

# HPLC 测定刺梨果实中维生素 C 含量方法的优化

王乐乐, 安华明

(贵州省果树工程技术研究中心, 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要:** 以“贵农 5 号”刺梨果实为材料, 在已有的高效液相色谱 (HPLC) 测定维生素 C (Vc) 方法的基础上, 对提取液、提取次数、提取液保存温度及色谱条件等方面进行了改进和优化, 以期筛选出从这种高含量维生素 C 果实中提取测定 Vc 含量的适宜方法。结果表明: 6% 的偏磷酸较之添加 2 mM EDTA、1% pvpp 的提取液更适合刺梨果实 Vc 的提取; 二次提取在刺梨果实 Vc 提取中很有必要; 8 h 内, 刺梨果实 Vc 提取液适合在 4 °C 保存, 如果需过夜保存, 应选择 -20 °C; 所选择高效液相色谱法 Vc 含量在 40~400 μg/mL ( $r=0.9997$ ) 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率为 101.80% (RSD=1.01%), 可用于刺梨果实及其他高 Vc 含量植物材料 Vc 的测定。

**关键词:** 高相液相色谱; 刺梨果实; 维生素 C

文章篇号: 1673-9078(2013)2-397-400

## An Optimized HPLC Method for Analyzing Vc Content in *Rosa roxburghii* Fruits

WANG Le-le, AN Hua-ming

(Agricultural College, Guizhou University)

(Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** In order to develop an optimal method for isolating and analyzing Vc in ‘Guinong 5’ (*Rosa roxburghii* Tratt.) fruits which have a high content of Vc, extracting solution, extraction times, storage temperature and chromatographic conditions were improved and optimized on the basis of former reported High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods. The results showed that comparing with extracting solution containing 2mMEDTA and 1%pvpp, the extracting solution only containing 6%MPA was more suitable for the extraction. Secondary extraction was necessary for the extracting of Vc in *Rosa roxburghii* fruits. Within 8 h, *Rosa roxburghii* fruit extracting solution should store at 4°C, and -20°C was suitable for the extracting solution need to store overnight. The calibration curves of Vc was in good linearity over the ranges of 40-400μg/ml ( $r=0.9997$ ), and the average recovery rates was 101.80% (RSD=1.01%). Therefore the method could be used for the determination of Vc in *Rosa roxburghii* fruit and other fruits which had high level of Vc.

**Key words:** HPLC; *Rosa roxburghii* fruit; Vc

刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 是我国特有的新兴果树, 主要分布在我国西南地区的黔、川、陕等省区。研究发现刺梨果实中具有较高的维生素 C (Vc) 含量, 其含量是猕猴桃的 5 倍以上<sup>[1-2]</sup>, 近年来对刺梨产品的研究开发也越来越受到人们追捧。因此准确测定刺梨果实中 Vc 含量, 对刺梨这种果树的开发利用具有十分重要的意义。

传统的紫外分光光度分析法<sup>[3]</sup>、2,6-二氯酚钠盐滴定法<sup>[4]</sup>、酶法<sup>[5]</sup>、2,4-二硝基苯肼比较法<sup>[6]</sup>等方法存在操作繁琐、费时、结果不准确等问题, 近些年来利

收稿日期: 2012-10-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31060257); 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金项目 (黔省专合字 (2010) 12 号); 贵州科技攻关项目 (黔科合农 G 字 [2009] 4003 号)

作者简介: 王乐乐 (1988-), 男, 研究方向: 果树种质资源与遗传育种

用高效液相色谱对刺梨 Vc 含量进行测定已较为常见<sup>[7-9]</sup>, 但尚存在一些问题, 如针对刺梨中较高含量的 Vc, 提取分离时应使用哪种提取液、一次浸提能否提取完全, 是否需要二次提取; 需要对待测液进行保存时, 选取何种温度等。此外, 各 HPLC 法中, 所用色谱条件也不一致<sup>[10]</sup>, 有些方法<sup>[7]</sup>存在保留时间较长的问题。笔者通过对提取液、提取次数、提取液保存温度等方面进行了改进和优化, 建立了较为准确快速的利用高效液相色谱测定刺梨果实 Vc 含量的方法, 同时确定了适合刺梨果实 Vc 提取的提取液、提取次数及提取液的保存温度。该方法同样适用于其他高 Vc 含量植物材料 Vc 的提取、保存及测定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

### 1.1.1 供试样品

供试刺梨材料为六年生刺梨优良无性系贵农5号 (*Rosa roxburghii* Tratt cv. Guinong 5), 种植于贵州大学喀斯特山地果树资源研究所刺梨种质资源圃。

### 1.1.2 主要仪器与试剂

Thermo Scientific Sorvall Stratos 冷冻高速离心机; Sartorius 电子天平; Shimadzu LC-15C 液相色谱仪; KQ5200DE 型数控超声波清洗器; HPD25 无油真空泵。Vc 标准品(分析纯含量>99.0%, 上海生工生物工程公司); 乙二胺四乙酸(EDTA); 交联聚乙烯吡咯烷酮(pvpp); 偏磷酸(MPA)均为分析纯; 甲醇为色谱纯; 水为去离子水。

## 1.2 方法

### 1.2.1 色谱条件

色谱柱: Wondasil C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm); 流动相: 0.2% MPA 水溶液; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ ; 紫外检测器, 检测波长: 254 nm; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.2 溶液的制备

对照品溶液的制备。精密称取 Vc 对照品 100 mg, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 用流动相定容, 配成 4000  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。

供试品溶液的制备。准确称取去除种子的刺梨果实 0.5~1.5 g, 加 Vc 提取液 5 mL 在预冷的研钵中均匀研磨, 所加提取液体积至少应为称取质量的 2 倍。将研磨液转移至 10 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$  下 14000 r/min 离心 15 min, 移取上清液至 10 mL 容量瓶中, 剩余残渣加提取液 3~4 mL, 相同条件离心 10 min, 合并上清液, 加流动相溶液至刻度, 摇匀离心, 取离心液 1.5 mL, 即得供试品溶液。

### 1.2.3 线性关系、精密度、重复性和回收率试验

线性关系: 准确吸取 Vc 对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3 mL 于 25 mL 棕色容量瓶中, 流动相溶液稀释至刻度, 摇匀, 配成 40、80、160、240、320、400  $\mu\text{g/mL}$  标准系列溶液。按“1.2.1”中色谱条件测定各标准液, 记录色谱图。以峰面积对浓度求回归方程和相关系数。

精密度: 精密吸取对照品溶液, 按“1.2.1”项中色谱条件连续进样 6 次, 计算标准偏差 (RSD)。

重复性: 准确称取同一批次均匀混合刺梨样品 6 份, 按照“1.2.2”项中供试品溶液制备方法平行制备供试溶液, 再按“1.2.1”项中色谱条件测定, 通过计算 RSD 来考查其测定的重复性。

加样回收率: 在已测的样品中准确加入已知量的标准品, 根据加入标准品的量与检出量计算回收率。

### 1.2.4 提取流程及保存温度选择

提取液选择: 准确称取同一批次均匀混合刺梨果实样品各 5 份, 分别选取两种不同提取液(提取液一: 含 2 mM EDTA、1% pvpp 及 6% MPA<sup>[11]</sup>; 提取液二: 仅含 6% MPA) 用“1.2.2”中方法制备供试品溶液, 两次提取所得溶液不合并, 分别定容至 10 mL。按“1.2.1”项中的色谱条件测定两种提取液下刺梨果实 Vc 含量。

二次提取必要性: 液相色谱测定上述样品二次提取 Vc 含量, 计算二次提取率。

供试品溶液保存温度选择: 分别在 4 $^{\circ}\text{C}$  和 -20 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存 4 份供试品溶液, 分别在 0、4 h、8 h、24 h 测定供试品溶液 Vc 含量, 计算供试品溶液在两种保存温度下的降解率。

## 2 结果与分析

### 2.1 Vc 标准曲线的制备

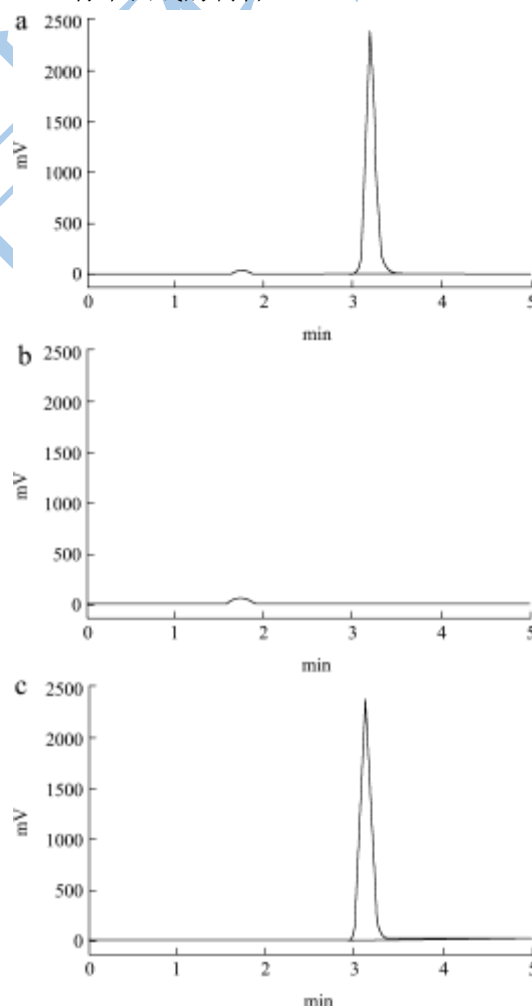


图1 对照品 (a)、空白溶液 (b) 和刺梨样品 (c) Vc 的 HPLC 色谱峰图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substance (a), blank (b) and sample (c)

根据相对保留时间并结合 Vc 的特征吸收波谱进行定性(图 1)。由图 1 可以看出,本方法进行样品的提取测定,能够使样品中 Vc 与其它杂质分离,并得到很好的色谱分离图谱。以峰面积积分值(y)为纵坐标,标准液浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,得到回归方程:  $y=54104.5554x+111935.0245$  ( $r=0.9997$ ),表明, Vc 浓度在 40~400  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好。

2.2 方法精密度、重复性及加样回收率

表 1 刺梨果实中 Vc 加样试验的回收率 (n=6) ( $\mu\text{g/mL}$ )

**Table 1 Result of recovery test of Vc from Rosa roxburghii fruit**

编号	样品含量	样品加入量	测出量	回收率/%
1	289.65	250.00	544.98	100.99
2	276.64	250.00	540.82	102.69
3	284.09	250.00	550.16	103.01
4	293.05	250.00	556.04	102.40
5	298.06	250.00	550.70	100.48
6	292.24	250.00	548.98	101.24
平均	-	-	-	101.80
RSD	-	-	-	1.01

表 2 两种提取液两次提取刺梨果实 Vc 含量及二次提取率

**Table 2 Vc contain and Second extraction amount of Rosa roxburghii fruit extracting by two extracting solution**

编号	一次提取 Vc 含量/ $(10^{-2} \text{ mg/g})$		二次提取 Vc 含量/ $(10^{-2} \text{ mg/g})$		Vc 总含量/ $(10^{-2} \text{ mg/g})$		二次提取率/ $(10^{-2} \text{ mg/g})$	
	提取液一	提取液二	提取液一	提取液二	提取液一	提取液二	提取液一	提取液二
	1	940.85	1002.4	125.67	162.35	1066.52	1164.75	11.78
2	901.31	954.9	108.22	138.66	1009.53	1093.56	10.72	12.68
3	957.79	1005.62	115.14	151.75	1072.93	1157.37	10.73	13.11
4	944.11	957.09	120.44	130.48	1064.55	1087.57	11.31	12.00
5	938.49	945.68	113.15	149.77	1051.64	1095.45	10.76	13.67
平均	$936.51 \pm 21.05$	$973.14 \pm 28.53$	$116.52 \pm 6.73$	$146.60 \pm 12.32$	$1053.03 \pm 25.52$	$1119.74 \pm 37.92$	$11.06 \pm 0.47$	$13.08 \pm 0.78$

注: 提取液一: 2mM EDTA、1% pvpp 及 6% MPA; 提取液二: 仅含 6% MPA。

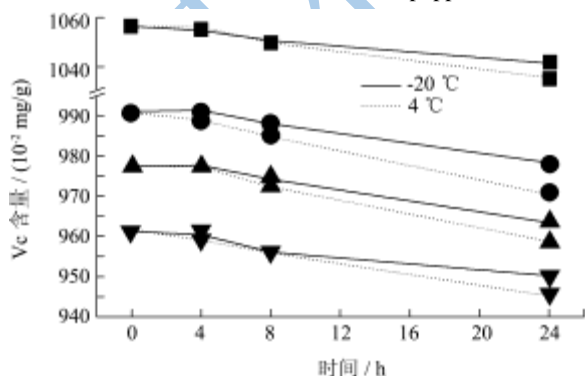


图 2 两种保存温度 (-20 °C、4 °C) 下 4 份 Vc 提取液 Vc 含量随时间变化曲线

Fig.2 The curves of four extracting solution Vc contain stored at two temperature (-20 °C, 4 °C) variation

图 2, 在 4 °C 和 -20 °C 两种保存温度下, 随保存时

注: RSD 的单位为“%”

对同一供试品溶液连续进样 6 次, 结果表明此方法精密度良好, RSD 值为 0.39%。对此方法重复性的试验结果显示 RSD 值为 1.34%, 表明该方法的重现性良好。从表 1 看出, Vc 回收率在 100.99%~103.01% 范围内, 回收效率较好, 符合分析要求。

2.3 提取液选择及二次提取

从表 2 可知, 用两种提取液对刺梨果实 Vc 进行一次提取时, 提取液二所提取刺梨 Vc 含量较提取液一含量高, 呈显著差异; 而在对一次提取所剩残渣进行二次提取时, 提取液二中 Vc 含量也较提取液一含量高且成极显著差异; 两次提取刺梨果实 Vc 含量总和, 提取液二比提取液一平均高 0.6671 mg/g, 这表明相比于添加 2 mM EDTA、1% pvpp 的提取液一仅含 6% MPA 的提取液二对刺梨果实 Vc 的提取有更好的效果。使用两种提取液对刺梨果实进行二次提取, 都有较高的提取率, 分别达到 11.06% 和 13.08%, 说明二次提取在刺梨果实 Vc 提取过程中很有必要。

2.4 供试品溶液保存温度验证

间的延长, 4 份 Vc 提取液中 Vc 含量均呈下降趋势, 而 4 °C 保存条件下各 Vc 提取液中 Vc 含量均低于 -20 °C 同期值。在 4 h 保存时间内, 相同 Vc 提取液中 Vc 含量在两种储藏温度下随时间变化较小; 随着保存时间的延长, 在 4~8 h 内, 各 Vc 提取液中 Vc 含量降解速度稍有加快, 其中 -20 °C 相对 4 °C 下降幅小, 两种温度条件下 Vc 含量较 0 h 无显著性差异; Vc 提取液在放置 24 h 后, 各提取液 Vc 降解速度进一步加快, 但 Vc 含量较 0 h 仍无显著性差异, 不过 4 °C 保存条件下各提取液中 Vc 平均降解率均低于 -20 °C, 且二者呈极显著差异。

3 结论

3.1 本试验所用 HPLC 法测定刺梨果实 Vc 含量的具

有结果重现性好, 准确度及回收率高的优点。此方法单次样品保留时间比侯璐<sup>[8]</sup>、蔡晓静<sup>[9]</sup>等人方法缩短了1 min, 较安华明<sup>[7]</sup>方法时间缩短了超过7 min, 这对测定大批量刺梨样品有重要意义。侯璐<sup>[8]</sup>、Davey<sup>[11]</sup>等人方法要求色谱条件中流动相有固定 pH 值, 本方法对流动相 pH 值并无严格要求, 因而简化了流动相的配制过程。

3.2 通过对两种 Vc 提取液的比较以及对二次提取率的试验, 发现 6% MPA 有更好的提取效果, 二次提取在刺梨果实 Vc 提取中很有必要。用两种提取液对同一批刺梨果实样品进行 Vc 提取, Vc 含量 6% MPA 比含有 2 mM EDTA、1% pvpp 及 6% MPA 的提取液平均高出 6.34%, 这与 Davey<sup>[11]</sup>的结果不完全一致, 提取液中 pvpp、EDTA 的加入并没有取得良好的效果, 这可能与所提取植物材料不同有关。本实验中, 利用 6% MPA 作为提取液, 二次提取 Vc 含量可达总 Vc 含量的 13.08%, 这表明在对高 Vc 含量的刺梨果实进行 Vc 提取分离时, 需要进行二次提取。笔者根据二次提取结果, 对二次提取残渣进行了三次提取(数据未给出), 三次提取 Vc 含量占总 Vc 含量比例不足 1%, 这说明三次提取残渣所含 Vc 量已很少, 加之操作费时, 因此对刺梨果实进行 Vc 提取时通过两次提取基本可以保证将果实中 Vc 浸提完全。

3.3 Vc 对光不稳定, 遇氧易分解等特点决定了 Vc 提取液不能长久保存。针对刺梨果实 Vc 提取液在何种温度下进行保存降解率低的问题, 本文对刺梨果实 Vc 提取液的保存温度进行了摸索。结果显示, 在 0~8 h 内, 两种保存温度下刺梨果实 Vc 提取液中 Vc 平均降解率在 0.5% 左右, 相比于 0 h 两种温度下 Vc 含量均无显著性差异, 相比于 -20 °C 提取液需解冻后测定, 4 °C 保存温度较为合理。提取液放置 24 h, 与 0 h 相比, 两种温度下 Vc 含量仍无显著性差异, 但 4 °C 条件下

Vc 降解率达到 1.34% 较之 -20 °C 下 1.91% 二者呈极显著差异, 这表明刺梨果实 Vc 提取液可以过夜保存, 且过夜保存应放置 -20 °C 温度下。

#### 参考文献

- [1] 安华明, 陈力耕, 樊卫国等. 刺梨果实中维生素 C 积累与相关酶活性的关系[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(4):431-436
- [2] 王铁健. 刺梨的几种产品加工技术[J]. 现代食品科技, 1987, 3(4):50-52
- [3] 周德庆, 韩雅珊. 紫外分光光度法快速测定果蔬及饮料中维生素 C 含量的研究[J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(5):7-13
- [4] 中国标准出版社第一编辑室. 中国农业标准汇编·果蔬卷(上)[M]. 北京市: 中国标准出版社, 2002. 90-93
- [5] 安华明. 刺梨高含量 AsA 的积累机制及其关键酶基因的克隆与表达[D]. 浙江大学, 2005
- [6] 石渊渊, 王玉兰. 生物化学实验指导[M]. 开封市: 河南大学出版社, 2007
- [7] 安华明, 刘明, 杨曼等. 刺梨有机酸组分及抗坏血酸含量分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(10):2094-2100
- [8] 侯璐, 钱和. 高效液相色谱法测定刺梨中维生素 C 含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 311-313
- [9] 蔡晓静, 潘丽丽, 李慧娟等. 刺梨的炮制及其炮制品中维生素 C 测定法[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2011, 29(4):6-10
- [10] 鲁玉侠. 高效液相色谱法检测橄榄果酒中的 Vc 和糖类物质[J]. 现代食品科技, 2011, 27(7):861-862, 872
- [11] Davey M W, Dekempeneer E, Keulemans J. Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione [J]. Analytical Biochemistry, 2003, 316:74-81

欢迎订阅中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号: 46-349

刊号: ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元, 全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅, 并踊跃投稿或建立广告宣传 and 产学研合作关系。

地址: 广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508, 邮编: 510640

电话: 020-87112373, 87114555, 87113352, 87112532

E-mail: xdspkj@vip.sohu.com