

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0972.2013.01.012

# 高效液相色谱法测定果蔬中维生素 C 含量

赵昕梅\*, 远凌威, 陈世锋, 张苏锋

(信阳师范学院 生命科学学院 河南 信阳 464000)

**摘要:** 通过探索果蔬中维生素 C (VitC) 提取方法和建立反相 HPLC 法测定 VitC 含量的方法来建立检测果蔬中 VitC 含量的标准方法. 结果显示: 检测条件为色谱柱  $C_{18}$  (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为体积比 95:5 的草酸 (质量分数 0.1%): 甲醇混合液, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30  $^{\circ}$ C 时 VitC 含量测定方法的线性关系良好, 相关系数为 0.999 8. 当提取液为质量分数 1.0% 草酸时标准品 VitC 回收率最高, 平均值为 97.2%,  $R_{SD}$  为 1.12%. 猕猴桃中 VitC 含量最高, 为 18.55 mg/g; 草莓次之, VitC 含量为 2.0 mg/g.

**关键词:** 果蔬; 维生素 C; 高效液相色谱

中图分类号: R151.43 文献标志码: A 文章编号: 1003-0972(2013)01-0049-05

## Determination of VitC Content in Fruits and Vegetables by HPLC

Zhao Xinmei\*, Yuan Lingwei, Chen Shifeng, Zhang Sufeng

(College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

**Abstract:** The extraction method of VitC and determination method of VitC content were established by exploring the extraction and determination method of VitC in eight kinds of fruits and vegetables. The results showed that the VitC content had a good linear relationship when it was determined on Acclaim<sup>®</sup>  $C_{18}$  column (4.6 mm  $\times$  250 mm 5  $\mu$ m), using the mobile phase of 0.1% oxalic acid-methanol (95:5, V/V) at a flow rate of 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, with the detection wavelength in 254 nm at 30  $^{\circ}$ C of column temperature, and  $r = 0.9998$  ( $n = 5$ ). The average recovery of standard VitC will up to 97.2% with RSD = 1.12% when the extracting solution was 1.0% oxalic acid. Kiwifruit had the highest VitC content 18.55 mg/g, followed by strawberry with the content of VitC 2 mg/g.

**Key words:** fruits and vegetables; VitC; HPLC

## 0 引言

维生素 C (VitC) 又称抗坏血酸 (Ascorbic acid), 是广泛存在于新鲜水果蔬菜及许多生物中的一种重要的维生素. 作为一种高活性物质, 它参与许多新陈代谢过程, 具有提高免疫力, 预防癌症、心脏病、中风, 保护牙齿和牙龈等生理作用. VitC 是一种水溶性小分子生物活性物质, 也是人体需要量最大的一种维生素, 作为生物体内对自由基伤害产生的相应保护系统成员之一, 更引起了人们的研究兴趣. 因此, 对其含量进行测定, 能为人们的膳食营养提供参考, 从而有效预防和抵制因体内因缺少 VitC 而带来的不利影响, 提高人们的生活质量和工作效率. VitC 的测定方法很多, 较为常用的有比

色法、紫外分光光度法、荧光法等. 这些方法所需试剂较多、操作繁琐等缺点<sup>[1-4]</sup>. 高效液相色谱 (high performance liquid chromatogram, HPLC) 法因处理样品简单、快速, 且能同时测定几种维生素而被广泛应用于食品、药品中维生素的测定<sup>[5]</sup>. 本研究采用 HPLC 方法对 8 种常见果蔬中的 VitC 含量进行测定.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料来源

本实验中所用水果和蔬菜均购买自信阳市和美超市.

### 1.2 仪器和设备

UltiMate 3000(3400) 高效液相色谱仪, 美国

收稿日期: 2012-05-17; 修订日期: 2012-09-01; \* . 通信联系人, E-mail: zxm04@sina.com

基金项目: 信阳市科技局科技攻关项目 (CGZH1018)

作者简介: 赵昕梅 (1977-), 女, 河南项城人, 讲师, 在读博士, 主要从事生物活性物质研究.

戴安, 色谱工作站型号, chromeleon client program; KQ3200VDE 型双频数控超声波清洗器, 上海昆山超声仪器有限公司; ULUPURE 超纯水控制系统, 优普超纯科技公司; WR-2001 型溶剂过滤器, 上海嘉鹏科技有限公司。

### 1.3 主要试剂

甲醇(色谱纯), 草酸(分析纯)均购买自国药集团. 维生素 C (Sigma 公司)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 高效液相色谱条件

Acclaim<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 反相分离柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相: 体积比为 95:5 草酸(质量分数 0.1%): 甲醇混合液; 流速: 1.0 mL/min; 测波长 UV: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

#### 1.4.2 溶液的制备

(1) VitC 标准品溶液. 精密称取 50 mg VitC, 置于小烧杯中, 用质量分数 0.1% 草酸溶液充分溶解后转移至容量瓶中, 并定容至 50 mL, 配制成 1.0 g/L 母液, 转移至棕色试剂瓶中, 放置于 4 °C 冰箱备用。

(2) 样品提取液的配制. 分别称取 1.0、5.0、10.0 g 草酸, 加入蒸馏水溶解后定容至 1 L, 配制成质量分数 0.1%、0.5%、1.0% 的草酸溶液, 作为样品的提取液。

(3) 样品溶液的配制. 称取 40 g 的待测样品置入料理机中, 加入适量质量分数 0.1% 草酸溶液后进行组织匀浆, 处理 2 min. 然后用抽滤器进行抽滤, 滤液转移至容量瓶并定容至 100 mL, 得到质量分数 0.1% 草酸溶液提取的样品溶液, 并做好标记. 再用同样的方法制得质量分数 0.5% 和 1.0% 的草酸溶液提取的样品. 所有 8 种果蔬均用同样的方法进行处理。

(4) 流动相溶液的配制. 先配制质量分数 0.1% 的草酸溶液 1.0 L, 用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜经溶剂过滤器抽滤, 量取滤液 950 mL 和 50 mL 的色谱甲醇混合, 配制成体积比为 95:5 的草酸: 甲醇溶液, 装入 A 瓶. 配制 500 mL 体积比 95:5 的水: 甲醇混合液, 装入 D 瓶, 用以冲洗色谱柱. 再量取色谱甲醇 500 mL, 装 B 瓶, 用以保存柱子. 将上述 A、B、D 瓶溶液超声处理, 去除溶液中的气泡。

#### 1.4.3 标准曲线的制备

将 VitC 标准储备液依次稀释为 200、150、100、50、10 mg/L 等 5 个质量浓度梯度, 每质量浓度在相同检测条件下检测 3 次。

• 50 •

#### 1.4.4 精密度试验

量取一定量的 VitC 标准储备液稀释至 100 mg/L, 在相同的检测条件下进行 5 次检测, 记录下实际检测质量浓度。

#### 1.4.5 标准品回收率试验

取 VitC 标准储备液分别加入质量分数 0.1%、0.5%、1.0% 的草酸溶液中, 使理论质量浓度达到 100 mg/L, 然后按方法 1.4.2(3) 进行处理。

#### 1.4.6 样品测定

将所有待测标准液和样品用孔径 0.45 μm 的一次性过滤器进行过滤, HPLC 取样量设置为 20 μL, 检测时间为 10 min, 每样重复进样 3 次。

#### 1.4.7 数据分析

HPLC 检测结束后, 用仪器配置软件进行分析; 再运用 DPS 9.50(标准版) 对数据进行分析, 应用 Duncan 新复极差法进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 色谱条件的选择

在预试验中设置了双检测波长, 即 254 nm 和 267 nm, 结果发现 2 种检测波长下, VitC 信号强度差异不显著, 最终确定检测波长为 254 nm. 样品的检测时间超过 10 min 后的 5 min 内, 没有发现有明显的信号强度, 因此样品检测时间定为 10 min. 在流动相为体积比 95:5 的草酸(质量分数 0.1%): 甲醇混合液、流速为 1.0 mL/min、进样体积为 20 μL 时, 待测样品中的各物质的峰型和分离度较好。

### 2.2 标准品 VitC 的线性关系

将 5 种不同质量浓度的 VitC 标准溶液进行 HPLC 检测, 每质量浓度进样 3 次, 用平均峰面积对质量浓度绘制标准曲线. 结果表明 VitC 标准溶液在 10.0 ~ 200.0 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数  $R^2 = 0.9998$ , 见图 1。

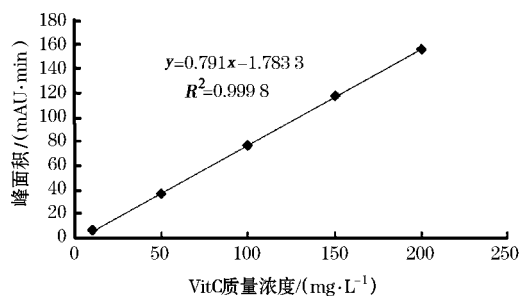


图1 VitC 标准品线性关系图

Fig. 1 The linear diagram of standard VitC

### 2.3 精密度试验

对理论质量浓度为 100 mg/L 的 VitC 标准溶液进行 5 次重复性测定, 根据实际检测值得出标准液的相对标准偏差 RSD 为 0.03%, 见表 1, 表明精密度很好.

表 1 精密度试验结果

Tab. 1 Precision test results

理论质量浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	n	VitC 检测质量 浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	R <sub>SD</sub> / %
100.000	1	99.985	0.03
	2	99.972	
	3	100.014	
	4	100.029	
	5	99.956	

### 2.4 标准品 VitC 回收率试验

将 3 种不同草酸质量分数的标准品 VitC 回收液进行 HPLC 检测, 由表 2 可以看出: 质量分数 0.1% 草酸提取液中的标准品 VitC 平均回收率只有 68.112%, 且 3 个重复间的差异明显, R<sub>SD</sub> 为 4.20%; 质量分数 0.5% 草酸提取液中的标准品 VitC 平均回收率为 86.224%, 3 个重复间的 R<sub>SD</sub> 为 1.91%; 质量分数 1.0% 草酸提取液中的标准品 VitC 平均回收率最高, 为 97.200%, 3 个重复间的 R<sub>SD</sub> 为 1.12%, 差异最小. 表明标准品 VitC 在酸性溶液中的稳定性较好, 质量分数 1.0% 的草酸溶液比较适合样品中 VitC 的提取.

表 2 不同质量分数草酸提取液加标回收实验结果

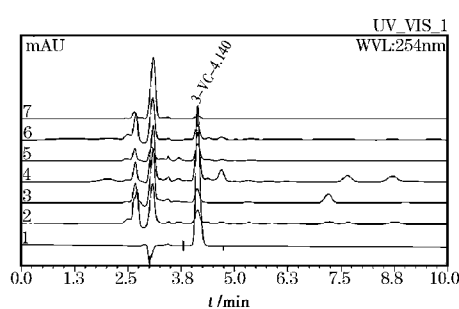
Tab. 2 Results of recovery of standard VitC with different concentrations of oxalic acid extracting solution

草酸质量分数 / %	加标量 / (mg · L <sup>-1</sup> )	回收 VitC 实测值 / (mg · L <sup>-1</sup> )	平均回收率 / %	R <sub>SD</sub> / %
0.1	100.000	67.836	68.112	4.20
		65.397		
		71.104		
0.5	100.000	87.905	86.224	1.91
		86.146		
		84.621		
1.0	100.000	98.373	97.200	1.12
		97.008		
		96.219		

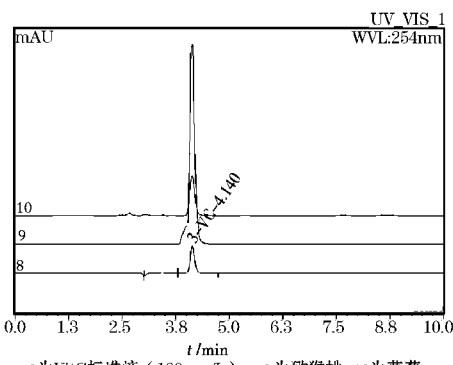
### 2.5 样品中 VitC 检测结果

使用 3 种草酸质量分数提取液进行 8 种果蔬

中 VitC 的提取, 并进行 HPLC 检测, 见图 2.



1为VitC标准液(100 mg/L), 2为香蕉, 3为胡萝卜,  
4为西红柿, 5为黄瓜, 6为火龙果, 7为苹果



8为VitC标准液(100 mg/L), 9为猕猴桃, 10为草莓

图 2 样品中 VitC 色谱(1.0% 草酸提取液)

Fig. 2 HPLC chromatography of VitC of samples(1.0% oxalic acid extracting solution)

结果显示, 不同果蔬中水溶性成分有明显的不同, VitC 的含量存在明显差异, 其中猕猴桃中 VitC 含量最高, 质量浓度为 18.55 mg/g (图 2, 表 3); 草莓中 VitC 含量次之, 质量浓度为 2.0 mg/g (图 2, 表 3); 西红柿中 VitC 含量居第 3 位, 质量浓度为 355.2 μg/g, 苹果中 VitC 含量最低, 质量浓度为

83.6 μg/g, 其他几种果蔬中 VitC 含量差异不显著 (图 2, 表 3). 相同果蔬中的 VitC 含量与草酸提取液质量分数存在明显相关性, 即随草酸质量分数的增加 VitC 的提取量也增加, 其中质量分数 0.1% 和 0.5% 草酸提取液提取的 VitC 量存在明显差异, 如胡萝卜、火龙果和苹果的 VitC 提取量, 而质量分数

1.0% 草酸提取液又好于质量分数 0.5% 草酸提取液的回收率最高一致,表明 VitC 在酸性溶液中稳定. 液(表 3). 这与标准品 VitC 在 1.0% 草酸提取液中

表 3 样品中 VitC 含量的分析结果(平均值 ± 标准差  $P < 0.05$ )

Tab. 3 Analysis results of VitC content in samples( Mean ± S. D ,  $P < 0.05$ )

水果品种	不同质量分数草酸下 VitC 含量/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )		
	0.1%	0.5%	1.0%
香蕉	1.1 ± 1.1d	3.1 ± 2.8f	97.7 ± 4.1de
胡萝卜	1.5 ± 1.7d	66.3 ± 5.2ef	107.6 ± 4.8de
西红柿	312.3 ± 5.7c	321.7 ± 5.8c	355.2 ± 7.4c
黄瓜	97.9 ± 4.7d	120.5 ± 1.1d	125.5 ± 6.6d
火龙果	2.1 ± 2.0d	28.0 ± 2.2ef	115.8 ± 5.7de
苹果	1.5 ± 1.9d	56.8 ± 3.4ef	83.6 ± 3.7e
猕猴桃	11 633.2 ± 248.1a	12 807.2 ± 14.3a	18 548.0 ± 25.0a
草莓	1 654.7 ± 8.2b	1 824.0 ± 94.5b	2 001.9 ± 49.7b

注:表中大小写字母代表在显著性水平为 0.05 的情况下各数据之间差异的多重比较结果

### 2.6 本试验方法与其他试验方法对果蔬中 VitC 含量检测结果的比较

从表 4 可以看出,与文献中其他检测方法相比,除香蕉和黄瓜中的 VitC 含量稍低或基本一致

外,HPLC 所测结果明显高于其他方法所得数值,其中猕猴桃最为显著,分别为 2-β-二氯酚钠滴定法的 6 倍和碘量法的 20 倍;草莓中的 VitC 含量是紫外分光光度计法所测数据的近 3 倍.

表 4 不同检测方法对果蔬中 VitC 含量检测结果的比较

Tab. 4 Comparison of the VitC content determined by different methods

检测方法	提取液	水果名称	VitC 质量浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	文献来源
2-β-二氯酚钠滴定法	2% 草酸	猕猴桃	2 989.0	[1]
		苹果	44.6	
		香蕉	127.9	
碘量法	2% 草酸	苹果	33.9	[2]
		猕猴桃	791.8	
	5% 三氯乙酸	苹果	38.7	
		猕猴桃	801.5	
5% 冰乙酸	苹果	38.7		
	猕猴桃	772.4		
紫外分光光度计法	未标明	草莓	791.0	[3]
荧光法	未标明	西红柿	275.4	[4]
		黄瓜	125.7	
HPLC 法	1.0% 草酸	猕猴桃	18 548.0	本试验
		苹果	83.6	
		香蕉	97.7	
		草莓	2 001.9	
		西红柿	355.2	
		黄瓜	125.5	

## 3 讨论

### 3.1 草酸提取液对 VitC 提取率的影响

根据 3 种质量分数草酸提取液对标准品 VitC 的回收率可以得出 VitC 在 1.0% 的草酸溶液中最稳定,回收率最高;从同一种果蔬中 VitC 提取量的差异可以看出,随着草酸质量分数的增加,VitC 提取量呈现增加趋势.因此,质量分数为 1.0% 的草

酸溶液最适合 VitC 的提取.但是相同质量分数草酸提取液条件下,不同果蔬中 VitC 提取量的差异趋势基本一致,这说明果蔬中 VitC 的含量确实存在较大差异.

### 3.2 果蔬品种和成熟度对结果的影响

VitC 是一种己糖衍生物,在水溶液或碱性环境中容易被氧化而失去生理作用,而在弱酸性环境中相对稳定.文献[2]中试验了 3 种不同溶剂对猕猴

桃中的 VitC 进行了提取,碘量法检测结果表明猕猴桃中 VitC 的质量分数为 772.4 ~ 801.5  $\mu\text{g/g}$ ,该结果不到文献 [1] 中 2,6-二氯靛酚钠滴定法检测结果(2 989  $\mu\text{g/g}$ ) 的 30%,仅为本文中 HPLC 检测方法(18 548.0  $\mu\text{g/g}$ ) 的 4.3%。造成这种现象的原因除检测方法的灵敏性以外,可能还与研究材料的成熟度或品种等有明显关系。目前,人们普遍认为新鲜果蔬中的 VitC 含量较高,但是 VitC 含量与储存时间的动态关系需要进一步验证。此外,果蔬在成熟的过程中,口感会发生显著的变化,由青、涩、酸变为色彩鲜艳、香甜可口,在此生理变化过程中的 VitC 含量将发生什么样的变化趋势还有待进一步试验。再者,不同生理小种果蔬中的 VitC 含量的差异需要进一步试验分析。

### 3.3 HPLC 法检测 VitC 的优越性

不同检测方法对同种果蔬 VitC 含量的检测有明显的差别,这表明检测方法对检测结果有明显影响。除香蕉和黄瓜中 VitC 含量稍低于文献中报道数据以外,本文中 HPLC 法检测其他几种果蔬中的 VitC 含量都显著高于文献中数据。与其他检测方法相比,HPLC 法可以通过选择不同流动相和改变检测条件使待检测物质和其他成分实现较好的分离,从而具有较好的灵敏性和重复性。本文中对相同质量分数的标准品 VitC 检测结果的相对标准偏差  $R_{\text{SD}}$  为 0.03% 表明该仪器检测样品的精密度很好,有效地避免了因其他物质干扰或操作人员判断标准不同等原因带来的误差,使检测结果更可靠。

#### 参考文献:

- [1] 杨利玲,杜娟,吴春燕,等. 冬春季市售主要水果中 VC 含量测定与营养分析[J]. 北方园艺,2011(3): 37-38.
- [2] 王红霞,张伟婵,孟莉新. 水果中 VC 含量的测定[J]. 宜春学院学报,2011,33(4): 120-121.
- [3] 赵连俊. 水果中维生素 C 含量测定的研究[J]. 当代化工,2008,37(6): 672-673.
- [4] 姚建华,黄亚励,席晓岚,等. 荧光法测定部分果蔬中维生素 C 含量[J]. 贵阳医学院学报,1997,22(4): 43-44.
- [5] Zafra-Gómez A, Garballo A, Morales J C, et al. Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem 2006,54(13): 4531-4536.

责任编辑:任长江