

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

刘绍俊¹, 牛 英², 刘冰浩², 陈国平²

(1. 广西师范大学 生命科学学院 广西 桂林 541004; 2. 广西柑桔研究所 广西 桂林 541004)

摘 要: 以沙田柚果肉和 VC 标准液为试材, 探讨钼蓝比色法测定沙田柚果肉最佳条件。结果表明: 测定波长为 700 nm, 3% 偏磷酸-醋酸用量为 1.5 mL, 5% 硫酸和 5% 钼酸铵用量均为 2 mL, 30℃ 水浴显色 20 min, 取出自然冷却至室温, 再放置 1 h 后测定。该方法数据的稳定性和准确性好, 适合少量和批量样品的测定。试验测得沙田柚果肉中还原型维生素 C 平均含量为 114.63 mg/100g。

关键词: 沙田柚; 钼蓝比色法; 还原型维生素 C; 波长

中图分类号: S 666.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0008-05

维生素 C 是一种抗坏血病的因子, 能促进胶原的生物合成, 利于组织创伤的愈合, 增强毛细血管壁强度, 增加机体对外界环境的应激能力, 是人体生命正常活动不可缺少的微量营养素^[1,2]。人体不能自身合成维生素 C, 必须通过食物摄取, 而维生素 C 主要以还原型的 L-抗坏血酸存在于新鲜的水果和蔬菜中。据报道, 沙田柚果中富含维生素 C, 其含量高达 123 mg/100g^[3], 居水果之

前列。因此, 还原型维生素 C 含量的测定成为了沙田柚果品分析的一项重要内容。

测定维生素 C 含量的方法主要有滴定法, 如 2, 6-二氯酚法^[4-5]、碘量法^[6]等; 分光光度法, 如 2, 4-二硝基苯肼比色法^[4,7]、紫外分光光度法^[8-9] 以及钼蓝比色法^[10-16] 等; 另外还有气相色谱法、液相色谱法、原子吸收间接测定法及荧光法等^[17]。目前, 用于沙田柚果肉维生素 C 的测定方法有 2, 6-二氯酚法^[18]、碘量法^[19]、2, 4-二硝基苯肼比色法^[7] 和液相色谱法^[20]。2, 6-二氯酚法和碘量法属传统的滴定方法, 操作简单, 但要求整个操作过程迅速, 滴定终点不好判断, 并且溶液需定期标定; 2, 4-二硝基苯肼比色法是一种全量测定法, 不能单独测定还原型维生素 C, 操作时间长, 操作要求较严格, 涉及试剂较多; 液相色谱法虽然具有灵敏度高, 选择性好等优点,

第一作者简介: 刘绍俊(1985-), 男, 在读硕士, 研究方向为植物生理生化。E-mail: liushaojun998@126.com。

通讯作者: 陈国平(1962-), 男, 博士, 副教授, 现从事果树生理生态研究工作。E-mail: cgp888888@126.com。

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(nyhyzx07-023); 广西科学基金资助项目(桂科自 0991188)。

收稿日期: 2010-10-22

Effect of Different Fruit Loading Treatments on the Photosynthesis and Fruit Quality of Strawberry in Ningxia Greenhouse

SHAN Shou-ming, YANG Shu-ling, WANG Zhen-ping, PING Ji-cheng
(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: This experiment used strawberry in greenhouse to study the effects of different fruit loading treatment on strawberry development, photosynthesis and fruit quality. The results showed that thinning fruit in anthesis significantly increased foliar area, improved activities of neutral invertase, sucrose synthesis and cell-wall invertase, decreased soluble acid invertase activity, foliar chlorophyll content and net photosynthetic rate decreased too. The fruit yield was not significantly increased when the fruit number in average plant were more than 2 fruits. So in greenhouse of Ningxia, thinning fruit in anthesis could affected sink capacity and strength through regulated the activities of sucrose metabolism enzymes, the foliar development and photosynthesis affected too, in the end, the fruit quality increased.

Key words: strawberry; fruit loading; photosynthesis; fruit quality

但仪器都比较精密昂贵, 且样品前处理纯化复杂, 难普及推广。

钼蓝比色法是测定果蔬中还原型维生素 C 含量的一种常用方法, 因偏磷酸和钼酸铵反应生成的磷钼酸铵经还原型的维生素 C 还原后生成亮蓝色的络合物, 通过分光比色可以测定样品中还原型维生素 C 的含量。目前, 还未见该方法用于测定沙田柚果肉中还原型维生素 C 的报道。现对钼蓝比色法测定沙田柚果肉中还原型维生素 C 含量进行研究, 确定最佳的测定条件, 以建立快速、准确、灵敏度高的沙田柚维生素 C 的测定方法, 并为果蔬还原型维生素 C 含量的测定提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

草酸-EDTA 溶液: 称取 6.3000 g 草酸和 0.0750 g EDTA, 充分溶解后用超纯水定容至 1 000 mL; 1 mg/mL 维生素 C 标准液: 将 0.1000 g 抗坏血酸用上述所配的草酸-EDTA 溶液定容于 100 mL 容量瓶中; 3% 偏磷酸-醋酸溶液: 将 3.0000 g 偏磷酸溶解于 40 mL (1+5) 冰醋酸溶液中, 待完全溶解后用超纯水定容至 100 mL; 5% 钼酸铵溶液: 将 5.0000 g 钼酸铵溶解于少量超纯水中, 完全溶解后定容至 100 mL; 5% 硫酸溶液: 将 5 mL 浓硫酸缓慢加到 95 mL 超纯水中, 搅拌均匀待用。

紫外可见分光光度计 (PerkinElmer, Lambda 35)、超纯水仪 (台湾艾柯机, Exceed-BC)、离心机 (贝克曼, Allegra 64R)、水浴锅、匀浆机、分析天平。

1.2 试验材料

取 50 g 新鲜沙田柚果肉, 加入一定量的草酸-EDTA 溶液, 倒入匀浆机中打成匀浆后用 80 目筛网过滤至 100 mL 容量瓶内, 草酸-EDTA 溶液冲洗残渣数次, 并定容至刻度, 摇匀后取一定体积提取液于 50 mL

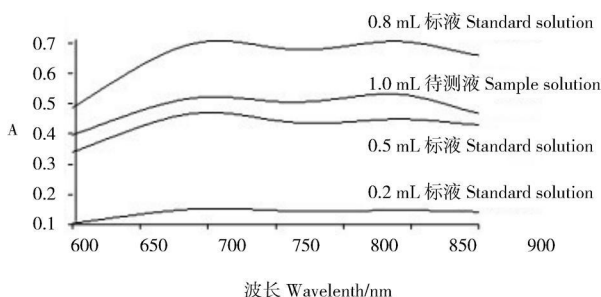


图 1 不同浓度标液和果汁待测液反应体系的吸收曲线

Fig. 1 Absorption spectra of reaction system of standard solution and sample solution with different VC concentrations

刻度离心管中, 20℃、5 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为待测液, 必要时再用草酸-EDTA 溶液稀释。

1.3 试验方法

依次往试管中加入维生素 C 标准液或果汁待测液、草酸-EDTA 溶液、1.5 mL 3% 偏磷酸-醋酸溶液、2 mL 5% 硫酸溶液和 2 mL 5% 钼酸铵溶液, 其中前 2 项加入量之和固定为 5 mL, 整个反应体系最终用超纯水定容至 25 mL, 30℃ 水浴显色 20 min, 取出自然冷却至室温, 再放置 1 h 后测定。

2 结果与分析

为了检测沙田柚果汁背景物对钼蓝比色法有无干扰, 并对反应体系各组分进行准确定量, 以 0 mL (空白)、0.2、0.5、0.8 mL 的维生素 C 标准液和 1.0 mL 的果汁待测液进行以下各反应条件的优化。

2.1 吸收波长的确定

取 0 mL (空白)、0.2、0.5、0.8 mL 的维生素 C 标准液和 1.0 mL 的果汁待测液于 50 mL 刻度试管中, 按 1.3 所述的方法进行显色后, 以空白管调零, 在波长 600 ~ 900 nm 范围内用分光光度计进行波长扫描 (图 1)。由图 1 可以看出, 不同浓度维生素 C 标准液和果汁待测液反应体系的吸收光谱基本一致, 即在 600 ~ 900 nm 间存在 700 nm 和 835 nm 2 个吸收峰。结合文献资料^{[10]19} 与该试验结果, 初步选择测定波长为 700 nm, 以下试验的吸光值均在 700 nm 下测定。

2.2 偏磷酸-醋酸用量对吸光度的影响

分别吸取 0.2、0.5、0.8 mL 的维生素 C 标液和 1.0 mL 果汁待测液, 改变偏磷酸-醋酸的用量, 测其吸光度值 (图 2)。由图 2 可看出, 各反应体系均随偏磷酸-醋酸用量的加大, 先缓慢增加, 在用量达到 1.5 mL 后达到最大并保持稳定, 所以确定偏磷酸-醋酸溶液最佳用量为 1.5 mL。

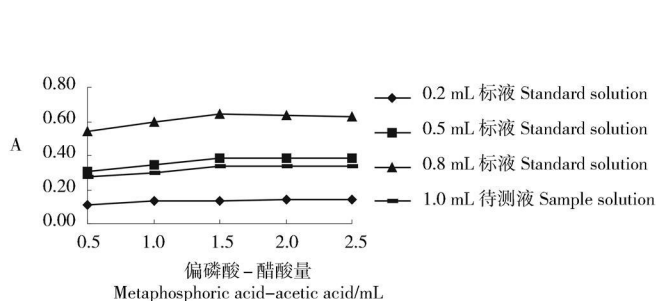


图 2 偏磷酸-醋酸用量对吸光度的影响

Fig. 2 Effects of the dosage of metaphosphoric acid-acetic acid on absorbance

2.3 硫酸用量对吸光度的影响

分别吸取 0.2、0.5、0.8 mL 的维生素 C 标液和 1.0 mL 果汁待测液, 改变硫酸溶液用量, 测其吸光度值。由图 3 可知, 硫酸用量 1~3 mL 时, 各反应体系吸光度比较稳定, 在 2 mL 达到最大, 大于 4 mL 后开始减小, 超过 5 mL 后急剧下降, 所以确定硫酸溶液用量为 2 mL。

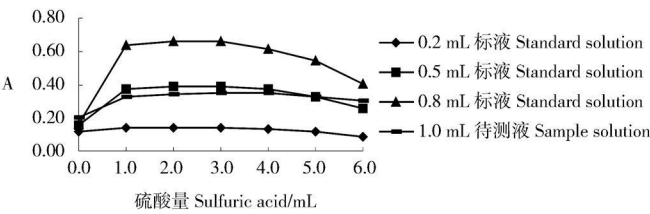


图 3 硫酸用量对吸光度的影响

Fig.3 Effects of the dosage of sulfuric acid on absorbance

2.5 显色时间与稳定时间对吸光度的影响

1.0 mL 果汁待测液和 0.8 mL 维生素 C 标准液 30℃水浴显色不同时间及显色后放置不同的时间, 测定吸光度值。由表 1、2 可知, 30℃水浴 15、20、25、30 min 对维生素 C 浓度相对较低的果汁待测液反应体系的吸光值无明显影响; 30℃水浴 20、25、30 min 对维生素 C 浓度相对较高的标液反应体系的吸光值无明显影响。显色 20 min 后, 随放置时间的延长, 果汁待测液反应体系吸光值缓慢增加, 在 30~90 min 内吸光值保持稳定; 0.8 mL 标液体系, 吸光值随放置时间的增加而有所增大, 在 60~90 min 内吸光值保持稳定。所以, 30℃水浴下显色 20 min, 取出冷却后放置 60 min 测定, 吸光值稳定性较好。

表 1 不同水浴时间对吸光度的影响

Table 1 Effects of water bath time on absorbance

吸光度 Absorbance	时间 Time/ min			
	15	20	25	30
1.0 mL 果汁 待测液吸光度				
The absorbance of 1.0 mL sample	0.3842 aA	0.3829 aA	0.3850 aA	0.3867 aA
0.8 mL 标液 吸光度				
The absorbance of 0.8 mL sample	0.6466 aA	0.6627 abAB	0.6797 bB	0.6798 bB

注: 小写字母代表 0.05 显著水平, 大写字母代表 0.01 显著水平, 下同。

Note: Small letters indicated significant at 0.05 level and capital letters indicated significant at 0.01 level the same below.

2.4 钼酸铵用量对吸光度的影响

分别吸取 0.2、0.5、0.8 mL 的维生素 C 标液和 1.0 mL 果汁待测液, 改变钼酸铵溶液用量, 测其吸光度值。由图 4 可知, 当用量为 1 mL 时, 吸光度值几乎为零; 用量为 2 mL 时, 各反应体系吸光度值发生显著变化, 均达到了最大值; 用量继续增加, 吸光度缓慢下降后趋于稳定。所以确定钼酸铵溶液的用量为 2 mL。

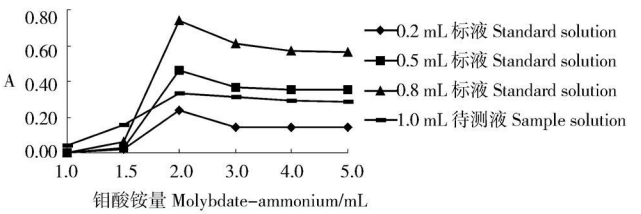


图 4 钼酸铵用量对吸光度的影响

Fig.4 Effects of the dosage of molybdate-ammonium on absorbance

表 2 水浴 20 min 后不同放置时间的吸光度

Table 2 Effects of standing time on absorbance after water lathing for 20 minutes

吸光度 Absorbance	时间 Time/ min			
	0	30	60	90
1.0 mL 果汁 待测液吸光度				
The absorbance of 1.0 mL sample	0.3829 aA	0.3954 bAB	0.4051 bcB	0.4069 cB
0.8 mL 标液 吸光度				
The absorbance of 0.8 mL sample	0.6627 aA	0.6923 bB	0.7102 cC	0.7100 cC
standard solution				

2.6 测定方法的精密度的测定

吸取 0.5 mL 维生素 C 标准液和 1.0 mL 果汁待测液, 按上述优化结果 进行精密度试验, 共做 10 个平行样。由表 3 可知, 700 nm 波长下, 按优化反应条件, 测定维生素 C 标准液和果汁待测液反应体系的吸光度值均较为稳定, 精密性高。

2.7 标准曲线的确定与样品维生素 C 含量的测定

分别吸取 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 的维生素 C 标准液于 50 mL 刻度试管中, 依次分别加入 5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0 mL 草酸-EDTA 溶液、1.5 mL 3% 偏磷酸-醋酸溶液、2 mL 5% 硫酸溶液和 2 mL 5% 钼酸铵溶液, 最后用超纯水定容至 25 mL; 30℃水浴显色 20 min, 取出自然冷却至室温, 放置 1 h 后测定吸光度值, 制作标准曲线。标准曲线方程为: $y = 0.8692x - 0.0259$, 相关系数 $R^2 = 0.9997$, 维生素 C 浓度在 0.004~0.04 mg/mL 范围内

服从比耳定律。

素 C 含量进行测定, 3 次重复, 最终测定了沙田柚果肉中还原型维生素 C 平均含量为 114.63 mg/100g。

按制作标准曲线的方法对 6 个样品中还原型维生素 C 含量进行测定, 3 次重复, 最终测定了沙田柚果肉中还原型维生素 C 平均含量为 114.63 mg/100g。

表 3 果汁待测液与维生素 C 标准液的精密度试验 (n=10)

Table 3 Results of precision experiment of sample solution and VC standard solution

		编号 No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
待测液 Sample solution		0.4869	0.4883	0.4921	0.4901	0.4857	0.4874	0.4993	0.4865	0.4885	0.4930
平均值 Mean; 0.4898	标准差 Standard deviation; 0.0039	标准误差 Standard error; 0.0012									
标液 Standard solution		0.4211	0.4165	0.4195	0.4175	0.4223	0.4167	0.4194	0.4178	0.4225	0.4178
平均值 Mean; 0.4191	标准差 Standard deviation; 0.0021	标准误差 Standard error; 0.0007									

2.8 回收率的测定

步骤测定, 计算其回收率。共 3 个处理, 3 次重复(表 4)。

吸取 1.0 mL 待测液于 50 mL 刻度试管中, 加入 0.2 mL 的 1 mg/mL 维生素 C 标准液, 按照上述优化的

结果表明, 700 nm 波长下该测定方法的平均回收率为 99.52%, RSD 为 2.01%。

表 4 回收率试验结果 (n=3)

Table 4 Results of recovery test

波长 Wavelength/ nm	编号 NO.	样品量 Sample volume/ mg	加入量 Volume of added/ mg	检测值 Tested value/ mg	回收率 Recovery/ %	平均 Mean/ %
700	1	0.4551	0.2	0.6523	99.56	99.52
	2	0.3783	0.2	0.5729	99.07	
	3	0.4252	0.2	0.6247	99.93	

2.9 不同波长下的标准曲线与维生素 C 含量测定

该研究中, 维生素 C 的吸收光谱显示, 在 600~900 nm 间存在 700 nm 和 835 nm 的 2 个波峰, 且吸光度值在 700~850 nm 间都比较高。在 700~850 nm 间选取 700、750、800、850 nm 4 个波长对同一个标准曲线反应体系制作标准曲线, 并对同一样品待测液进行含量测定。

由表 5 可知, 4 个波长下建立的标准曲线相关性均较好, 同一样品在各波长下测定的还原型维生素 C 含量无显著差异。

表 5 不同波长下的标准曲线和样品中维生素 C 含量

Table 5 The standard curves and the content of VC in samples at different wavelengths

波长 Wavelength/ nm	标准曲线 Standard curves (n=3)	R ²	样品中维生素 C 含量 Content of VC in samples/ mg · (100g) ⁻¹ (n=10)
850	y=0.8919x-0.0212	0.9997	104.25aA
800	y=0.9149x-0.0258	0.9996	103.99aA
750	y=0.9002x-0.0215	0.9996	104.77aA
700	y=0.9050x-0.0224	0.9994	104.60aA

3 讨论

钼蓝比色法测定果蔬中还原型维生素 C 含量的方法简单易行, 但不同文献对该方法的报道不太一致。关于测定的波长, 文献中分别有 760^[10]、698^[11]、705^[12, 14]、839^[13]、700.1^[15]、690 nm^[16]。该研究对不同浓度维生素 C 标液和沙田柚果汁待测液反应体系进行多次波长扫描发现, 其波形基本一致, 在 600~900 nm 间存在 700 nm 和 835 nm 2 个波峰。对标准曲线和同一样品分别在 700、750、800、850 nm 4 个波长测定吸光度, 所拟合的各波长的标准曲线相关性均较好, 在 4 个波长下测定的同一样品的维生素 C 含量也无显著差异性。分光光度法选择波长的原则是避开对杂质和溶剂有吸收的波长; 通常选择最大吸收波长, 但峰顶要平缓, 波长的微小改变对吸光度影响不大, 以减小误差; 如果峰很“尖”, 两侧坡度大, 波长的微小变化会导致吸光度的大变化; 如果有多个吸收峰, 且多个峰的吸收值大小, 峰的尖锐度都符合要求的话, 一般不选择很低波长处和很高波长处的峰; 不同溶剂的峰的最大吸收值和吸收状态也不完全一致。由于溶剂、溶质及其它试验条件的不同, 测定波长会有所不同。从该研究结果看, 钼蓝比色法对沙田柚果肉中 VC 含量的测

定波长在 700~850 nm 较大范围内都可以得到相关性较好的标准曲线。综合其它研究报道,测定波长 700 nm 更为通用。

在不同研究中,反应体系的吸光度值在钼酸铵和硫酸的一定用量范围内保持稳定。综合马占玲等^[13]、李军^[14]和该研究的研究结果,不同研究最终选用的最佳用量有所不同,但用量稳定范围基本一致,即钼酸铵用量范围为 0.4%~1.0%,硫酸用量范围为 0.2%~0.6%。该研究采用不同浓度的维生素 C 标准液和果汁待测液对反应体系进行优化。结果表明,在维生素 C 的一定浓度范围内,钼酸铵、硫酸、偏磷酸用量基本不受反应体系中维生素浓度的影响,显色时间和稳定时间随反应体系中维生素浓度的增大而增长。

钼蓝比色法测定沙田柚果肉中还原型维生素 C 含量数据稳定性、准确性较好,是一种快速、准确、灵敏度高的测定沙田柚果肉中还原型维生素 C 含量的新方法。

参考文献

- [1] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 80-85.
- [2] 谢笔钧. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 444.
- [3] 吴俊明. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 102.
- [4] 张水华. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 49-55.
- [5] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 267-268.
- [6] 贾君. 5 种水果中维生素 C 含量的测定研究[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2004, 10(2): 33-34.

- [7] 涂常青, 吴馥萍, 温欣荣. 分光光度法测定沙田柚果肉中的总抗坏血酸[J]. 广东化工, 2005(3): 47-48.
- [8] 张立科, 田水泉, 谢太平, 等. 紫外可见分光光度法测定果蔬中的维生素 C[J]. 河北化工, 2009, 32(1): 50-52.
- [9] 朱兆富, 沈喜梅, 邹丽君. 紫外分光光度法测定酒葡萄原汁中的维生素 C[J]. 分析试验室, 2002, 21(6): 100-102.
- [10] 郝建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 182-183.
- [11] 关学良, 邱书伟, 刘振. 钼蓝比色法测定新疆果品中抗坏血酸的含量[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 1995, 12(3): 56-59.
- [12] 李玉红. 钼蓝比色法测定水果中还原型维生素 C[J]. 天津化工, 2002(1): 31-32.
- [13] 马占玲, 马占彪, 夏云生, 等. 青椒中还原型维生素 C 含量的测定[J]. 渤海大学学报(自然科学版), 2006, 27(2): 111-113.
- [14] 李军. 钼蓝比色法测定还原型维生素 C[J]. 食品科学, 2000, 21(8): 42-45.
- [15] 奚长生. 磷钼蓝分光光度法测定维生素 C[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(5): 723-725.
- [16] 徐茂军, 马卫兴, 华士川. 钼蓝比色法测定食品中的还原型维生素 C[J]. 食品与发酵工业, 1993(5): 38-41.
- [17] 林媚, 冯先桔, 杨梅果肉维生素 C 含量测定法评价[J]. 中国果菜, 2006(3): 47.
- [18] 韦莉萍, 黄学, 黄桂香, 等. 喷施果丰灵对沙田柚的影响[J]. 广西农业科学, 2005, 36(3): 238-240.
- [19] 涂常青, 王开峰, 温欣荣, 等. 沙田柚主产区土壤养分状况与果实品质关系初探[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1128-1131.
- [20] 何优选, 梁奇峰. 高效液相色谱法测定梅县沙田柚果肉中维生素 C 的含量[J]. 光谱实验室, 2010, 27(4): 1290-1293.

Study on Determination of the Content of Reduction-type VC in Chinese Grapefruit's Sarcocarp with Phosphomolybdate-blue Spectrophotometry

LIU Shao-jun¹, NIU Ying², LIU Bing-hao², CHEN Guo-ping²

(1. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guangxi Citrus Research Institute, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: Chinese grapefruit's sarcocarp and VC standard liquid as test materials, phosphomolybdate-blue spectrophotometry was established for the best determination of the content of reduction-type VC. The results showed that optimal measuring wavelengths was 700 nm and the dosage of 3% metaphosphoric acid-acetic acid, 5% sulfuric acid, 5% molybdate-ammonium in 25 mL reaction system were 1.5 mL, 2 mL, 2 mL, respectively. The reaction system, water-bathed at 30 °C for 20 minutes and then placed in room temperature for 1 hour, was in stable state. The method was stable, accurate and suitable for the determination of small-amount and batch samples. In this study, the average content of reduction-type VC in Chinese grapefruit's sarcocarp was 114.63 mg/100g.

Key words: Chinese grapefruit; molybdenum blue colorimetry; reduction-type VC; wavelength