

番石榴中 VC 的高效液相色谱分析

刘胜辉, 臧小平*, 魏长宾

(中国热带农科院亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

摘要: 采用高效液相色谱法, 以 0.1% 的磷酸作为流动相, 采用三种不同的提取液 (3% 的偏磷酸、3% 的偏磷酸+8% 乙酸、0.1% 的草酸) 对番石榴不同的果实部位的 VC (L-抗坏血酸) 含量进行了测定, 结果表明: 3% 的偏磷酸+8% 乙酸作为浸提液效果最好, 对于三次取样的结果相对标准偏差最低 (RSD=1.6%), 回收率最高为 98.5%; 3% 的偏磷酸提取效果次之; 0.1% 的草酸溶液提取效果最差, RSD=28.4%, 回收率也很低 (72.5%)。此外, 不同部位的番石榴果肉 VC 含量也不一致, 以靠近果皮的果肉含量最高, 其次为果心, 中部果肉含量最低。

关键词: 番石榴; VC; 高效液相色谱

Assay Study on VC in Guava Fruits by High Performance Liquid Chromatography

LIU Sheng-hui, ZANG Xiao-ping*, WI Chang-bin

(South Subtropical Crops Research Institute of Scutas, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences,
Zhanjiang 524091, China)

Abstract: Determination of vitamin C (VC) in guava fruits by HPLC with 0.1% orthophosphoric acid as the mobile phase was studied. Three different solutions were used to extract the VC. The method with 3% metaphosphoric acid-8% acetic acid showed high mean recoveries (98.5%), while the LC-extraction method with 0.1% oxalic acid was proved to be unacceptable in some cases with mean recoveries as low as 72.5%. The good precision (RSD=1.6%) is achieved with the metaphosphoric acid-acetic acid LC-extraction method for determining VC in guava fruits with recovery as high as 98.5%, as a perfect routine analysis method. The content of VC in the fruit varied with different parts. The pulp close with the pericarp contained the highest content as 220.4mg/100g, while the middle part the lowest with only 85.78mg/100g.

Key words guava fruits; vitamin C; HPLC (high performance liquid chromatography)

中图分类号: 0657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0292-04

VC (L-抗坏血酸) 广泛存在于新鲜的水果和蔬菜中, 是人体不能合成但每天需要量最多的维生素, 它具有广泛的生理功能, 是维持人体正常生理代谢的一种重要化合物, 若严重缺乏会引起坏血病。番石榴 (*Psidium guajava*) 为桃金娘科番石榴属植物, 原产于美洲热带地区, 现广泛分布于热带和亚热带地区, 是我国南方名优水果之一, 因富含 VC (L-抗坏血酸) 而备受人们青睐, 在长时间的野外科学探险考察活动中, 番石榴粉几乎是不可缺少的必备品。鉴于抗坏血酸对人类的重要性, 人们对抗坏血酸的测定一直十分重视。VC (L-抗坏血酸) 测定的方法一般有比色法、荧光法和滴定法等, 操作繁

琐, 近年来发展到用高效液相色谱法测定^[1]。由于维生素化学性质不稳定, 见光易分解氧化, 因此在样品提取液的选择中显得十分重要, 实验利用高效液相色谱法, 通过采用低浓度的正磷酸作为流动相, 使用三种不同的提取液浸提样品, 分别测定了番石榴果实不同部位的 VC 含量, 筛选出了最佳的提取方法。

1 材料与amp;方法

1.1 化学药品和试剂

VC (L-抗坏血酸) (分析纯, 含量 99.7%) 中国医药上海化学试剂公司; 草酸 (分析纯); 偏磷酸 (分析纯);

收稿日期: 2005-10-18

*通讯作者

作者简介: 刘胜辉 (1975-), 女, 助理研究员, 本科, 主要从事园艺作物品质生理研究。

正磷酸(分析纯); 乙酸(分析纯); 纯水自制, 使用前经 0.22 μm 纤维素膜过滤。

1.2 材料

从当地市场购买的本地“新世纪”番石榴。

1.3 VC 的提取

称取番石榴果肉 1g 左右于研钵中, 加入 5ml 在 4℃ 冰箱预冷的提取液(3% 的偏磷酸、3% 偏磷酸+8% 乙酸、0.1% 的草酸), 在弱光环境下, 冰浴中快速研磨, 之后将匀浆放入 7ml 的离心管中, 4℃ 下 10000r/min 高速冷冻离心 20min, 取出上清液, 在离心管中加入 2ml 进行第二次离心, 合并上清液后用相应的提取液定容至 10ml。液体样品通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样 10 μl 分析。整个过程中均需低温操作和弱光环境。

此外, 取果实的三个部位, 检测不同部位 VC 含量: 一是最贴近果皮部位的果肉; 二是果实中间部位的果肉; 三是果心部位的果肉。

1.4 色谱条件的选择

本实验使用美国珀金埃尔默公司生产的高效液相色谱系统包括 Series 200 泵、Series 200 紫外/可见检测器、Series 200 自动进样器; Spheri-5-RP-18 250mm×4.6mm 色谱柱(Brownlee 公司); 流动相为 0.2% 正磷酸溶液; 流速为 1.0ml/min; 以 240nm 作为检测波长; 进样量为 10 μl; 使用 AT-130 柱温箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司), 柱温设为 25℃。

1.5 统计分析

采用 Excel 分析软件, 对每种不同提取方法的测定结果进行相对标准偏差进行统计分析, 以评价其有效性。

2 结果与分析

2.1 VC 检测波长的选择

VC 溶液在 240nm 有最大吸收, 故本实验以 240nm 作为检测波长。

2.2 流动相的选择

液体 VC 具有较强的还原性, 受热及见光后易分解, 而它在酸性溶液中却很稳定, 即使加热也不容易被破坏。为保证 VC 在测定过程中一直处于稳定状态, 所以流动相应选用酸性溶液。笔者曾用 0.25% 偏磷酸与 pH2.55 正磷酸溶液加以比较, 发现对维生素的出峰时间及峰面积并无明显的差别。但据 Yurena Hernández 等认为偏磷酸作为流动相时对色谱柱的损害程度要比 0.2% 的正磷酸溶液对于柱子的损失程度要高, 因此本实验选用 0.2% 的磷酸作为流动相。

2.3 样品提取条件的优化

分别用 3% 偏磷酸-8% 乙酸、3% 偏磷酸、0.1% 草酸三种不同的提取液对番石榴果肉进行浸提, 每一提取方法设重复三次, 结果表明: 用 3% 偏磷酸-8% 乙酸作提取液, 所测得的 VC 含量最高, 平均值为 218.4mg/100g FW, 用 3% 偏磷酸作提取液, 结果稍低一些, 平均值 197.7mg/100g FW, 相对标准偏差为 10.4%, 但是各提取液三次重复之间的相对标准偏差分别为 28.44%、10.4%、1.6%, 存在显著差异, 用 0.1% 草酸为提取液 RSD 值最大, 为 28.4%, 显然结果是最不可靠的, 其数据不可接受。而采提取 RSD=1.6%, 结果最为可靠。不足之处是由于乙酸在 240nm 处有较弱的吸收, 因此用 3% 偏磷酸-8% 乙酸提取液所得的色谱图有一杂峰, 虽不影响峰面积积分, 但峰形不如其它两种提取方法美观。

2.4 不同番石榴果实部位的 VC 含量比较

经分析, 靠近果皮的果肉 VC 含量最高, 约 220mg/100g FW, 果心部位含量次之, 在果实中部的果肉含量最低。数据见表 2。

2.5 方法的精密度和回收率实验

2.5.1 精密度实验

表 1 不同提取液对番石榴果肉中 VC 的含量测定

Table 1 Quantification of VC in guava fruits determined by liquid chromatograph(LC) with 3% MPA-8% acetic acid or 3% MPA or 0.1% oxalic acid extraction

提取液	峰面积	平均值	VC 含量(mg/100g FW)	相对标准偏差(%)
3% 偏磷酸-8% 乙酸	重复 1	2073016	2360972	218.4
	重复 2	2331344		
	重复 3	2672734		
3% 偏磷酸	重复 1	2348178	2359032	197.7
	重复 2	2403916		
	重复 3	2330822		
0.1% 草酸	重复 1	1842836	1906319	159.76
	重复 2	1398508		
	重复 3	2477614		

表2 不同果实部位 VC 含量

Table 2 Content of VC in different parts of guava fruits

果实部位	峰面积	含量(mg/100g)
中部	994845.4	85.78
心部	1560696	137.26
近表皮处果肉	2785946	257.71

表3 精密度试验结果

Table 3 Precision of VC determination method

实验编号	峰面积
1	5533196
2	5358926
3	5415158
4	5303464
5	5415036
平均值	5405156
相对标准偏差(%)	1.59

表4 回收率测定结果

Table 4 Recovery of VC extraction method

提取液	样品含量 (mg/10ml)	标样加入量 (mg/10ml)	检出量 (mg/10ml)	回收率 (%)
3% 偏磷酸-8% 乙酸	2.18	10	11.99	98.5
3% 偏磷酸	1.97	10	11.18	93.4
0.1% 草酸	1.6	10	8.41	72.5

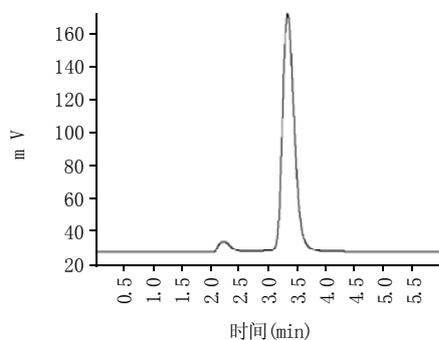


图1 以3% 偏磷酸为提取液, 番石榴样品色谱图

Fig.1 Chromatogram obtained at 240 nm for guava fruits extracted with 3% MPA-8% acetic acid

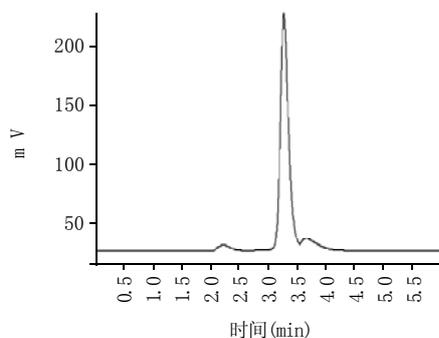


图2 以3% 偏磷酸-8% 乙酸为提取液, 番石榴样品色谱图

Fig.2 Chromatogram obtained at 240 nm for guava fruits extracted with 3% MPA-8% acetic acid

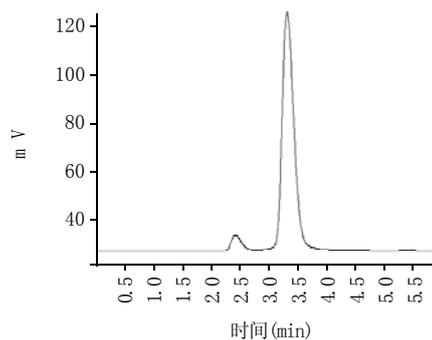


图3 以0.1% 草酸为提取液时的番石榴样品色谱图

Fig.3 Chromatogram obtained at 240 nm for guava fruits extracted with 0.1% oxalic acid

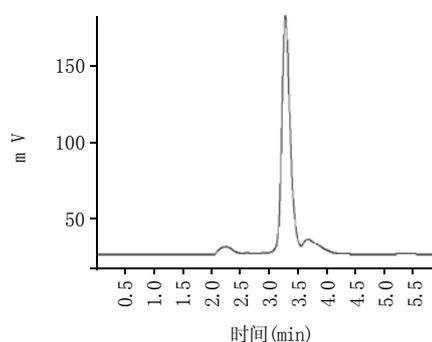


图4 以3% 偏磷酸-8% 乙酸为提取液, 果心部位 VC 含量色谱图

Fig.4 Chromatogram obtained at 240 nm for of guava fruits core extracted with 3% MPA-8% acetic acid

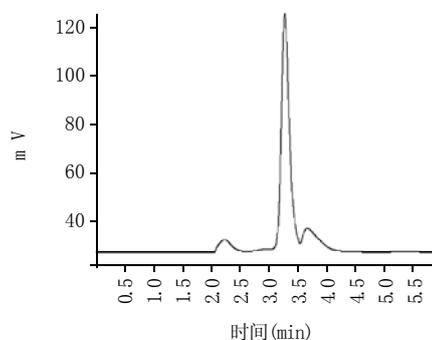


图5 以3% 偏磷酸-8% 乙酸为提取液, 果实中部 VC 含量色谱图

Fig.5 Chromatogram obtained at 240nm for guava fruits middle part extracted with 3%MPA-8% acetic acid

精确称取 L- 抗坏血酸 50mg, 用 3% 偏磷酸定容至 100ml, 配成 50mg/100ml 的标准溶液浓度。进样 10 μ l, 重复进样 n=5 次, 按 1.4 液相色谱条件进行测定, 根据峰面积计算相对标准偏差 (RSD), 得出的相对标准偏差为 1.6%, 说明方法的重现性好, 精密度高。

2.5.2 回收率实验

在 1.0g 的番石榴样品中分别加入 10mg 的 VC 标准品, 然后按 1.3 的方法进行样品的处理后, 测定样品的回收率。

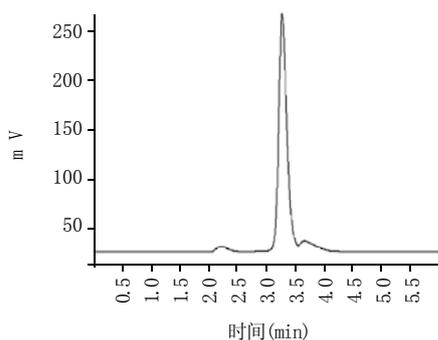


图6 以3%偏磷酸-8%乙酸为提取液,近果皮处果肉VC含量色谱图

Fig.6 Chromatogram obtained at 240 nm for part close to the pericarp of guava fruits extracted with 3% MPA-8% acetic acid

3 结论

综合上述研究结果,不难看出与3%偏磷酸和0.1%的草酸相比,3%偏磷酸-8%乙酸作为番石榴果实中VC的提取液具有最好的效果,测定结果要高,精密度高。VC保留时间为3.30min。这与刘胜辉所报道的用

pH2.55磷酸溶液为流动相时的出峰时间(4.35min)有所提前,这可能是0.2%的磷酸溶液酸性较强,洗脱能力加强的原因所致。

番石榴由于种子多而细小,食后不易消化,许多消费者在食用时将其心部去掉。根据本实验的测定结果,实际上果心部位的VC含量(137.26mg/100g鲜重),远远高于果实中部的果肉,建议榨汁后食用,避免浪费大量的VC。

参考文献:

- [1] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [2] 宋欢. 高效液相色谱法测定浓缩沙棘汁中的VC[C]// 第十三次全国色谱学术报告会文集. 泰安, 2001: 444-445.
- [3] 姜波. 菠萝中VC(L-抗坏血酸)的高效液相色谱分析[J]. 大连民族学院学报, 2003, 5(1): 52-53.
- [4] HERNANDEZ, et al. Determination of vitamin C in the tropical fruits: A comparative evaluation of methods[J]. Food Chemistry, 2006, 96: 654-664.

信息

MIT 科学家解开维生素 B12 合成谜团

美国麻省理工大学(MIT)的科学家们在3月22日的《Nature》上发表文章,声称解开了存在了几十年的关于VB₁₂合成的谜团。

VB₁₂,在维生素中化学构成最为复杂,是唯一的一个只能由微生物来合成的维生素,它对人类健康十分重要。有关VB₁₂的研究已经获得过4次诺贝尔奖。但是这个分子的一部分片断至今仍是未解之谜。

在这篇文章中,科学家报道了一种能够合成这个片断的酶,并概述了一种新型的需要拆解其他维生素的反应机制。

文章的第一作者,MIT生物学教授Graham Walker说:“这项工作完善了我们对一个生命基本过程的理解。”

VB₁₂是由与植物根相伴生的土壤细菌合成的。Walker在研究中发现了一种不能与植物共生的变异细菌。他们现在发现这种变异细菌具有一种有缺陷的酶—BluB,使它不能够正常合成B₁₂。

BulB酶催化B₁₂中被叫做DMB的片断的形成。DMB片断和另一个片断分别由独立的通路形成最后合在一起形成了B₁₂。Walker说,人们之所以花费了这么长的时间来识别BluB酶,是因为一些细菌缺少能够从其他通路形成DMB的酶。

仍需解释的问题是土壤细菌为什么要合成VB₁₂。细菌本身和它共生的植物都不需要B₁₂。对此Walker的解释是可能B₁₂能够在细菌形成与植物的共生关系的过程中起一定的作用。

Walker最后说,这项工作作为基础研究,其蕴含的意义目前还不能很清楚的看出,但是他相信在随后的研究中将会逐渐显现出来。