

高效液相色谱法同时测定扁桃仁中的 水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆

申烨华^{1,2}, 张 萍³, 孔祥虹⁴, 郭春会⁵, 王继武²

(1. 西北大学化学系, 陕西 西安 710069; 2. 延安大学化学系 化学工程陕西省重点实验室, 陕西 延安 716000;
3. 咸阳师范学院化学系, 陕西 咸阳 712000; 4. 陕西出入境检验检疫局, 陕西 西安 710068;
5. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 西安 710065)

摘要 建立了用高效液相色谱同时测定扁桃仁中4种水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆ 的方法。以酸水解法处理样品, 在 Inertsil ODS-3 柱 (25 cm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) 上, 以 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.0)-甲醇 (体积比为 70:30) 为流动相进行等度洗脱, 检测波长 265 nm 条件下, 对陕西蒲城扁桃仁中的水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆ 的含量进行了同时测定。4种水溶性维生素在其质量浓度为 5.0 ~ 50 mg/L 时线性良好 ($r = 0.9990 \sim 0.9997$); 添加水平为 5.0 ~ 20.0 mg/kg 时, 平均回收率为 91.77% ~ 99.30%, 相对标准偏差 ($n = 3$) 为 0.31% ~ 1.98%。测得陕西蒲城产扁桃仁中维生素 B₂ 的含量为 4.27 ~ 4.53 mg/kg, 维生素 B₁ 的含量为 0.799 ~ 0.838 mg/kg, 未检出维生素 C 和维生素 B₆。该法简便、快速, 准确性和重现性均较好, 对果仁中水溶性维生素的测定具有一定的参考价值。

关键词 高效液相色谱; 水溶性维生素; 扁桃仁

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0538-04

Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in Almonds by High Performance Liquid Chromatography

SHEN Yehua^{1,2}, ZHANG Ping³, KONG Xianghong⁴, GUO Chunhui⁵, WANG Jiwu²

(1. Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Chemical Reaction Engineering Provincial Key Laboratory, Department of Chemistry, Yan'an University, Yan'an 716000, China;
3. Department of Chemistry, Xianyang Teachers College, Xianyang 712000, China; 4. Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China; 5. College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Xi'an 710065, China)

Abstract: A method has been developed for the simultaneous determination of four water-soluble vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in almond by high performance liquid chromatography. The contents of vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in almonds in Pucheng County, Shaanxi Province were determined under optimized conditions as follows. In the first step, the sample was prepared by acid hydrolysis. In the second step, the separation was performed on an Inertsil ODS-3 column (25 cm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) with a mobile phase of 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.0)-methanol (70:30, v/v) and a detection wavelength at 265 nm. The linear ranges of four vitamins were within 5.0 – 50.0 mg/L ($r = 0.9990 \sim 0.9997$). At the spike level ranged between 5.0 – 20.0 mg/kg, the average recoveries of the four vitamins in the Pucheng almond ranged from 91.77% to 99.30% with relative standard deviations between 0.31% and 1.98%. For vitamins B₂ and B₁, the contents were found to be 4.27 – 4.53 mg/kg and 0.799 – 0.838 mg/kg, respectively, while vitamins C and B₆ were not discovered in Pucheng almonds. The method is simple, rapid, reproducible and accurate.

Key words: high performance liquid chromatography; water-soluble vitamin; almond

收稿日期 2004-09-14

作者简介: 申烨华, 女, 理学博士, 副教授, 主要从事植物有效成分的分析分离、天然植物产品开发和蛋白质分离纯化与复性研究,

Tel (029) 83040586, E-mail: yshen1220@163.com.

基金项目: 陕西省黄土高原水土保持世界银行贷款项目和陕西省自然科学基金项目(No. 2002B08).

扁桃(Prunes Amygdales Stokes),即巴旦杏,又称美国大杏仁,是世界著名干果之一。它除了富含人体所需的基本营养物质如氨基酸、脂肪酸、维生素、微量元素外,还富含其他活性成分如苦杏仁甙^[1,2]、消化酶、甾醇类^[3]、黄酮甙类^[4]、多酚类^[5]、神经鞘脂类^[3]、倍半萜烯内脂类^[6]等,有望被作为功能性食品。扁桃仁具有滋阴补肾、明目健脑、抗癌防癌、降血脂、抗氧化、增强免疫力等多种医疗功能^[2],也可用其直接制作高级食用保健油及高级化妆品^[2],因此市场开发前景极为广阔。

水溶性维生素是植物中一类重要的营养成分,常用的测定方法^[7]有:紫外分光光度法、荧光法和高效液相色谱法(HPLC)。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^[8]、药品^[9,10]中维生素的测定。但采用HPLC同时测定果仁中4种水溶性维生素C、B₁、B₂和B₆尚未见报道。本文用反相HPLC对陕西蒲城产扁桃仁中的4种水溶性维生素C、B₁、B₂和B₆进行同时测定,并对样品处理方法及流动相体系进行了优化,同时进行了方法学评价。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:Shimadzu 6A 高效液相色谱仪带紫外检测器(岛津公司);Mettler Toledo Delta 320pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)等。

试剂:V_C、V_{B₁}、V_{B₂}、V_{B₆}对照品(纯度≥99%,美国SPELCO公司);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);磷酸二氢钾(分析纯,西安试剂厂)等。

扁桃仁样品 8[#]、11[#]和 13[#](陕西蒲城产,引种于美国加州,由西北农林科技大学园艺学院郭春会教授惠赠)。

1.2 标准储备液的制备

准确称取 V_C、V_{B₁}、V_{B₂}、V_{B₆}各 0.05 g 于 50 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至刻度,配成各种维生素质量浓度均为 1 g/L 的单标储备液。使用前,根据需要以 0.1 mol/L 盐酸稀释混合成指定质量浓度的混合标准工作液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(25 cm × 4.6 mm i. d. 5.0 μm),流动相为 0.05 mol/L KH₂PO₄(pH 6.0)-甲醇(体积比为 70:30),流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 265 nm,进样量 20 μL。用峰面积比较法计算出样品中各水溶性维生素的含量。

1.4 样品处理^[8]

取一定量干燥扁桃仁,粉碎,称取 5.0 g 扁桃仁

粉于 100 mL 锥形瓶中,加入 40 mL 0.1 mol/L 盐酸超声混匀后,于 100 kPa 高压下水解 30 min(120 °C),冷却后,再用 0.1 mol/L 盐酸定容至 50 mL,超声混匀,静置,取上清液离心,得 V_{B₁}、V_{B₂}和 V_{B₆}的提取液。另取扁桃仁粉 5.0 g 于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 8%(体积分数,下同)偏磷酸溶液超声提取 20 min,再用 2% 偏磷酸溶液定容至刻度,充分摇匀,静置,取上清液离心,得 V_C的提取液。取两种提取液各 1.0 mL 混合,过 0.3 μm 滤膜后测定。

2 结果与讨论

2.1 样品处理

天然食品中的维生素多以结合态形式存在于食品中,所以在分析测定之前,首先必须使其转变为游离态。参考文献[8],首先用 0.1 mol/L 盐酸于高压下水解样品,使结合态的 V_{B₁}、V_{B₂}和 V_{B₆}游离出来。然后对样品进行超声提取,并用 0.3 μm 滤膜过滤提取液以除去大量杂质的干扰。V_C通常采用草酸、醋酸、偏磷酸等溶液直接提取。由于偏磷酸对 V_C有很好的稳定性,且能沉淀蛋白质,澄清提取液,对含有大量蛋白的扁桃仁样品来说更为合适,故本文采用 8% 偏磷酸溶液提取 V_C。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 检测波长

测定 254 ~ 285 nm 之间各种维生素的响应值(见图 1)。实验结果表明,V_C、V_{B₁}和 V_{B₂}在 265 nm 处吸收最大。虽然 V_{B₆}在 255 nm 处吸收最大,但其在 265 nm 处的灵敏度也可满足要求,故选取 265 nm 为 4 种维生素的检测波长。

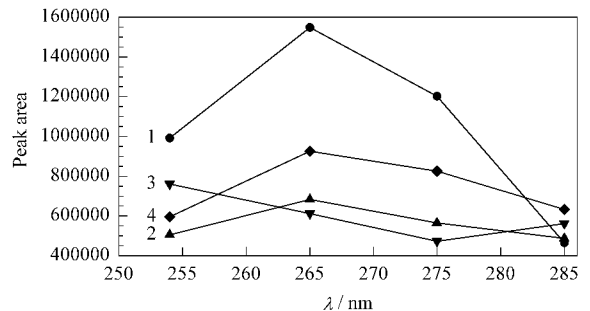


图 1 检测波长对 4 种维生素响应值的影响

Fig.1 Effect of wavelength on simultaneous detection of four water-soluble vitamins

1. V_C(100 mg/L); 2. V_{B₁}(100 mg/L); 3. V_{B₆}(200 mg/L); 4. V_{B₂}(100 mg/L).

2.2.2 流动相中缓冲液的种类

由于通常多用缓冲盐体系作为测定水溶性维生素的流动相,因此分别比较了 0.1 mol/L NH₄Ac-HAc 体系及 0.05 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 体系与甲

醇混合后对维生素分离情况的影响。实验结果表明,在 0.1 mol/L NH₄Ac-HAc (pH 4.5) 体系中 V_{B₂} 保留时间较长(25 min),且基线噪声大;而 0.05 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄(pH 4.5) 体系中,各种维生素保留时间适中,20 min 内均可出峰,且基线噪声小,所以最终选择 KH₂PO₄-H₃PO₄ 体系作为流动相缓冲溶液。

进一步的实验表明,当采用流动相体系为 0.05 mol/L KH₂PO₄(pH 6.0)-甲醇(体积比为 70:30) 时 4 种水溶性维生素的分离情况较好,在 15 min 之内出峰完全(见图 2-a)。

2.2.3 流动相中缓冲液的 pH 值

水溶性维生素在水中易产生电离,电离后的离子在反相柱中的保留时间较短,不利于分离。实验中通过调节流动相中 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值来控制水溶性维生素的电离,从而提高 4 种维生素在色谱柱上的保留能力,达到有效分离。实验结果见图 2。

由图 2 可见,流动相中 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值高低对 V_{B₂} 与其他 3 种维生素之间的分离影响不大,而对 V_C, V_{B₁} 和 V_{B₆} 之间的分离影响很大。pH 值小于 4.5 时, V_{B₆} 与 V_C 峰完全重叠, V_{B₁} 的保留时间小于 V_C 的保留时间。pH 4.5 时, V_{B₆} 与 V_C 峰部分重叠, 3 种维生素的保留时间顺序为 V_{B₁} < V_C < V_{B₆} (见图 2-c)。pH 5.5 时, V_C, V_{B₁} 和 V_{B₆} 基本分开,且保留时间顺序为 V_C < V_{B₁} < V_{B₆} (见图 2-b)。在 pH 6.0 时 4 种维生素达到基线分离,其保留时间顺序与 pH 5.5 时相同(见图 2-a)。故实验最终确定 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值为 6.0。

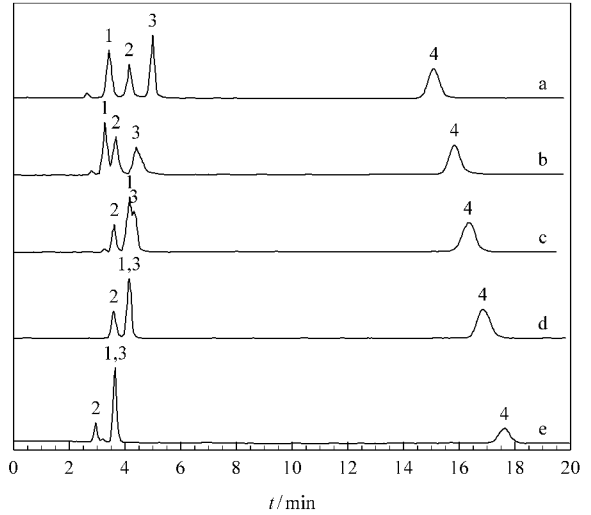


图 2 流动相中缓冲液 pH 值对 4 种水溶性维生素分离的影响

Fig. 2 Effect of the pH of the buffer in the mobile phase on separation of the four water-soluble vitamins

Mobile phase: 0.05 mol/L KH₂PO₄-methanol (70:30, v/v); pHs: a. 6.0, b. 5.5, c. 4.5, d. 3.5, e. 2.5. Detection wavelength: 265 nm.

Peaks: 1. V_C; 2. V_{B₁}; 3. V_{B₆}; 4. V_{B₂}.

2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系与检出限

配制 2.0 ~ 50 mg/L 系列质量浓度的 4 种维生素混合标准溶液,在“1.3”节所述条件下进样测定,峰面积 A 与维生素质量浓度 C (mg/L) 的线性关系见表 1。以信噪比(S/N)为 3 计,测得各维生素的检出限也列于表 1。结果表明,各水溶性维生素在质量浓度为 5.0 ~ 50 mg/L 时线性关系良好。

表 1 4 种水溶性维生素的线性回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and detection limits of the four water-soluble vitamins

Analyte	Linear range/(mg/L)	Regression equation ¹⁾	r	Detection limit ²⁾ /(mg/L)
V _C	2.0 - 50	A = 25200C + 410.44	0.9991	0.65
V _{B₁}	5.0 - 50	A = 15581C + 74.739	0.9994	0.51
V _{B₆}	5.0 - 50	A = 14289C + 97.865	0.9997	0.42
V _{B₂}	2.0 - 50	A = 14821C + 205.25	0.9990	0.34

1) A: peak area; C: mass concentration, mg/L. 2) calculated as S/N=3.

2.3.2 回收率实验

在实际样品测定的基础上分别添加维生素 V_C,

V_{B₁}, V_{B₂}, V_{B₆} 对照品,每个添加水平平行测定 3 次,进行回收率和精密度实验,实验结果见表 2。

表 2 4 种水溶性维生素的回收率和精密度测定结果 (n=3)

Table 2 Recovery and precision of the four water-soluble vitamins (n=3)

Analyte	Added/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%	Analyte	Added/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%
V _C	5.0	4.5	89.2	1.98	V _{B₆}	5.0	4.9	97.4	0.36
	10.0	9.3	92.6	2.68		10.0	9.6	95.5	0.83
	20.0	18.7	93.5	2.21		20.0	18.8	94.0	1.21
V _{B₁}	5.0	4.4	87.6	1.82	V _{B₂}	5.0	4.9	98.2	0.31
	10.0	9.1	91.2	0.76		10.0	10.3	103.2	0.54
	20.0	18.4	92.0	1.02		20.0	19.3	96.5	0.89

2.4 样品测定

按照上述条件测定陕西蒲城产 3 种扁桃仁中 4

种水溶性维生素的含量, 测定结果及与部分果仁的比较结果见表 3, 其中 13# 样品的色谱图见图 3。

表 3 扁桃仁与部分果仁中水溶性维生素含量的比较

Table 3 Comparisons of water-soluble vitamins between in almonds and some kernels

Analyte	Almonds (Shaanxi)			Almonds ^[11] (Xinjiang)	Pine nuts ^[12] (Beijing)	Apricot nuts ^[12] (Hebei)	Peanuts ^[12] (Shaanxi)
	8#	11#	13#				
V _C	ND	ND	ND	-	-	-	-
V _{B₁}	0.812	0.838	0.799	3.50	1.9	0.5	5.4
V _{B₆}	ND	ND	ND	-	-	-	-
V _{B₂}	4.27	4.53	4.41	3.21	2.5	6.9	2.6

- : not determined ; ND : not detected.

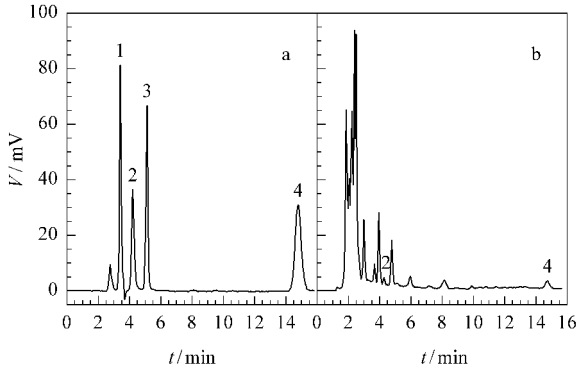


图 3 水溶性维生素混合标准液(a)及 13# 果仁样品(b) 的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the mixture of 4 vitamin standards (a) and an almond sample (b)

Peaks : 1. V_C ; 2. V_{B₁} ; 3. V_{B₆} ; 4. V_{B₂}.

由表 3 可见, 在陕西蒲城产扁桃仁中, V_{B₂} 含量为 4.27 ~ 4.53 mg/kg, 高于新疆产扁桃仁, 是松子仁的 1.71 ~ 1.81 倍, 花生仁的 1.64 ~ 1.74 倍, 但低于杏仁。而 V_{B₁} 的含量为 0.799 ~ 0.838 mg/kg, 低于新疆产扁桃仁, 也低于花生仁和松子仁, 但高于杏仁。用该法未检出 V_C 和 V_{B₆}, 说明扁桃仁中不含或含有极少量 V_C(低于 6.5 mg/kg)和 V_{B₆}(低于 4.2 mg/kg)。

3 结语

采用酸水解法处理样品、流动相等度洗脱, 可简单、快速地测定扁桃仁中 4 种水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆。方法准确、可靠, 重现性好, 对果仁中水溶性维生素的测定具有一定的参考价值。

参考文献 :

[1] Micklander E, Brimer B, Engelsens S B. Appl Spec, 2002, 56(9) : 1 139

[2] Guo Chunhui, Mei Lixin, Zhang Tan, Li Xin. Horticultures Technology of Almond. Beijing : Standards Press of China (郭春会, 梅立新, 张 檀, 李 鑫. 扁桃的园艺技术. 北京 : 中国标准出版社), 2001. 1

[3] Sang S M, Kikuzaki H, Lapsley K, Rosen R T, Nakatani N, Ho C-T. J Agric Food Chem, 2002, 50(16) : 4 709

[4] Frison-Norrie S, Sporns P. J Agric Food Chem, 2002, 50 (10) : 2 782

[5] Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nunez M J. Food Chem, 2004, 85(2) : 267

[6] Sang S H, Cheng X F, Fu H-Y, Shieh D-E, Bai N S, Lapsley K, Stark R E, Rosen R T, Ho C-T. Tetrahedron Lett, 2002, 43(14) : 2 547

[7] Maria Cortes S-M, Montana C-H, Carmen D-M, Maria Esperanza T-I. Eur Food Res Technol, 2000, 210 : 220

[8] Cheng Zhiqiang, Sun Chengjun, Li Yuanqian. Chinese Journal of Analytical Chemistry (成志强, 孙成均, 黎源倩. 分析化学), 2001, 29(9) : 1 068

[9] Li Ke, Wang Huajuan, Pan Chaohui, Yan Xiaoxing, Xia Peiyuan. Chinese Journal of Chromatography (李 克, 王华娟, 潘朝晖, 严晓星, 夏培元. 色谱), 2003, 21(1) : 66

[10] Moreno P, Salvado V. J Chromatogr A, 2000, 870(1 + 2) : 207

[11] Zhang Shuping, Zhou Dongxiang, Yan Bofen, Xia Zebing, Zhu Xinwu. Science and Technology of Food Industry (张淑平, 周冬香, 严伯奋, 夏泽冰, 朱信伍. 食品工业科技), 2000, 21(1) : 36

[12] Research Institute of Nutrient and Food Sanitation, Chinese Academy of Prevention Medical Sciences. Table of Food Components. Beijing : People 's Medical Publishing House (中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表. 北京 : 人民卫生出版社), 1992. 36