维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0841-02

紫外吸收碘量法快速测定体液维生素 C

朱小云[1], 李生兵[2], 郭 睿[2], 廖 飞[1], 王咏梅[1], 左渝萍[1]

(1.重庆医科大学生物化学教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学 2001 级七年本科学生 400016)

【摘 要】目的:考察用紫外吸收碘量法快速测定体液维生素 C 的可行性。方法:用碘乙酸封闭巯基,三氯乙酸沉淀蛋白质,二氯甲烷抽提除去干扰色素。测定处理后体液样品与碘反应 30s 前后 353nm 吸收变化。结果:测定反应前或后的光吸收变异<5%,反应前后光吸收变化同体系 VC 含量成正比,响应曲线斜率与三碘复合物的消光系数接近,样品中 VC 回收率>90%,可测定反应体系 5~30μmol/L 的 VC。结论:本方法有望用于体液 VC 的快速测定。

【关键词】维生素 C;碘量法;紫外吸收检测

【中国图书分类法分类号】Q503 【文献标识码】B 【收稿日期】2004-05-11

Fast assay of vitamin C in body fluids by iodometry with UV absorbance detection

ZHU Xiaoyun, et al

(*Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feasibility of fast assay of vitamin C (VC) in body fluids by iodometry with UV absorbance detection. *Methods*: The sample was pretreated with iodoacetic acid to block sulfhydryl group. Protein was precipitated by trichloroacetic acid, and chromogen was extracted with chloromethylene. The change of absorbance after 30 s reaction of the pretreated sample with iodine was measured. *Results*: The assay of absorbance before and after 30 s reaction of the pretreated sample with iodine showed the variation coefficient within 5%, and the recovery of VC was above 90%. There was linear response of the absorbance change to the amount of VC from body fluids with slope consistent to that for iodine. *Conclusion*: This method may be desirable for fast assay of VC in body fluids.

【Key words】Vitamin C; Iodometry; UV absorbance detection

大剂量维生素 C(VC)常用于治疗炎症相关疾病[1,2]。通常认为大剂量 VC 没有副作用,但实践中发现大剂量 VC 可导致"蚕豆黄"患者急性溶血[3],且大剂量 VC 快速给药还会促进血栓形成[4]。离体条件下,高浓度 VC 会抑制蟾蜍腓肠肌的收缩[5],促进人红细胞溶血[6]。因此,特殊条件下大剂量 VC 可能会有副作用,有必要进行治疗药物监测。但现有方法都不便于快速测定少量体液样品的 VC 含量[7]。我们最近发现用紫外光度碘量法可快速简便测定片剂中 VC 含量,且其样品用量很少[8]。本文考察用此紫外光度碘量法测定体液 VC 的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

碘乙酸购自 Sigma,碘酸钾购自 Merk,碘化钾、VC 和三氯乙酸均为国产分析纯。二氯甲烷重蒸。人血浆样品购自本地血液供应中心,尿液为参与实验者提供。

1.2 稀碘应用液配制

稀碘应用液用碘酸钾和碘化钾混合制成,于棕色瓶中 4℃储存[8]。

1.3 体液 VC 的测定

样品经 5.0mmol/L 碘乙酸(储备液 0.5mol/L)处理 10min,加 10%体积 55%三氯乙酸混匀,5min 后加入等体积的二氯甲烷,震荡,1000g 离心 15min 上清液为处理后样品。测定体系含 750μl 生理盐水、100μl 三氯乙酸(55%)、200μl 处理后样品,50μl 稀碘应用液。加入稀碘应用液准确反应 30s 后在 353nm 测定体系光吸收(A_1)。样品处理后 4℃存放,2h 内测定。独立测定相同浓度稀碘应用液的光吸收(A_0)。样品中 VC 与碘反应造成的光吸收下降为$\triangle A_{353} = A_0 - A_1$。

作者介绍:朱小云(1962-),讲师,硕士,
主要研究方向:分析生物化学和酶学

基金项目:重庆市教委首批中青年骨干教师资助计划。

维普资讯 http://www.cqvip.com

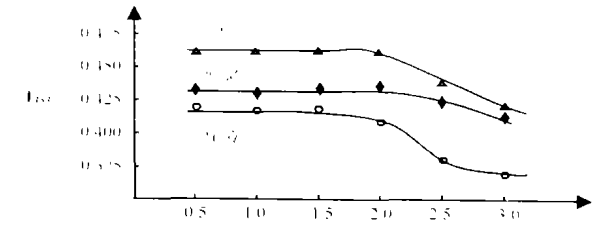
2 结果和讨论

2.1 碘负离子对三碘复合物形成的影响

碘与碘负离子形成的三碘复合物在 353nm 有强吸收,优化碘负离子浓度有利于提高灵敏度。测定恒量碘酸钾与不同碘化钾反应生成三碘复合物的吸收,测得其解离常数 $K_d=(0.40\pm0.06)$mmol/L($n=3$)。据与碘酸钾反应的化学计量关系,在 9.2mmol/L 碘化钾时所形成三碘复合物的消光系数为 2.3×10^4 $(mol/L\cdot cm)^{-1}$($n=3$,回归分析 $r>0.999$),与文献值一致[8,9]。故本方法所用稀碘应用液含 0.2mol/L 碘化钾和 0.3mmol/L 碘酸钾,可使光吸收在仪器可测范围内并具有足够灵敏度。

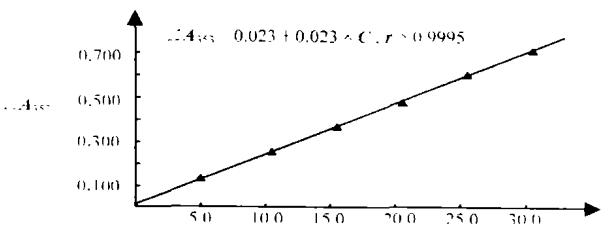
2.2 样品预处理后 VC 的稳定性

在健康人血浆或尿液中添加适量 VC 后用三氯乙酸和二氯甲烷处理,在 4℃ 存放过程中 VC 的稳定性基本相同(图 1)。此预处理方法较简单,可同步处理大量样品。处理后样品存放 2h 内 VC 剩余率在 95% 以上。用这种方法可处理多个样品并在 4℃ 存放,便于多样品同步测定。



在 4℃ 保存时间(h)

图 1 样品中 VC 的稳定性



VC 浓度(C,μmol/L)

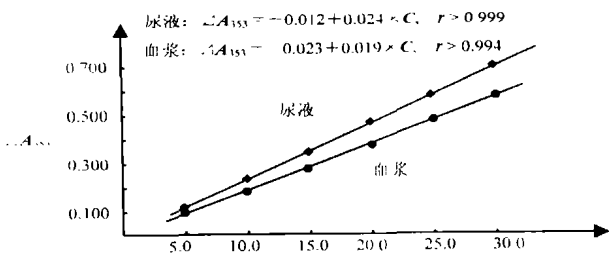
图 2 光吸收变化对水溶液中未经二氯甲烷抽提 VC 量的响应曲线

2.3 测定 VC 的标准曲线

水溶液中 VC 与碘反应很快,30s 后光吸收已不变。测定 VC 与碘反应 30s 前或后光吸收变异 < 5%($n=5$)。据碘复合物吸收下降换算成 VC 消光系数为 $2.3\times10^4(mol/L\cdot cm)^{-1}$($n=3$,CV<5.0%),与碘氧化 VC 的计量关系一致[8]。但二氯甲烷抽提后水溶液中 VC 回收率只有(86±4)%($n=4$)。

2.4 体液 VC 的测定

血浆中可与碘反应的杂质很多。不经过二氯甲烷抽提,血浆样品与碘反应 30s 后体系光吸收仍快速下降,测定反应 30s 后紫外吸收的变异常大于 10%。血浆样品用二氯甲烷和三氯乙酸处理,再与碘反应 30s 后体系紫外吸收成很慢的指数衰减;测定准确反应 30s 后体系紫外吸收的变异 < 5%($n=5$)。因此,用二氯甲烷抽提去除体液样品中的杂质对降低干扰是必要且有效的。反应体系中来自血浆的 VC 在 5μmol/L 以上时,与碘反应 30s 前后体系吸收变化对体系中 VC 含量成线性响应(图 3,$r>0.994$)。与相同处理水溶液中 VC 的响应曲线斜率相比,回收率为(96±6)%($n=3$)。轻度溶血对测定 VC 无显著影响。二氯甲烷处理后血浆样品的紫外吸收本底在 0.03 到 0.05 之间,扣除此本底后响应曲线基本通过原点。用此法测定健康人血浆 VC 含量在(40±5)μmol/L($n=5$),与文献值接近。可见,测定处理后血浆样品与碘反应 30s 前后的紫外吸收变化可测定血浆 VC 含量。



反应体系 VC 终浓度(C,μmol/L)

图 3 光吸收变化对样品中 VC 量的响应曲线

尿液 VC 含量高,但其杂质含量也高,和碘反应三分钟后紫外吸收仍下降。将尿液稀释 6 倍再用三氯乙酸和二氯甲烷处理,其与碘准确反应 30s 后体系紫外吸收的变异也 < 5%($n=5$)。稀释并处理后尿液与碘反应 30s 后的紫外吸收变化,对尿液中外加 VC 含量也成线性响应,对应消光系数为 $2.4\times10^4(mol/L\cdot cm)^{-1}$(图 3,$r>0.999$)。其相对于水溶液中 VC 的回收率为(100±4)%($n=3$)。扣除稀释后的尿液色素本底,响应曲线也基本通过原点。可见此方法也可快速测定尿液的 VC 含量。

VC 的生理作用来自其还原型。体内 VC 通过肾脏排泄。现有方法测定体液 VC 或操作繁琐,或无法区分氧化型和还原型。此紫外吸收碘量法可测定体液还原型 VC。但体液中能与碘(下转第 848 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

①一期成形术者，关键是充分保障颞浅筋膜瓣的血供。具体措施：a. 肾上腺素生理盐水液配制的浓度不能超过 1/10 万，用量以颞浅筋膜瓣无明显水肿为宜；b. 分离颞浅筋膜瓣时，须将颞浅动脉分支主干包含在内；c. 分离时尽量避免刺激或损伤血管，减少出血及结扎；d. 筋膜瓣面积应足以覆盖整个耳支架，并留出经负压吸引后进入耳廓腔隙的组织量，以避免张力；②移植皮片须紧贴筋膜瓣，面积亦须足够，缝合时不能有张力；⑧耳支架（尤为用 Medpor 材料者）固定前，边缘要修整光滑，避免尖锐直角刺伤浅筋膜瓣及血管；④如采用缝合固定外敷料的方法，则外围缝线不可横置、大跨度进出针，而应与血管方向平行、微距进出针，以免结扎供瓣血管；⑤术后皮瓣与筋膜瓣下的负压必须恒定、持续，保持引流通畅，避免积血；⑥为保证血供，术后防止患儿躁动、搔抓、局部受压的措施，如镇静（痛）、制动等，均是必要的。

参 考 文 献

[1] 傅跃先，向代理，张显文，等. 耳后颞浅筋膜瓣与皮瓣在儿童耳再造中的应用[J]. 中华显微外科杂志，1998；21(s)：54－55.

[2] 吴建明，林子豪，刘 麒，等. 颞浅筋膜蒂耳后扩张皮瓣全耳再造术[J]. 实用美容整形外科杂志，2001；12(5)：227－229.

[3] 吴建明，林子豪，江 华，等. 多孔高密度聚乙烯耳廓支架在全耳再造术中的应用[J]. 实用美容整形外科杂志，2002；13(1)：19－21.

[4] 钟世镇主编. 显微外科解剖学基础[M]. 第 1 版. 北京：科学出版社，1995；282－292.

(上接第 842 页)或碘离子反应的物质，如过氧化物和还原性谷胱甘肽等对测定都有明显干扰[8,9]。用碘乙酸封闭巯基，三氯乙酸沉淀蛋白质，用二氯甲烷抽提除去大部分过氧化物和色素，有利于消除干扰并提供碘与 VC 反应所需酸性环境。但样品处理只能用玻璃试管，塑料试管会出现明显干扰。通过这种样品预处理，此紫外吸收碘量法可测定体液 VC，且分析效率高，所需条件简单，样品用量少，有一定应用价值。

参 考 文 献

[1] 宋文宣，李 杨（主编）. 实用内科药物治疗学[M]. 北京：人民卫生出版社，2000；392－394.

[2] 徐 峰，邹文琴（主编）. 常见病的非常规药物治疗[M]. 北京：中国医药科技出版社，1998；180.

[3] 唐志浩，陈琼俊，卢桂森，等. 大剂量维生素 C 致葡萄糖－6－磷酸脱氢酶缺乏患者发生急性溶血 1 例[J]. 中华血液学杂志，1999；20(10)：545.

[4] 陈新谦，金有豫（主编）. 新编药物学（第 14 版）[M]. 北京：人民卫生出版社，1997；477.

[5] 廖 飞，郑荣梁，陈富裕. 高浓度维生素 C 对离体肌肉收缩的抑制[J]. 中国应用生理学杂志，2000；16(3)：230，234.

[6] 杨 晓，廖 飞，华 焱，等. 高浓度维生素 C 诱导离体的人红细胞溶血[J]. 中国应用生理学杂志，2003；19(3)：69（增刊）.

[7] 庞战军，周 玫，陈 瑗，等. 自由基医学研究方法[M]. 北京：人民卫生出版社，2000；277－283.

[8] 廖 飞，杨 晓，康格非，等. 紫外吸收碘量法测定微量维生素 C 和还原型谷胱甘肽[J]. 重庆医科大学学报，2003；28(3)：372－373.

[9] GramerGL, Miller JF, Robert BP, et al. Iodometric measurement of lipid hydroperoxides in human plasma[J]. Anal Biochem, 1991；193(1)：204－211.