

番石榴等蔬果中抗坏血酸的微波辅助提取及高效液相色谱法测定

An HPLC Method with Microwave-assisted Extraction for Determination of Ascorbic Acid in Vegetables and Fruits

刘晨捷 干志彬 傅喆喆* 马明华 余自成
(同济大学附属杨浦医院, 上海, 200090)

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860(2015)33-0021-02

【摘要】目的: 以微波辅助提取-高效液相色谱法提取测定番石榴等蔬果中的抗坏血酸含量。方法: 研究不同溶剂、固液比、微波功率和提取时间对微波辅助提取番石榴中抗坏血酸的影响; 分析比较微波辅助提取和传统溶剂提取的提取效果。结果: 当以0.25%偏磷酸为提取溶剂、固液比1:10、微波功率400 W、提取时间10 min时, 微波辅助提取番石榴中抗坏血酸的提取率最高; 微波辅助提取番石榴中抗坏血酸的提取率比传统溶剂提取要高。结论: 得到了微波辅助提取法提取蔬果中抗坏血酸的最优化条件; 证明了微波辅助提取法更适用于蔬果中抗坏血酸或其他化合物的提取。

【关键词】微波辅助提取; 抗坏血酸; 液相色谱

【Abstract】 Objective For determination of L-ascorbic acid in fruits and vegetables such as guava, a microwave-assisted extraction-HPLC method was established. Methods The effects of solvents, the solid-liquid ratio, microwave power and extraction time on the microwave-assisted extraction were studied. The effects of microwave-assisted extraction and solvent extraction were analyzed and compared. Results The optimal extracting parameters were that the solvent was 0.25% metaphosphoric acid and the solid-liquid ratio was 1:10 and the microwave power was 400W and the extraction time was 10min. The efficiency of microwave-assisted extraction was higher than that of solvent extraction. Conclusion The optimal condition of microwave-assisted extraction for L-ascorbic acid in fruits and vegetables was defined. The assay proved that the new method established was more suitable for the extraction of L-ascorbic acid and other compounds in fruits and vegetables.

【Keywords】 Microwave-assisted extraction; L-ascorbic acid; HPLC

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.33.011

微波辅助提取(Microwave-assisted Extraction, MAE)是以微波能来提取植物中的可溶性材料的一系列技术, 主要在有机溶剂中进行。微波具有很强的穿透力, 可以在物料内外同时均匀、迅速地加热, 能使细胞破裂, 胞内有效成分自由流出, 传递到周围介质被溶解。与传统溶剂提取技术相比, 微波辅助提取具有提取率高、提取时间短、样品用量少等优点^[1,2]。

HPLC(高效液相色谱)法因其分离分析效率高、灵敏度高、样品消耗少、适用范围广, 已在医学、化学、农业等领域中得到了广泛的应用^[3-5]。

本实验以微波辅助提取技术作为前处理方法, 建立了HPLC法分析测定番石榴等蔬果中的抗坏血酸含量, 并对微波辅助提取方法做了全面的条件优化。

1 仪器与试剂

1.1 实验素材

新鲜购入的番石榴、红椒、青椒、黄椒。

1.2 仪器

LWMC-205 可调功率微波化学反应器(南京陵江科技开发有限责任公司); AP-9901S 真空泵(200V/50HZ, 天津奥特塞恩斯仪器有限公司); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); 岛津 LC-10AD 二元泵, 岛津 SPD-10A 紫外检测器, 岛津 CTO-10A 柱温箱。

1.3 试剂

偏磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、冰醋酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司)、抗坏血酸(Sigma, St. Louis, MO, USA)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Dikma C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 柱温: 30℃。流动相 0.25%偏磷酸: 甲醇(98:2), 流速 1.0 ml·min⁻¹。检测波长: 240 nm。进样量: 20 μL。

2.2 微波辅助提取

在本实验中我们参考了蒋琼凤提取凤尾蕨中总黄酮的工作中使用的试验方法^[6]。

2.2.1 提取溶剂对抗坏血酸提取率的影响

将番石榴样品去皮，取果肉粉碎打匀，取 2 g 置于 100 ml 烧瓶中，加入 20 ml 提取溶剂，溶剂种类分别为：0.25%偏磷酸、0.5%偏磷酸、1%偏磷酸、HCL 溶液(PH3)、HAc 溶液(PH3)，混匀称重，后置于微波反应提取装置中。按微波功率为 400 W，提取时间为 10 min，进行提取。提取后将样品放冷、补重，混匀后 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过滤，后取样按 HPLC 法测定。

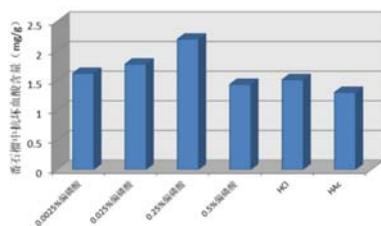


图1 提取溶剂对抗坏血酸提取的影响

实验结果如图 1 所示，故在微波提取功率 400 W，提取时间 10 min 的条件下，以不同溶剂提取抗坏血酸时，0.25%偏磷酸作为溶剂时提取率高于其他溶剂。因此微波辅助提取抗坏血酸的溶剂宜选用 0.25%偏磷酸。

2.2.2 固液比对抗坏血酸提取率的影响

将番石榴样品去皮，取果肉粉碎打匀，取 2 g 置于 100 ml 烧瓶中，按一定固液比 (g : ml) 加入 0.25%偏磷酸，其比例分别为 1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12。混匀称重，后置于微波反应提取装置中。按微波功率为 400 W，提取时间为 10 min，进行提取。提取后将样品放冷、补重，混匀后 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过滤，后取样按 HPLC 法测定。

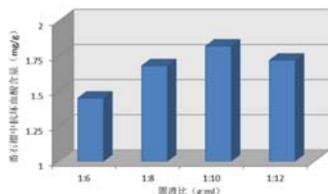


图2 固液比对提取的影响

实验结果如图 2 所示，故当固液比为 1:10 时，使用微波辅助提取法提取番石榴中的抗坏血酸的得率最高、效果最好。因此微波辅助提取抗坏血酸的固液比宜选用 1:10。

2.2.3 提取时间与微波功率对抗坏血酸提取率的影响

将番石榴样品去皮，取果肉粉碎打匀，取 2 g 置于 100 ml 烧瓶中，加入 20 ml 0.25%偏磷酸，称重，后置于微波反应提取装置中。分别按微波提取功率为 200 W、400 W、600 W，提取时间为 2 min、5 min、10 min、15 min，进行实验。提取后将样品放冷、补重，混匀后 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过滤，后取样按 HPLC 法测定。

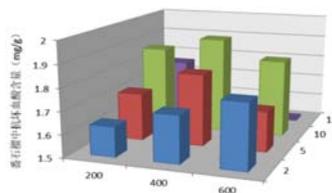


图3 提取时间与微波功率对抗坏血酸提取的影响

实验结果如图 3 所示，故当微波功率为 400 W，提取时间为 10 min 时，抗坏血酸的得率最高。

2.3 微波辅助提取番石榴中抗坏血酸含量的方法学验证

2.3.1 色谱分离结果

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 3.108 min，检测限为 10 ng•ml⁻¹。

2.3.2 线性关系考查

维生素 C 标准溶液的制备：准确称取 10 mg 维生素 C 对照品，用 10 ml 偏磷酸溶解后转移至 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 ml、3 ml、5 ml、7 ml、10 ml 维生素 C 标准储备液于 100 ml 棕色容量瓶中，用 10 ml 偏磷酸溶解并定容，分别制成浓度为 1 μg•ml⁻¹、3 μg•ml⁻¹、5 μg•ml⁻¹、7 μg•ml⁻¹、10 μg•ml⁻¹ 的系列标准维生素 C 标准溶液，用 0.45 μm 滤膜过滤后按“2.1”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 (μg•ml⁻¹) 进行直线回归。

线性范围 1~10 μg•ml⁻¹，线性方程：y = 5819.9x + 170.32，R₂ = 0.9998。

本方法检测限为 10 ng•ml⁻¹，定量限为 100 ng•ml⁻¹。

2.3.3 重复性实验

将同一番石榴样品按照“2.1”中的色谱条件重复进样 6 次，抗坏血酸平均含量为 1.8041 mg•g⁻¹，本测定试验的相对标准偏差为 3.8%，表明本方法的精密度高，重现性较好。

2.3.4 加标回收率实验

分别称取 3 份 2.0 g 匀浆番石榴样品，分别加入 2 ml、4 ml、10 ml 的 0.1 mg•ml⁻¹ 维生素 C 标准液，按“2.1”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。回收率为 (96.2±7.1) %。

2.4 溶剂提取

将番石榴样品去皮，取果肉粉碎打匀，取 2 g 置于 100 ml 烧瓶中，加入 20 ml 0.25%偏磷酸，充分振摇、涡旋混匀，取样按 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过滤，后取样按 HPLC 法测定。

按最优化后的微波辅助提取法提取后测得的抗坏血酸含量(MAE)1.8041 mg•g⁻¹，传统溶剂提取后测的含量(SE)1.5086 mg•g⁻¹，将两者进行比较可知使用最优化条件下的微波辅助提取法，提取番石榴中抗坏血酸，其抗坏血酸得率要高于使用溶剂提取法。

2.5 将方法推广于其他蔬果中抗坏血酸的提取测定

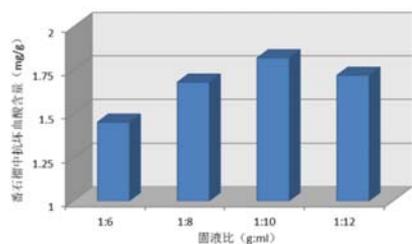


图4 微波辅助提取法应用于四种蔬果

图4比较了运用于四种不同蔬果时微波辅助提取法和溶剂提取法的提取率。可见在各类蔬果样品中,相较于溶剂提取法,微波辅助提取法提取抗坏血酸的提取率更高,是更适用的提取方法。

3 讨论

抗坏血酸是维持机体正常生理功能的重要维生素之一,是多种食物的重要营养素^[7,8]。利用微波辅助提取技术提取抗坏血酸,具有高效、节能、无污染等优点,可为抗坏血酸的工业化生产提供理论指导。本实验的目的为探究番石榴中抗坏血酸的最优提取方法,并验证其优越性。

实验建立了微波辅助提取测定番石榴等蔬果中抗坏血酸含量的方法,设计了单因素实验,考察了提取溶剂、固液比、微波功率及提取时间对抗坏血酸得率的影响。

抗坏血酸在酸性条件下较稳定,故选用酸性溶液作为溶剂。酸性溶剂的pH会影响抗坏血酸的稳定性,而种类则会影响其溶解度。图1中前四种溶剂的实验显示了相同溶质的酸溶液中pH对抗坏血酸浓度的影响,结果显示存在最佳pH使抗坏血酸稳定,不宜过高不宜过低。后两种溶剂的实验研究了当pH与0.25%偏磷酸相同的情况下,不同酸溶液对抗坏血酸浓度的影响,结果显示在偏磷酸、HCL、HAc中,偏磷酸最适合作为溶剂。

由图2可知,随着偏磷酸溶剂的增加,提取出的抗坏血酸质量的明显增加。当固液比超过1:10时,提取出的抗坏血酸增加有限。考虑到成本以及溶剂的回收等问题,认为1:10(g/ml)为最佳固液比。

当提取时间一定时,随着微波功率的变化,抗坏血酸的得率呈现不同规律的变化。当提取时间较短时(2min),一般随功率的增长而增长;当提取时间中等时(5min、10min),功率过低或过高都会影响得率,过低则提取不完全,过高则加重抗坏血酸的氧化与破坏过程;当提取时间较长时,由于过长时间

间加热,各微波功率下,抗坏血酸得率都较低,且随功率的增大,抗坏血酸得率越低,亦即破坏越严重。

通过实验得出微波辅助提取番石榴中抗坏血酸的最佳工艺:提取溶剂为0.25%偏磷酸;固液比为1:10g·ml⁻¹;微波功率为400W;提取时间为10min。按最优化后的微波辅助提取法提取后测得的抗坏血酸含量可达1.8041mg·g⁻¹。

本研究结果与徐艳阳^[9]等研究得出的结论具有一致性,可为微波辅助提取方法的研究与改进提供指导。

将该方法与传统溶剂法进行比较,该方法测得的抗坏血酸含量是传统溶剂法的119.6%,从而证明该提取方法的高效性。将该方法推广到青椒、红椒、黄椒中,均得到相同结论。综上所述,微波辅助提取技术是一种较好的果蔬中抗坏血酸提取新工艺,值得临床推广。

参考文献:

- [1]吴龙琴,李克.微波萃取原理及其在中草药有效成分提取中的应用[J].中国药业,2012,21(12):110-112.
- [2]杨柯.高效液相色谱法对胆宁片中金钱草含量的测定[J].中医临床研究,2012,4(23):34-35.
- [3]Upadhyay R,Ramakshmi K,Rao L.Jagan Mohan.Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans[J].Food Chem,2012,130(1):184-188.
- [4]Tsao YC,Wang YC,Wu SF,et al.Microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the rapid determination of organophosphate esters in aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry [J].Talanta,2011,84(2):406-410.
- [5]Liazid A,Guerrero RF,Canto E,et al.Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins [J].Food Chem,2011,124(3):1238-1243.
- [6]蒋琼凤.微波辅助提取凤尾蕨中总黄酮的工艺研究[J].湖北农业科学,2014,53(21):5238-5240.
- [7]贺家亮,李开雄,刘海燕.高效液相色谱法在食品分析中的应用[J].食品研究与开发,2008,(29):175-177.
- [8]苏家辉,林炳国,吴声振,等.高效液相色谱法测定中药陈皮中橙皮苷的含量[J].中医临床研究,2014,6(12):131-132
- [9]徐艳阳.微波辅助提取玉米苞叶黄酮的工艺优化[J].食品研究与开发,2014,35(13):74-79.

编辑:赵聪 编号:EB-15091703F(修回:2015-09-30)

相似文献:

反相高效液相色谱法测定活血壮筋胶囊中血竭素的含量

目的:建立测定活血壮筋胶囊中血竭素高氯酸盐含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱条件:Shim-pack VP-ODS C18(250mm×4.6mm,5μm),流动相为乙腈-0.05mol/L磷酸二氢钠溶液(43:57),流速为1.0mL·min⁻¹,检测波长为440nm。结果:血竭素高氯酸盐进样量在0.08064~0.40320μg·mL⁻¹范围内,与峰面积积分值呈良好线性关系(r

=0.9999,n=5);平均回收率为98.6%,RSD=1.64%(n=6)。结论:本方法操作简便、快速、准确,可作为血竭素高氯酸盐的定量分析方法。

作者:于秀玲 李伟

刊名:中医临床研究 2015年23期 24-25页

英文刊名: Clinical Journal of Chinese Medicine

中图分类号: R278