

吴海燕. 微波提取高效液相色谱法测定花椰菜中的维生素 C[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 256-257.

微波提取高效液相色谱法测定花椰菜中的维生素 C

吴海燕^{1,2}

(1. 南通农业职业技术学院, 江苏南通 226000; 2. 江苏省南通市农副产品加工技术协会, 江苏南通 226000)

摘要: 研究微波辅助提取、反相高效液相色谱法测定花椰菜中维生素 C 含量的方法。将花椰菜匀浆后, 以 1% 草酸为萃取剂, 微波提取、净化后, 采用恒流的方法进行液相色谱定量检测, 以 0.1% 草酸溶液为流动相, 流速 1.0 mL/min, 采用 C₁₈ 反相色谱柱分离, 在 254 nm 波长下检测。结果表明, 维生素 C 浓度在 0.02 ~ 0.12 mg/mL 范围内线性良好, 相关系数为 0.999 6, 检测限 0.02 mg/kg, 回收率在 99.9% ~ 104.6% 之间, 相对标准偏差为 1.20%。说明微波辅助法、反相高效液相色谱法能有效提取蔬菜中的维生素 C, 且测定结果稳定、重现性好, 可以用于蔬菜中维生素 C 的检测。

关键词: 微波提取; 高效液相色谱法; 花椰菜; 维生素 C

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0256-02

维生素 C 别称抗坏血酸, 是维持人体正常生理代谢不可缺少的一类有机化合物, 人体自身不能合成, 必须由膳食供给, 维生素 C 广泛存在于新鲜的水果、蔬菜中^[1]。花椰菜是十字花科芸苔属植物, 营养丰富, 富含蛋白质、食物纤维、维生素等。有研究表明, 花椰菜中含有丰富的维生素 C, 长期食用能提高人体的免疫功能, 促进肝脏解毒; 同时也能起到阻止癌前病变细胞形成的作用, 从而可以从一定程度上预防癌症^[2]。维生素 C 含量的测定方法通常有以氧化还原为基础的比色法或者以衍生反应为基础的荧光法^[3], 但是这些方法所需的试剂多且操作复杂。由于维生素 C 有较强的还原作用, 在处理时容易使样品中的维生素 C 损失, 从而影响测定的准确度和精确度。高效液相色谱法具有高效、稳定、可靠等特点, 特别是在待测样品较多的情况下, 借助仪器分析能更快地进行维生素 C 含量的测定。近年来已有一些报道用高效液相色谱法测定维生素 C 的含量^[4-6], 但是在样品制备过程中存在提取率低、操作繁琐、萃取剂用量大等问题。微波提取是一种较新的样品前处理方法, 与传统的提取法相比, 其最大的优点是提取的产品杂质含量低、有效成分含量高且提取效率高^[7], 目前这种新的微波提取技术已逐渐被应用于天然植物有效成分、生物活性成分的提取研究中^[8-12]。本研究以期建立微波提取、反相高效液相色谱法测定花椰菜中维生素 C 含量的方法, 为花椰菜中维生素 C 的含量测定提供试验资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

主要试剂为: 甲醇, 色谱纯; 维生素 C、草酸等试剂, 国产

分析纯; 所有试验用水均为超纯水。主要试验材料为: 0.45 μm 滤膜, 国药集团化学试剂有限公司; 花椰菜, 市售。

1.2 主要仪器与设备

试验用主要仪器与设备有 Waters 高效液相色谱仪、Waters1525 泵、Waters2487 紫外检测器、Breeze 色谱系统管理工作站、液相平头微量进样器 (Eppendorf)、HR2084 食品制样器 (飞利浦)、CW-2000A 型超声-微波协同萃取仪 (上海新拓)、Millipore 超纯水机、隔膜真空泵 (天津腾达)、TU-1901 紫外可见分光光度计 (北京通用普析)、KQ3200 超声脱气机 (昆山市超声仪器有限公司)、Symmetry C₁₈ 色谱柱。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱柱长 100 mm, 内径 4.6 mm, 颗粒大小 5.0 μm, 检测波长 254 nm, 流动相为 0.1% (体积分数) 草酸溶液, 流速 1 mL/min, 进样量 25 μL, 柱温 25 °C; 以保留时间定性, 待液相色谱稳定后进样分析, 以峰面积外标法定量。

1.3.2 样品处理 称取 100 g 花椰菜样品, 迅速切碎后置于食品制样器中, 加入 100 mL 2% 草酸溶液制成匀浆。准确称取 5.00 g 匀浆样品, 以 30 mL 1% 草酸为萃取溶剂, 微波功率设为 200 W, 萃取时间为 15 min, 萃取温度设定为 45 °C, 平行萃取 2 次^[6]。萃取液过滤后, 用 1% 草酸溶液定容至 50 mL 制成待测液。待测液用 0.45 μm 滤膜过滤后按“1.3.1”节色谱条件进行 HPLC 测定。

1.3.3 线性关系分析 维生素 C 标准溶液的制备: 准确称取 20 mg 维生素 C 对照品, 用 0.1% 草酸溶解后转移至 100 mL 棕色容量瓶中, 定容并制成维生素 C 标准储备液。再分别准确量取 1、2、3、4、5、6 mL 维生素 C 标准储备液于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 0.1% 草酸溶解并定容, 分别制成浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/mL 的系列标准维生素 C 标准溶液, 用 0.45 μm 滤膜过滤后按“1.3.1”节色谱条件进行 HPLC 测定。每个浓度进样 3 次, 以平均峰面积的积分值对进样浓度 (mg/mL) 进行直线回归。

1.3.4 精密度试验 取所制得样品, 按照“1.3.1”节色谱条件重复进样 6 次, 测定维生素 C 的精密度。

收稿日期: 2013-08-07

基金项目: 江苏省南通市农村科技创新及产业化项目 (编号: HL2012025)。

作者简介: 吴海燕 (1978—), 女, 江苏南通人, 硕士, 讲师, 主要从事食品综合利用、食品安全检测研究。Tel: (0513) 81050523; E-mail: why022@126.com。

1.3.5 回收率试验 采用加样回收法,精密称取适量匀浆样品,加入维生素 C 标准品,按“1.3.2”节方法进行处理,按含量测定方法测定维生素 C 的回收率。

1.3.6 最低检测限的计算 以产生 3 倍仪器噪声水平的进样量为检出限^[13]。

2 结果与分析

2.1 色谱分离结果

液相色谱分离效果的主要影响因素为色谱柱的类别、流动相、流速。在“1.3.1”的色谱条件下,维生素 C 标准品溶液、花椰菜样品的色谱图分别见图 1、图 2,可以看出所有样品均能实现基线分离,而且峰形能满足测定要求,维生素 C 的保留时间为 2.868 min,检测限为 0.02 mg/kg。

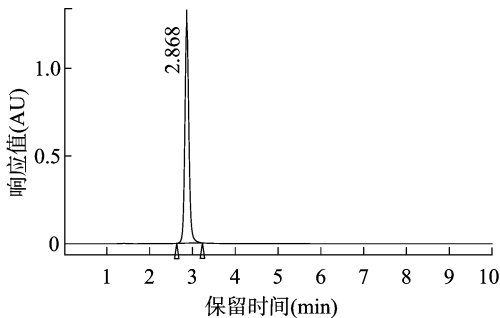


图1 维生素C标准品色谱图 (0.06 mg/mL)

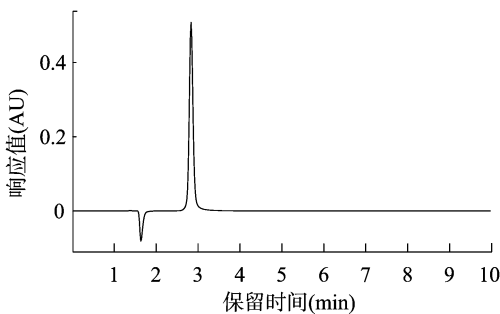


图2 花椰菜提取液色谱图

2.2 标准工作曲线

以 3 次进样的平均峰面积为响应值,以维生素 C 标准品的进样浓度 (mg/mL) 为自变量,求得直线回归方程为: $y = 876\,060x + 2\,750.9$, $r^2 = 0.999\,6$,标准曲线在 0.02 ~ 0.12 mg/mL 范围内线性良好。

2.3 精密度试验

将同一花椰菜样品按照“1.3.1”中的色谱条件重复进样 6 次,测得花椰菜中维生素 C 的含量分别为 632.0、637.7、635.2、650.8、641.8、649.5 mg/kg,平均含量为 641.2 mg/kg,本测定试验的相对标准偏差为 1.20%,表明本方法的精密度高,重现性较好。

2.4 回收率试验

分别称取 3 份 5.00 g 匀浆的花椰菜样品,分别加入 1、2、5 mL 的 0.20 mg/mL 维生素 C 标准液,按“1.3.2”节方法提取,按“1.3.1”节的色谱条件测定维生素 C 含量,每个混合样品测定 3 次,取平均值。结果(表 1)表明,3 个不同添加量试样的回收率在 99.9% ~ 104.6% 之间,平均回收率 102.4%,

表明采用微波提取、反相高效液相色谱法测定花椰菜中维生素 C 含量的方法准确度好,符合色谱定量分析的准确度要求。

表 1 回收率的试验结果

样品序号	样品中的含量 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)
1	641.2	80	724.9	104.6
2	641.2	160	805.4	102.6
3	641.2	400	1 040.6	99.9
平均				102.4

3 结论

本试验采用微波辅助提取,过滤后用液相测定方法来测定花椰菜中维生素 C 含量。结果表明,本方法的线性范围为 0.02 ~ 0.12 mg/mL,检测限 0.02 mg/kg,回收率在 99.9% ~ 104.6% 之间,平均回收率为 102.4%,相对标准偏差为 1.20%。由于维生素 C 性质不稳定,易氧化,采用微波辅助提取,不但加快了提取进程,缩短了样品制备时间,避免维生素 C 的损失,同时有效提取样品中的维生素 C,测定的准确度和精密度好,可用于蔬菜中维生素 C 含量的定量测定。

参考文献:

- [1]刘胜辉,臧小平,魏长宾. 番石榴中 VC 的高效液相色谱分析[J]. 食品科学,2007,28(4):292-295.
- [2]第二军医大学药理学系. 中国药用植物图鉴[M]. 上海:上海教育出版社,1960:731.
- [3]GB/T 5009.86—2003 蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定(荧光法和 2,4-二硝基苯肼法)[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [4]裴云逸. 高效液相色谱法快速测定蔬菜中 VC 含量的研究[J]. 食品与机械,2012,28(5):91-93,162.
- [5]吴晓娜,黄承钰,孙爱民,等. 用高效液相色谱(HPLC)法测定血清维生素 C 含量[J]. 营养学报,2002,24(3):301-303.
- [6]张晋芬,袁冰,冷平,等. 梨、苹果和香蕉中 8 种多酚类物质的微波提取与高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报,2008,27(12):1371-1374,1378.
- [7]范华均,栾伟,李攻科. 微波辅助提取/HPLC 分析大蒜中的生物碱[J]. 分析测试学报,2006,25(03):27-30.
- [8]Pérez-Serradilla J A, Japón-Luján R, de Castro M D L. Simultaneous microwave-assisted solid-liquid extraction of polar and nonpolar compounds from alperujo[J]. Analytica Chimica Acta,2007,602(1):82-88.
- [9]Liavid A, Palma M, Brigue J, et al. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction[J]. Journal of Chromatography A,2007,1140(1-2):29-34.
- [10]严娟,蔡志翔,张斌斌,等. 桃果肉总酚提取和测定方法的研究[J]. 江苏农业学报,2013,29(3):642-647.
- [11]Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction - an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research[J]. Pharmacognosy Reviews,2007,1(1):7-18.
- [12]蒋彦婕,吴纪中,张巧凤,等. 紫小麦麸皮花色苷提取工艺及其结构[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):1146-1151.
- [13]吴海燕,陈建军. 蔬菜中多种有机磷农药残留气相色谱分析法[J]. 食品与机械,2010,26(4):76-77,83.