。

2.2.3 DTT 溶液的配制 精密称取 DTT 适量, 置棕色量瓶中, 加水制成 20 g·L⁻¹ 的溶液, 放于 4℃冰箱保存。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 维生素 C 供试品溶液的制备 精密吸取刺梨汁 2 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液至刻度, 摇匀, 再精密吸取 1 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3.2 总维生素 C 供试品溶液的制备 精密吸取刺梨汁 2 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 pH 为 6.0 的水至刻度, 摇匀, 再精密吸取 1 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 pH 为 6.0 的水至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 1 mL, 与等体积的 DTT 水溶液摇匀在室温处反应 20 min, 即得。

2.4 还原型维生素 C 测定

2.4.1 维生素 C 线性关系考察 精密称取维生素 C 对照品 14.82 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液使溶解并稀释至刻度, 摇匀(0.1482 g·L⁻¹), 再分别精密量取上述溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液至刻度, 摇匀, 制得各含维生素 C 为 14.82, 44.46, 74.10, 103.74, 133.38 mg·L⁻¹ 的溶液。分别吸取 5 μL 注入液相色谱仪, 测定。结果表明, 维生素 C 在进样量(X) 0.074 1 ~0.666 9 μg 与峰面积(Y) 呈现良好的线性关系。回归方程为 Y = 4.13 ×10⁶ X - 9.42 ×10³, r = 0.999 9。

2.4.2 精密度试验 精密吸取浓度为 74.10 mg·L⁻¹ 维生素 C 对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 峰面积的 RSD 为 0.54%, 表明具有良好的精密度。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取刺梨汁 2 mL, 按

2.3.1 制备供试品溶液 室温下分别放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h 进样测定, 记录峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 0.95%, 表明在室温下 8 h 内具有良好的稳定性。

2.4.4 重复性试验 按 2.3.1 方法分别制备 6 份供试品溶液进行测定, 样品平均含量为 $13.6960 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 次测定含量的 RSD 为 0.52%, 说明有良好的重复性。

2.4.5 加样回收率试验 精密吸取已测定维生素 C 含量的刺梨汁 1 mL ($13.6960 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 再加入维生素 C 对照品适量, 按 2.3.1 方法分别制备 6 份供试品溶液并进行测定, 结果表明维生素 C 的平均回收率为 102.64%, 6 次回收率试验的 RSD 为 1.13%, 说明本法测定维生素 C 具有良好的回收率。见表 1。

表 1 刺梨汁维生素 C 加样回收率

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	13.696 0	13.87	27.921 3	102.56	102.64	1.13
2	13.696 0	13.87	27.662 3	100.69		
3	13.696 0	13.87	28.152 2	104.22		
4	13.696 0	13.87	27.913 2	102.50		
5	13.696 0	13.87	28.024 6	103.30		
6	13.696 0	13.87	27.922 9	102.57		

2.5 总维生素 C 测定

2.5.1 DTT 还原能力与稳定性测定 用 pH 为 6.0 的水将维生素 C 使用液配成 $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 在日光直接照射下使其浓度降至约为原液的 10% (照射 270 min, 当天使用)。取该溶液, 再配成 $10.0, 5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 取以上 3 种氧化维生素 C 溶液各 1 mL, 分别与同体积 DTT 溶液室温暗处反应。不同时间间隔 (min) 取出进样测定峰面积 (A)。结果表明, 氧化后的维生素 C 溶液与等体积的 DTT 水溶液在室温处反应 20 min 后, 其被氧化的维生素 C 已基本被 DTT 还原成总维生素 C, 且被还原的总维生素 C 在 60 min 内稳定。见图 2。

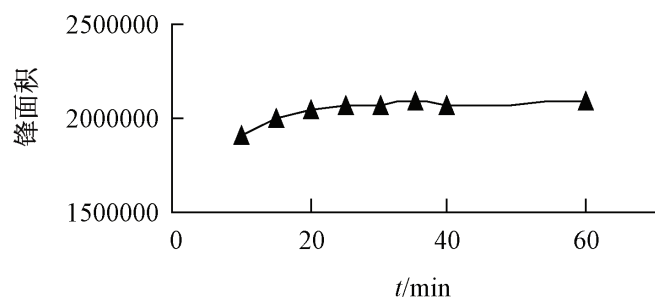


图 2 二硫苏糖醇 (DTT) 还原能力及稳定性测定

2.5.2 总维生素 C 线性关系考察 精密称取维生素 C 对照品 10.05 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加 pH

为 6.0 的水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 $1.005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素 C 对照品溶液, 该溶液在日光照射下照射 270 min, 分别精密量取上述溶液 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mL 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 分别加 pH 为 6.0 的水至刻度, 摇匀, 再分别精密吸取上述不同浓度的维生素 C 对照品溶液各 1 mL 与等体积的 DTT 水溶液在暗处反应 20 min, 各吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 测定。结果表明, 总维生素 C 在进样量 (X) $0.05025 \sim 0.804 \mu\text{g}$ 与峰面积 (Y) 呈现良好的线性关系。回归方程为 $Y = 2.44 \times 10^6 X - 3.68 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。

2.5.3 总维生素 C 精密度考察 精密吸取总维生素 C 线性关系项下的维生素 C 对照品溶液 ($20.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 10 μL , 重复进样 6 次, 记录峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 1.25%, 表明具有良好的精密度。

2.5.4 总维生素 C 稳定性试验 精密吸取刺梨汁 2 mL, 按 2.3.2 制备供试品溶液, 室温下分别放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h, 进样测定, 记录峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 1.02%, 表明在室温下 8 h 内具有良好的稳定性。

2.5.5 总维生素 C 重复性试验 按 2.3.2 方法分别制备 6 份供试品溶液并进行测定, 结果样品平均含量为 $14.2045 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 次测定含量的 RSD 为 0.85%, 说明有良好的重复性。

2.5.6 总维生素 C 加样回收率试验 精密吸取已测定中维生素 C 含量的刺梨汁 1 mL ($14.2045 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 再加入维生素 C 对照品适量, 按 2.3.2 方法分别制备 6 份供试品溶液并进行测定, 结果表明维生素 C 的平均回收率为 98.32%, 6 次回收率试验的 RSD 为 1.12%, 说明本法测定维生素 C 具有良好的回收率。见表 2。

2.6 样品测定 各地刺梨鲜果, 压榨取汁, 按本文 2.3.1 和 2.3.2 制备供试品, 并进行测定, 每个样品平均测定 2~3 份, 取平均值。结果见表 3。

表 2 刺梨汁总维生素 C 加样回收率

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	14.204 5	14.82	28.805 5	98.52	98.32	1.12
2	14.204 5	14.82	28.859 6	98.88		
3	14.204 5	14.82	28.532 2	96.67		
4	14.204 5	14.82	28.672 2	97.62		
5	14.204 5	14.82	28.782 3	98.36		
6	14.204 5	14.82	29.010 8	99.90		

表 3 不同产地刺梨维生素 C 及总维生素 C 含量

采集地	生境	海拔 / m	出汁率 / %	还原型维生素 C		总维生素 C	
				刺梨汁 /g·L ⁻¹	刺梨鲜果 /mg·100 g ⁻¹	刺梨汁 /g·L ⁻¹	刺梨鲜果 /mg·100 g ⁻¹
麻江县下司镇花桥村	田坎边、河谷旁	823	35.2	13.70	482.09	14.20	499.99
麻江县碧波乡大堡	公路边、水渠旁	938	38.5	11.58	427.50	11.60	442.16
雷山县南花村	河谷、公路边	710	30.8	10.37	319.54	10.54	324.70
施秉县牛大场镇	公路土坎边	955	40.2	12.69	559.72	13.18	581.25
龙里县谷脚乡茶香村	山地沟谷	1 392	44.1	15.32	533.63	16.06	567.42
龙里县摆省乡竹林村	向阳小溪边	1 109	37.8	14.55	389.90	15.15	406.02
龙里县湾寨乡姨妈寨	沟渠、田梗	1 106	33.5	14.42	502.07	15.11	525.71
贵阳市水田镇三江农场	田梗路旁	1 261	32.6	19.06	766.36	20.20	811.80
正安县土坪镇毛栗坝村	坡地、田梗	948	34.8	22.27	746.01	22.67	759.64
赫章县野马川乡	乡村路边	1 492	26.8	23.05	887.23	23.18	892.40
平均值				15.70	561.40	16.19	581.11

3 讨论

本文所建立的刺梨中还原型维生素 C 的 HPLC 直接测定法,准确快速。利用 DTT 可选择性地把对紫外光谱没有吸收的脱氢型维生素 C 还原成为可检测到的还原型维生素 C,因此,可分别测定刺梨果实中的总维生素 C 和还原型维生素 C。在试验中,考虑到维生素 C 在酸性环境中的稳定性较强,我们采用了 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液作为对照品维生素 C 的溶剂。在还原反应中的实验中,考查了不同 pH 溶液对还原反应的影响,发现 DTT 在 pH 为 6.0 时最好,pH 若大于 7.0 则维生素 C 会不稳定,小于 5.5 不仅维 C 不稳定,且会使 DTT 的还原反应不充分,因此,建议配制维生素 C 对照品溶液时,先调节溶剂的 pH 为 6.0。此外,刺梨汁中的还原型维生素 C 在日光照射下会被氧化,果汁颜色加深。前期预试验中发现,当日光照射 270 min 时,用 HPLC 法测定果汁中维生素 C,其峰面积下降了 10%,故在考察 DTT 的还原能力及稳定性时即针对该现象,将样品日光下放置 4~5 h。当然,这也提示在做刺梨含量检测中,必须对对照品溶液和供试品溶液都采用避光措施。

检测在相似生境、中山海拔(800~1 500 m)的贵州野生刺梨成熟果实及其果汁中的维生素 C 含量。结果表明(见表 3),刺梨鲜果中的还原型维 C 含量在 319.54~766.36 mg·(100 g)⁻¹,总维 C 含量

在 324.70~892.40 mg·(100 g)⁻¹;果汁中还原型维 C 含量在 10.37~23.05 g·L⁻¹,总维 C 含量在 10.54~22.67 g·L⁻¹。维生素 C 的含量虽有一定的差异,但差异不大,10 份样品中有 5 份接近平均值,在地理位置相邻区域如麻江县的 2 个乡镇样品、龙里县的 3 个乡镇样品,维生素 C 的含量是很接近的。海拔较高的赫章地区刺梨维生素 C 含量虽是所有样品中最高的,但是否维生素 C 含量与海拔高度有相关性还尚需要更多样品进行进一步比较研究。

本文通过 HPLC 法建立刺梨的维生素 C 指标,检测刺梨成熟鲜果,100 g 鲜果中的总维生素 C 和还原型维生素 C 之和平均为 1 142.11 mg。本方法排除了传统方法中如紫外分光光度计检测到具有相同吸收的所有酚性成分、水溶性单宁以及氨基多糖等成份的干扰,所获维 C 含量指标是明确并可靠的。

[参考文献]

- [1] 刘磊,吴玉林. 水果和蔬菜中维生素 C 的含量测定的原理及方法[J]. 中国临床医药研究杂志, 2004, (31): 1402.
- [2] 唐星. 刺梨珍珠饮料中维生素 C 和超氧化物歧化酶(SOD)稳定性的研究[J]. 饮料工业, 2004, 7(5): 17.
- [3] 邵丽华,李静涛. 饮料中还原型维生素 C 与总维生素 C 测定方法的研究[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 192.

[责任编辑 顾雪竹]