

新鲜水果及干制品中Vc的提取与高效液相色谱测定方法研究

王忠合, 卢 芬, 刁佳裕, 刘谋泉, 王 军*

(韩山师范学院生命科学与食品工程学院, 广东 潮州 521041)

摘要: 为探究提取剂和测定方法对新鲜水果及干制品中Vc含量测定的影响, 分别以草酸和偏磷酸为提取剂, 优化高效液相色谱法测定15种新鲜水果及干制品中Vc的条件。结果表明, 2%偏磷酸作为新鲜水果及干制品中Vc的提取剂效果较好, 优化后的色谱条件: C_{18} 色谱柱、体积比为95:5的20 mmol/L的磷酸二氢钾(pH3.0)与甲醇为流动相、等度洗脱流速0.80 mL/min、检测波长254 nm、柱温30 °C, 在质量浓度1~80 mg/L内有良好的线性关系, 1%草酸和1%偏磷酸制备的标液线性回归方程分别为 $y=67.6238x-47.0253(R^2=0.99988)$ 和 $y=61.5964x+10.0005(R^2=0.99980)$, 加标回收率(%)分别为 96.94 ± 1.29 、 99.78 ± 0.53 , 日间变异系数分别为6.95%和3.12%。与2,6-二氯酚靛酚滴定法相比, 高效液相色谱法测定结果准确可靠, 可用于新鲜水果及干制品中Vc含量的测定, 由高效液相色谱法所测定的15种新鲜水果中Vc含量为2.51~163.58 mg/100 g、15种干制水果中Vc含量为20.72~775.48 mg/100 g。

关键词: L-抗坏血酸; 高效液相色谱法; 提取剂; 水果; 干制方法

中图分类号: R 284.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2022)07-0268-09

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2022.07.028

Extraction and Assaying Methods by High Performance Liquid Chromatography of Vc in Fresh Fruits and Dried Products

WANG Zhonghe, LU Fen, DIAO Jiayu, LIU Mouquan, WANG Jun*

(School of Life Science and Food Engineering, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: To explore the influence of extraction agents and assaying methods on determination of Vc content in fruits and dry products, oxalic acid and metaphosphoric acid were used as extraction agents to optimize the conditions for the determination of Vc in 15 fresh fruits and dry products by high performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that 2% metaphosphate was a good extractant for Vc in fresh fruit and dry products. Chromatographic conditions were as follows: Eclipse SB- C_{18} column, 20 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 3.0) and methanol with a volume ratio of 95:5 as mobile phase, isometric elution flow rate 0.80 mL/min, detection wavelength 254 nm, column temperature 30

收稿日期: 2022-03-12

*通信作者

基金项目: 广东省基础与应用基础研究项目(2018A0303070006); 广东省科技发展专项资金(公益研究与能力建设方向)项目(2016A020210135); 教育厅重点学科项目(2019-GDXK-0032)。

作者简介: 王忠合, 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品安全检测技术。

℃. There was a good linear relationship in the mass concentration range of 1~80 mg/L. The linear regression equation of standard solution dissolved by 1% oxalic acid and 1% metaphosphoric acid was $y=67.6238x-47.0253$ ($R^2=0.9999$) and $y=61.5964x+10.0005$ ($R^2=0.9998$), respectively. The average recoveries (%) of added standards were 96.94 ± 1.29 and 99.78 ± 0.53 , and the inter-day coefficients of variation were 6.95% and 3.12%, respectively. Compared with 2,6-dichlorophenol indophenol titration, the HPLC methods were accurate and reliable, which can be widely used for the determination of Vc in fresh fruits and dry products. The Vc content in 15 kinds of fresh fruits and dry fruits were 2.51~163.58 mg/100 g and 20.72~775.48 mg/100 g by HPLC.

Key words: L-ascrobic acid; high performance liquid chromatography; extractant; fruits; drying methods

L-抗坏血酸, 又称为V_C, 学名是L-3-氧代苏己糖醛酸内酯, 广泛存在于新鲜的水果和蔬菜中, 具有广泛的生理功能, 参与机体的各种氧化还原反应, 对人体的生命活动和新陈代谢都有重要的意义。L-抗坏血酸分为还原型和脱氢型2种(图1), 其中还原型的L-抗坏血酸遇氧、热、光、碱性物质等, 易被氧化成L-脱氢抗坏血酸; 而D-异抗坏血酸是L-抗坏血酸的同分异构体, 结构式如图1所示, 化学性质与L-抗坏血酸相似, 抗氧化性较L-抗坏血酸好, 但生理活性非常低, 仅为L-抗坏血酸的1/20^[1]。V_C的提取及含量测定的方法已有较多研究报道^[2-6], 常用酸性提取剂如草酸、偏磷酸、乙酸、盐酸等, 常以2%的偏磷酸或草酸作为提取剂时提取效率最高, 样品稳定性也可满足要求。而V_C测定的方法主要有紫外分光光度法、2,6-二氯酚滴定法、高效液相色谱法、荧光法、2,4-二硝基苯肼比色法等, 对于无色或颜色较浅的样品, 2,6-二氯酚滴定法是测定还原型V_C含量简便易行的方法, 且为国家标准GB 5009.86—2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》的分析方法之一, 但对滤液颜色较深的样品需进行过滤脱色处理。然而, 现行国标GB 5009.86—2016中测定V_C含量的高效液相色谱法采用50 mmol/L的磷酸二氢钾和添加十六烷基三甲基铵离子对试剂为流动相, 具有灵敏度较高、选择性较好、测定迅速、分析时间短、样品处理简单和测定结果重复性较好等优点, 但该离子对试剂为表面活性剂类, 易起泡、脱气操作困难, 且测定过程中容易产生气泡, 导致基线不稳、发生漂移, 影响定性和定量分析。为解决液相色谱测定中的上述难题, 本论文拟探讨提取剂和液相色谱条件对新鲜水果及其干制品中V_C含量测定的影响, 为准确测定新鲜水果及其干制品中V_C的含量和评定提供参考。

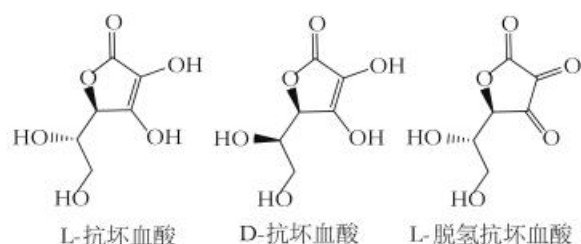


图1 抗坏血酸及其异构体的化学结构式

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

色谱级乙腈、色谱级甲醇、偏磷酸、草酸、L-抗坏血酸(含量>99%): 美国Sigma公司; 磷酸二氢钾、2,6-二氯酚(含量>98%)、碳酸氢钠、二硫苏糖醇: 生工生物工程(上海)股份有限公司; 超纯水: 实验室自制; 草莓、番石榴、圣女果、橘子、葡萄、橙子、柠檬、猕猴桃、苹果、梨、火龙果、枇杷、杨桃、青枣、芒果等15种新鲜水果: 市售。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 Infinity超高压液相色谱仪: 由二元泵、柱温箱、自动进样器、脱气机、紫外检测器组成, 美国安捷伦有限公司; FD-1D-5D冷冻干燥机: 北京博医康实验仪器有限公司; GZX-9146MBE鼓风干燥箱: 上海博迅实业有限公司; ZX4漩涡振荡器: 意大利VELP公司; JSP-200型高速多功能粉碎机: 浙江省永康市金穗机械制造有限公司; GWA-UN1-10超纯水器: 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 新鲜水果干制处理及样品提取 将新鲜水果用超纯水洗净后切开, 取100 g可食部分, 分别加入等质量的2%草酸溶液或2%偏磷酸溶液, 迅速捣成匀浆。准确称取10 g匀浆样品(精确至0.01 g)于烧杯中, 分别用1%的草酸和1%的偏磷酸溶液

将样品匀浆转移至50 mL棕色容量瓶中, 震荡摇匀, 并稀释至刻度。全部转移至50 mL离心管中, 超声提取5 min后, 于4000 r/min离心5 min, 取上清液待测。分析前用0.45 μ m的水相滤膜过滤, 结果以100 g新鲜水果中V_C的含量表示。

分别取新鲜水果的可食部分切片厚度为2.5~3.5 mm, 将切片后的水果置于培养皿中, -20 $^{\circ}$ C冷冻过夜, 再放入真空冷冻干燥机中进行冷冻干燥(温度: -80 $^{\circ}$ C, 冷冻干燥时间: 24 h, 真空度<10 Pa), 干燥至恒重。准确称取1 g干制水果样品(精确至0.01 g), 用1%草酸或1%偏磷酸溶液研磨后将试样转移至50 mL棕色容量瓶中, 振摇并定容。全部转移至50 mL离心管中, 超声提取5 min后, 于4000 r/min离心5 min, 取上清液待测^[7]。分析前用0.45 μ m的水相滤膜过滤, 结果以100 g干制水果中V_C的含量表示。

1.3.2 标准溶液配制 准确称取V_C的标准品0.01 g(精确至0.1 mg), 用1%草酸或1%偏磷酸溶液在棕色容量瓶中定容至10 mL, 配成1.0 mg/mL的标准贮备液。分别吸取适量的V_C标准贮备液, 用1%草酸或偏磷酸溶液稀释成浓度分别为0.2~80 mg/L的标准系列工作液, 过0.45 μ m的水相滤膜后注入液相色谱中测定。临用时配制。

1.3.3 液相分离条件探讨 色谱柱: Eclipse SB-C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 美国安捷伦公司); 检测器: 二极管阵列检测器, 波长254 nm; 进样量: 20 μ L; 分别探讨流动相A(草酸、甲酸、乙酸、硫酸、磷酸、磷酸二氢钾等, pH3.0)、流动相B甲醇的比例、流速(0.4~1.2 mL/min)、柱温(25、30 $^{\circ}$ C)等条件变化对V_C分离及定量测定的影响, 记录色谱峰的保留时间和峰面积, 采用外标法定量。

1.3.4 回收率实验 在样品中分别加入一定量的V_C标准品, 按1.3.1的方法处理后的样品, 分别测定其浓度, 将得到的峰面积代入线性回归方程计算含量, 按照下式计算回收率^[8]:

$$\text{回收率}(\%) = [(C_1 - C_0) \cdot V / m] \times 100$$

式中: C₁为加标样的浓度, mg/L;

C₀为对照样的浓度, mg/L;

V为样液体积, mL;

m为加标量, μ g。

1.3.5 精密实验 按1.3.1的方法制备样品和色谱条件重复进样测定5次, 将得到的5组峰面积值分别代入回归方程求得V_C含量, 计算其精密性。

1.3.6 2,6-二氯酚滴定法测定V_C的含量 准确吸取1.3.1制备的样品滤液10 mL于50 mL锥形瓶中, 用标定过的2,6-二氯酚溶液滴定, 直至溶液呈粉红色15 s不褪色为止。同时做空白实验。若滤液有颜色, 按每克样品加0.4 g白陶土脱色后再过滤。按照下式计算样品中V_C的含量:

$$V_c \text{ 的含量}(\%) = [(V - V_0) \cdot T \cdot F / m] \times 100$$

式中: V为滴定试样所消耗2,6-二氯酚溶液的体积, mL;

V₀为滴定空白所消耗2,6-二氯酚溶液的体积, mL;

T为2,6-二氯酚溶液的滴定度, mg/mL;

F为稀释倍数;

m为试样质量, g。

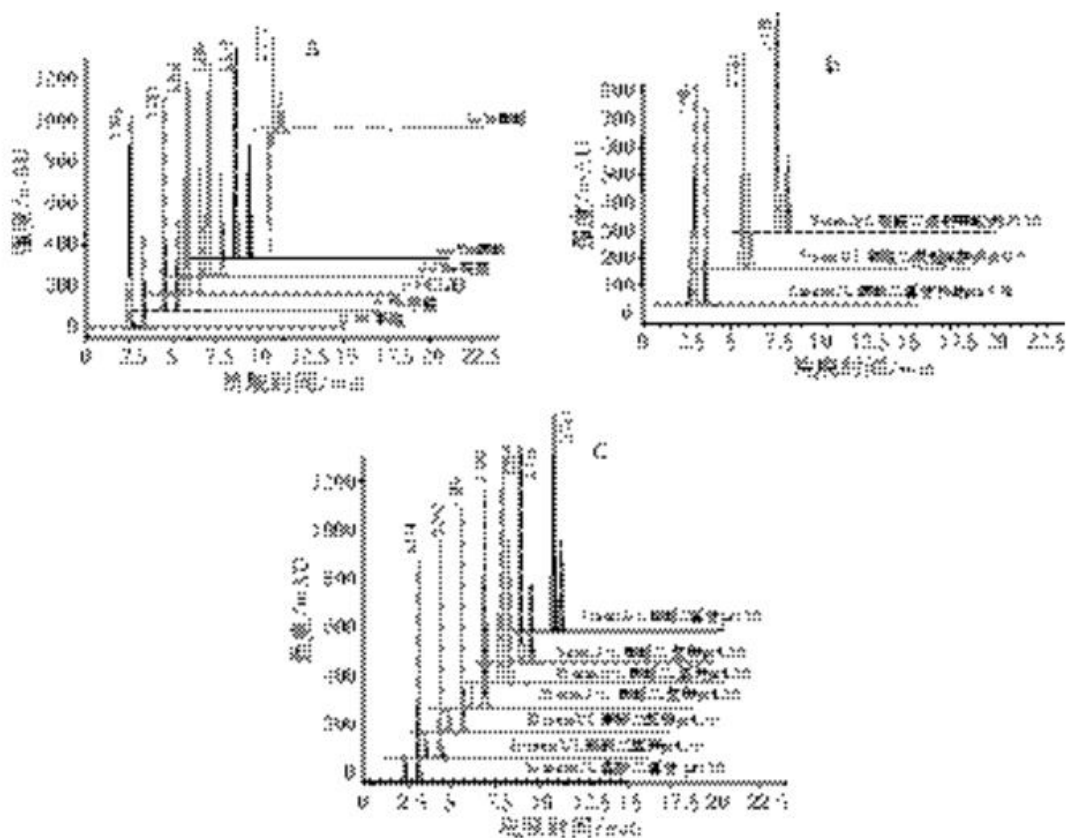
1.4 数据处理

实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差SD表示, 提取剂和测定方法间的差异性用独立样本t检验进行显著性分析, 检验水平P<0.05; 不同水果间V_C含量差异性用SPSS 17.0进行一维方差分析, 采用Duncan(邓肯)检验, 检验水平P<0.05。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

采用1.0%草酸配制40 mg/L的标准溶液, 柱温25 $^{\circ}$ C, 水相与有机相的体积比为95:5, 6种酸性溶液以不同浓度和pH值组成水相体系, 探讨其对V_C标准溶液分离效果的影响, 结果如图2和表1所示。从图2A和表1可知, 草酸和V_C在各色谱图上均出现2个色谱峰, 各种酸性溶液作为流动相的水相均能达到分离的目的, 而1%的草酸(w/v)作为流动相的分离效果较差, 且有一大的溶剂倒峰, 影响目标物的准确定量, 浓度为0.1%草酸、0.1%甲酸、0.1%乙酸和0.01%硫酸、0.05%磷酸的pH值在2左右, 对V_C的分离较好, 保留时间均大于3.2 min, 半峰宽较小, 峰型较好, 分离度也均大于1.5, 这与文献^[5,9-12]报道的结果一致, 但是由于硫酸、磷酸及盐酸的酸性较强, 单独作为流动相用于色谱分离的研究越来越少。磷酸盐缓冲液无紫外吸收, pH值范围广, 是液相分离中常用的流动相之一, 因而本文也探讨了不同浓度和不同pH值的磷酸盐缓冲液作为流动相的分离效果。从图2B可知, 不调pH值和用盐酸调pH3.0的磷酸二氢钾作为流动相的水相时, V_C的保留时间较短, 分



注: A.不同的酸溶液,B.不同pH的磷酸二氢钾,C.不同浓度的磷酸二氢钾。

图2 流动相对V_c分离效果的对比

表1 流动相对V_c分离效果的影响

流动相	pH值	摩尔浓度/ (mmol/L)	保留时间 /min	检出限/ (mg/L)	对称 因子	塔板数	K'	半峰宽/ min	分离度
1%(w/v)草酸	1.23	111	3.240	—	0.61	5600	0.31	0.1023	0.56
0.1%(w/v)草酸	2.96	11.1	3.326	0.115	0.90	6882	0.34	0.0944	2.56
0.1%(v/v)甲酸	2.47	26.5	3.261	0.081	0.74	8022	0.31	0.0857	4.50
0.1%(v/v)乙酸	3.07	17.5	3.282	0.229	0.74	7654	0.32	0.0883	4.16
0.01%(v/v)硫酸	2.34	1.84	3.299	0.077	0.78	7709	0.33	0.0889	4.66
0.05%(v/v)磷酸	2.17	8.13	3.337	0.071	0.76	8007	0.34	0.0878	4.59
0.068%(w/v)磷酸二氢钾	4.60	5	3.086	0.070	0.85	8107	0.24	0.0806	3.64
0.014%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	1	1	3.102	0.056	0.69	6586	0.24	0.0900	3.21
0.068%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(盐酸调)	5	5	2.776	0.517	0.71	3747	0.11	0.1067	2.20
0.068%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	5	5	3.129	0.030	0.78	7533	0.26	0.0848	4.06
0.136%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	10	10	2.909	0.031	0.73	6878	0.17	0.0825	3.13
0.272%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	20	20	3.118	0.035	0.77	8649	0.25	0.0787	5.87
0.408%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	30	30	3.148	0.045	0.77	8610	0.26	0.0797	5.90
0.544%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	40	40	3.202	0.067	0.79	8494	0.28	0.0817	5.68
0.68%(w/v)磷酸二氢钾 3.00(磷酸调)	50	50	3.113	0.071	0.77	8577	0.24	0.0789	5.11

注: “—”表示无法计算。

离效果一般,而用磷酸调pH3.0后能形成较好的缓冲体系,其分离效果较好,且随着磷酸二氢钾浓度的增加,V_c的保留时间延长,分离度增大,检测限呈现先降低后逐渐增大的趋势,如图2C所示。而高浓度的磷酸盐缓冲液作为水相虽然可以

增加分离效果,但在有机相中的溶解度低、易结晶析出磨损活塞杆,且不易挥发,质谱分析时无法选用,许多研究者常采用低浓度的磷酸盐缓冲液^[7,13]或甲酸^[14]作为水相体系分离食品中的V_c和异构体,高浓度的磷酸盐缓冲液作为水相仅见于

分离血浆样品^[15]和国标GB 5009.86—2016中与离子对试剂协同分离测定 V_c 的报道,离子对试剂是一类表面活性剂,测定过程中容易产生气泡,导致基线不稳、发生漂移,影响定性和定量分析,且无法用于质谱分析中。20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(磷酸调pH3.0)作为水相分离目标物的峰高最大,分离效果最好,峰型对称、无拖尾,因而后续研究选用此浓度的磷酸盐缓冲液作为水相体系,并探讨其分离情况。

2.2 流动相比比例的选择

采用1.0%的草酸配制40 mg/L的标准溶液,柱温25℃,流速为1.0 mL/min,20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0, A相)与甲醇(B相)为流动相,探讨流动相中甲醇比例对 V_c 分离效果的影响,结果如表2所示。由表2可知,甲醇比例增加 V_c 的保留时间缩短,且与草酸峰的时间间隔也变小,其时间差值由1.336 min缩短至0.199 min,反相 C_{18} 柱的填料为不同键合的硅胶基,抗坏血酸为多羟基化合物,极性大,在缓冲盐中的色谱行为较好,甲醇为质子化的溶剂,因此甲醇比例增加更容易洗脱出 V_c 。同时,甲醇比例太高,分离度<1.5,分离效果差;甲醇比例太低,色谱峰展宽,样品中拖尾峰明显,分离效果较差,因而流动相中A相与B相的比例选择95:5较优。

表2 流动相中甲醇比例对 V_c 分离效果的影响

A相:B相	草酸保留时间/ min	V_c 保留时间/ min	V_c 半峰宽/ min	分离度
100:0	2.541	3.877	0.0597	9.55
98:2	2.518	3.479	0.1078	5.25
95:5	2.525	3.128	0.0834	4.07
90:10	2.487	2.860	0.0774	2.21
80:20	2.417	2.616	0.0670	1.06

2.3 流速的选择

采用1%的草酸配制40 mg/L的标准溶液,柱温25℃,20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0)与甲醇的体积比为95:5,探讨流速为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min对 V_c 分离效果的影响,结果如图3和表3所示。

表3 流速对 V_c 分离性能的影响

流速/ (mL/min)	保留时间 /min	检测限 /(mg/L)	对称 因子	塔板数	K'	半峰宽/ min	分离 度
0.4	8.260	0.071	0.76	13540	0.33	0.1671	7.16
0.6	5.480	0.039	0.77	11986	0.32	0.1178	6.85
0.8	4.083	0.035	0.79	10522	0.31	0.0937	6.26
1.0	3.118	0.030	0.79	8830	0.25	0.0848	5.94
1.2	2.718	0.023	0.82	8103	0.31	0.0710	4.95

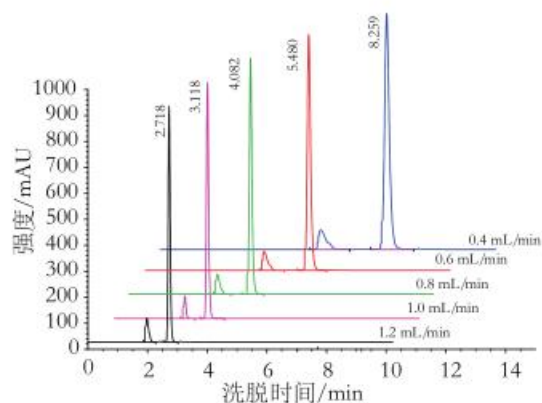


图3 流速对 V_c 分离效果的对比

由图3可知,不同流速对 V_c 的保留时间和分离效果影响较大,流速增大保留时间缩短。由图3和表3还可知,流速过小峰展宽、并有拖尾现象,但流速过大保留时间太短、分离效果差,因而较适宜的流速选择为0.8 mL/min。

2.4 提取溶剂和柱温的选择

表4 溶剂对 V_c 分离峰响应的影响

质量浓度/ (mg/L)	1%草酸			1%偏磷酸		
	保留时间/min	峰面积/mAu-s	检出限/(mg/L)	保留时间/min	峰面积/mAu-s	检出限/(mg/L)
1	3.974	83.990±7.809a	0.021	3.975	63.964±8.920b	0.040
5	3.974	430.323±47.540a		3.975	394.865±74.219b	
10	3.976	847.215±55.712a		3.976	814.050±124.674b	
20	3.976	1677.582±142.727a		3.976	1568.272±234.419b	
40	3.978	3296.317±251.844a		3.976	3190.319±414.971b	
60	3.976	4848.055±549.472a		3.976	4422.015±151.659b	
80	3.975	6653.332±404.326a		3.978	5917.906±383.052b	

注:同一行标注不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

采用1%的草酸和1%的偏磷酸配制1~80 mg/L的系列标准工作溶液,柱温25℃,20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0)与甲醇的体积比为95:5,流速0.8 mL/min,不同溶剂对V_C响应和检测限的影响如表4所示。不同溶剂和柱温对20 mg/L的V_C分离效果的影响如图4所示。

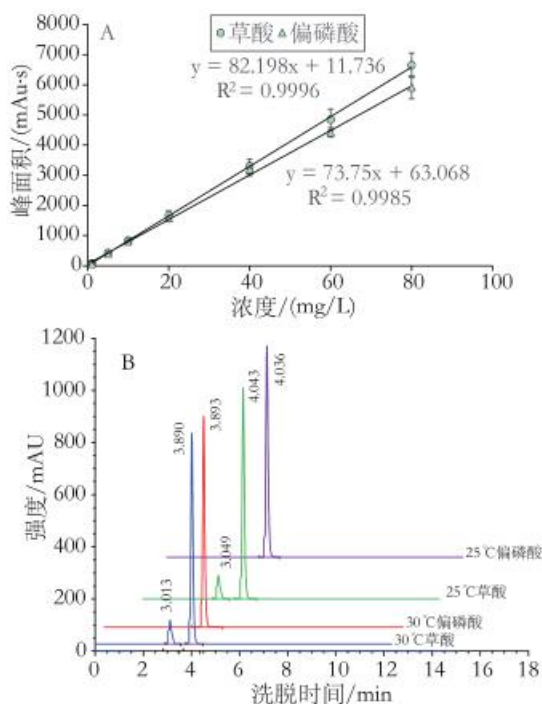


图4 提取溶剂和柱温对V_C标准曲线(A)及分离效果(B)的影响

由表4可知,用1%的草酸或1%的偏磷酸配制不同浓度的V_C溶液进行液相色谱分析,其保留时间无显著差异($P>0.05$),而色谱峰面积差异显著($P<0.05$),用1%草酸制备的标液测定的峰面积较大且波动较小,回归方程的相关系数更大,如图4A所示,其在较低浓度时的响应信号更强检出限更低。草酸溶液在实验测定波长254 nm处有吸收峰,而偏磷酸溶液在色谱图中无吸收峰,如图4B所示,这为选择合适的溶剂提取样品中的V_C提供一定的指导。不同柱温对V_C的保留时间影响显著($P<0.05$),柱温由25℃升高至30℃后,V_C的保留时间提前约0.15 min,通常柱温越高,产生的色谱峰越窄,峰容量越高,且其半峰宽和分离效果较好,因而后续实验选取柱温30℃。

2.5 提取溶剂对V_C含量测定的影响

由图5可知,2%的草酸和2%的偏磷酸提取的新鲜草莓样液采用高效液相色谱法测定的分离效果好,用2%的草酸作为提取溶剂的色谱图中有一

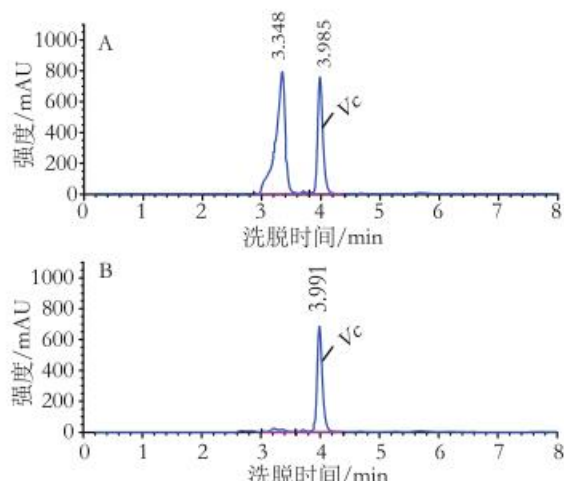


图5 2%草酸(A)和2%偏磷酸(B)提取的草莓样品中V_C测定色谱图

草酸提取溶剂峰(100 g新鲜水果的可食部分与等质量的2%草酸溶液混匀,捣成匀浆,草酸浓度变为1%),而用2%的偏磷酸作为提取溶剂的色谱图中没有此提取溶剂峰,这表明偏磷酸在254 nm测定的紫外区无吸收、对V_C的测定影响更小。另有相关文献^[3]表明以草酸作为提取剂时,脱氢抗坏血酸的还原效率较低,还原后溶液的杂质偏多,对定量分析影响较大。而以偏磷酸作为提取剂时,样品还原效率、稳定性、提取效果、样品的稳定性均能满足要求,且以2%偏磷酸溶液的效果最佳。

2.6 标准曲线、检测限及定量限

分别以1%草酸和1%偏磷酸配成浓度为1~80 mg/L的V_C标准工作液,按照柱温30℃,20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0)与甲醇的体积比95:5,流速0.8 mL/min,采用高效液相色谱法测定。浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,分别得到线性回归方程为 $y = 67.6238x - 47.02527$ ($R^2 = 0.99988$)和 $y = 61.59642x + 10.00052$ ($R^2 = 0.99980$),表明峰面积与V_C标准溶液质量浓度在1~80 mg/L时呈良好的线性关系。采用最优色谱参数测定V_C的含量,以3倍信噪比(S/N)作为检测限,结果分别为0.11 mg/100 g和0.20 mg/100 g;10倍信噪比(S/N)作为定量限(LOQ),结果分别为0.34 mg/100 g和0.65 mg/100 g。

2.7 回收率及精密度

以新鲜草莓为例,采用2%草酸和2%偏磷酸为提取剂按1.3.4的方法进行加标实验和按1.3.5的方法进行精密度实验,同一天内重复测定5次,日内

测定结果如表5所示。以5种干制水果为例,采用1%偏磷酸溶液为提取剂按1.3.4的方法进行加标回收实验,分别间隔3~5 d重复测定3次,日间测定结果如表6所示。

表5 新鲜草莓样品中V_C的精密度和加标回收率实验结果

提取剂	样品中含量/(mg/100 g)	变异系数/%	加标量/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)	回收率/%
2%草酸	41.45±2.88	6.95	5	46.28	96.94±1.29
			50	89.40	
			200	238.21	
2%偏磷酸	51.60±1.61	3.12	5	46.41	99.78±0.53
			50	91.59	
			200	241.17	

由表5可知,2%偏磷酸作为提取剂采用高效液相色谱法测定新鲜草莓样品中V_C含量的日内变异系数低于使用2%草酸作为提取剂的日内变异系数,这表明采用2%偏磷酸作为提取剂的测定结果精密度更高,且加标回收率实验也表明2%偏磷酸为提取剂方法重复性更好,结果更加稳定。由表6可知,1%草酸为提取剂,采用高效液相色谱法测定的5种干制水果中V_C的回收率为94.09%~102.00%,日间变异系数为1.61%~5.79%,可满足要求。1%偏磷酸为提取剂,采用高效液相色谱法测定的5种干制水果中V_C的回收率为96.31%~100.49%,日间变异系数为1.24%~5.90%,可满足要求。

表6 干制水果中V_C的加标回收率实验结果

样品	加标量/mg	1%草酸提取				1%偏磷酸提取			
		样品含量/(mg/100 g)	变异系数/%	测定值/(mg/100 g)	回收率/%	样品含量/(mg/100 g)	变异系数/%	测定值/(mg/100 g)	回收率/%
干制梨	5	37.62±1.13	3.00	42.57	102.00±5.53	29.84±1.76	5.90	34.79	97.67±1.83
	50			86.92				77.64	
	200			254.38				226.60	
干制芒果	5	123.59±7.15	5.79	128.51	99.54±1.28	94.44±3.11	3.29	99.21	97.88±2.81
	50			174.06				144.91	
	200			322.13				288.98	
干制圣女果	5	265.89±4.27	1.61	270.55	97.15±3.46	284.20±5.28	1.86	289.36	100.49±2.43
	50			315.74				334.05	
	200			463.01				481.32	
干制橙子	5	372.66±10.75	2.88	377.57	97.98±1.31	308.02±4.10	1.33	312.73	96.31±2.00
	50			422.25				357.11	
	200			565.82				501.18	
干制猕猴桃	5	708.22±15.33	2.16	712.92	94.09±0.93	689.78±8.53	1.24	694.48	96.43±2.10
	50			755.74				738.80	
	200			894.60				884.16	

2.8 新鲜水果及干制品中V_C含量测定结果

V_C在常规条件下容易氧化,在酸性溶液中能更好地保持其稳定性,不同的酸提取剂对V_C的提取效果有很大的影响。由表7可知,用2%的偏磷酸溶液作为测定水果中V_C含量的提取剂的效果总体上比2%的草酸溶液好,数据比较稳定,偏差相对较小,特别是采用滴定法分析水果及干制品中V_C含量选用2%的偏磷酸溶液作为提取溶剂更合适。采用2%的草酸和2%的偏磷酸溶液作为高效液相色谱法分析水果及干制品中V_C含量的提取溶剂,分别有8种和5种样品的V_C含量测定结果存在显著差异($P<0.05$)。高效液相色谱法与2,6-二氯酚酚滴定法相比,前者具有检测速度快、效率高、

数据准确可靠、人为干扰小等优点,特别是对于花青素含量高的水果(如草莓、葡萄、圣女果等),高效液相色谱法测定具有很大的优势。以偏磷酸溶液作为提取剂,枇杷、苹果、梨、火龙果、葡萄、干制猕猴桃、干制番石榴、干制橘子、干制火龙果等样品采用高效液相色谱法和2,6-二氯酚酚滴定法所测得的V_C含量之间差异显著($P<0.05$);其他样品采用2种方法测定的结果之间无显著差异($P>0.05$)。以草酸溶液作为提取剂,枇杷、苹果、梨、火龙果、葡萄、青枣、干制猕猴桃、干制芒果、干制草莓、干制橙子、干制橘子、干制青枣等样品采用高效液相色谱法和2,6-二氯酚酚滴定法所测得的V_C含量之间差异显著($P<0.05$);

表7 提取剂及分析方法对新鲜水果及干制品中V_C含量测定的影响 mg/100 g

样品	草酸		偏磷酸	
	高效液相色谱法	2,6-二氯酚酚滴定法	高效液相色谱法	2,6-二氯酚酚滴定法
猕猴桃	70.48±6.21	74.67±0.63	77.85±4.13	77.18±0.32
芒果	9.64±0.56	9.99±0.31	10.11±0.94	10.82±0.32
枇杷	3.40±0.02 ^a	5.73±0.31 ^b	3.62±0.01 ^a	5.65±0.00 ^b
草莓	39.45±2.45	39.42±1.13	41.60±1.96	42.98±0.32
橙子	42.19±0.59	44.51±1.75	45.84±0.61	52.62±0.32
苹果	2.60±0.01 ^a	3.37±0.11 ^b	2.51±0.03 ^a	3.75±0.07 ^b
圣女果	21.95±0.40	27.43±0.31	25.12±0.79	27.87±0.32
梨	2.90±0.05 ^a	1.83±0.07 ^{b*}	2.65±0.16 ^a	1.31±0.06 ^{b*}
番石榴	135.77±1.52	145.07±0.37	163.58±2.71	145.07±1.73
柠檬	24.74±0.86 [*]	27.31±1.96 [*]	33.85±1.08 [*]	35.37±0.66 [*]
杨桃	6.73±0.45 [*]	6.27±0.38 [*]	9.20±0.82 [*]	8.30±0.38 [*]
橘子	11.19±0.65	11.27±0.38	13.32±0.55	12.23±0.38
火龙果	3.33±0.30 [*]	5.38±0.38 ^b	4.60±0.41 ^{a*}	6.11±0.36 ^b
葡萄	4.43±0.35 ^a	7.80±0.65 ^{b*}	4.39±0.23 ^a	5.46±0.38 ^{b*}
青枣	30.11±1.34 ^a	48.10±0.65 ^{a*}	34.97±1.58	37.12±1.00 [*]
干制猕猴桃	694.89±7.69 ^a	473.95±1.73 ^b	664.96±30.19 ^a	483.22±18.92 ^b
干制芒果	147.22±8.20 ^{a*}	112.20±3.13 ^b	111.30±6.95 [*]	118.75±2.54
干制枇杷	36.94±0.80	40.34±2.06	38.26±1.20	39.06±1.83
干制草莓	325.25±5.04 ^a	414.66±6.14 ^b	383.71±4.19	404.66±5.08
干制橙子	404.01±14.39 ^{a*}	275.61±4.67 ^b	264.82±1.33 [*]	265.61±2.01
干制苹果	55.69±0.81 [*]	56.95±2.03	39.56±1.33 [*]	43.44±0.88
干制圣女果	272.10±3.68	263.69±1.76	283.90±0.63	270.89±1.27
干制梨	42.19±0.98 [*]	39.79±2.03	30.20±2.18 [*]	35.11±1.39
干制番石榴	616.13±18.5 [*]	612.2±27.83	775.48±2.67 ^{a*}	626.55±12.04 ^b
干制柠檬	330.22±6.99	316.02±6.42	289.85±5.42	307.11±2.93
干制杨桃	77.00±1.03	76.13±1.74	72.56±0.85	75.42±1.02
干制橘子	154.65±6.43 ^a	101.54±1.85 ^b	171.80±3.89 ^a	114.52±2.93 ^b
干制火龙果	28.84±0.04	30.01±2.08	20.72±1.88 ^{a*}	27.81±2.11 ^b
干制葡萄	40.91±0.69	33.90±3.08	43.27±0.98	35.90±3.08
干制青枣	136.79±2.22 [*]	87.68±1.73 ^b	110.96±3.49 [*]	103.45±2.91

注：同一行同一提取剂间标注不同的小写字母表示不同测定方法之间差异显著， $P<0.05$ ；同一分析方法标注*代表2种提取剂之间差异显著， $P<0.05$ 。

其他样品采用2种方法测定的结果之间无显著差异 ($P>0.05$)。

由表7还可知，根据高效液相色谱法结果，实验所选的15种新鲜水果中V_C的含量为2.51~163.58 mg/100 g，含量高低顺序依次为：番石榴>猕猴桃>橙子>草莓>青枣>柠檬>圣女果>橘子>芒果>杨桃>火龙果>葡萄>枇杷>梨>苹果。干制品中V_C的含量为20.72~775.48 mg/100 g，含量高低顺序依次为：干制番石榴>干制猕猴桃>干制草莓>干制柠檬>干制圣女果>干制橙子>干制橘子>干制芒果>干制青枣>干制杨桃>干制葡萄>干制苹果>干制枇杷>干制梨>干制火龙果。

3 结论

V_C在常规条件下容易氧化，在酸性溶液中能更好地保持其稳定性，不同的酸性提取剂对V_C的提取效果有很大的影响，以偏磷酸溶液作为提取剂的效果最好。不同的酸性溶液作为流动相的水相对V_C的分离效果影响较大 ($P<0.05$)，磷酸二氢钾与磷酸形成的缓冲体系可增加分离效果；甲醇为质子化溶剂，其比例增加更容易洗脱出V_C。高效液相色谱法具有检测速度快、效率高、人为干扰小、回收率高、变异小、数据准确等优点，可用于新鲜水果及干制品中V_C含量的测定，特别是

对于测定花青素含量高、滤液颜色较深的水果(如草莓、葡萄、圣女果等)中 V_c 含量具有很大的优势。实验所测定的15种新鲜水果中 V_c 含量大于20 mg/100 g的有:番石榴、猕猴桃、橙子、草莓、青枣、柠檬、圣女果7种,干制水果中 V_c 含量大于100 mg/100 g的有:干制番石榴、干制猕猴桃、干制草莓、干制柠檬、干制圣女果、干制橙子、干制桔子、干制芒果、干制青枣9种,猕猴桃、番石榴、橙子等新鲜水果中 V_c 含量高,常被推荐为补充 V_c 的重要来源。

参考文献:

- [1] BARROS A, SILVA A P, GONÇALVES B, et al. A fast, simple, and reliable hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic and isoascorbic acids[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(5): 1863-1875.
- [2] NOVÁKOVÁ L, SOLICH P, Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27(10): 942-958.
- [3] 杨媛,冯晓元,石磊,等.高效液相色谱法同时测定水果蔬菜中L-抗坏血酸、D-异抗坏血酸、脱氢抗坏血酸及总维生素C的含量[J].分析测试学报, 2015, 34(8): 934-938.
- [4] HERNÁNDEZ Y, LOBO M G, GONZÁLEZ M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods[J]. Food Chemistry, 2006, 96(4): 654-664.
- [5] GUTIÉRREZ-QUEQUEZAN A L, VUORINEN A L, KALLIO H, et al. Improved analysis of anthocyanins and vitamin C in blue-purple potato cultivars[J]. Food Chemistry, 2018, 242(3): 217-224.
- [6] 樊田利,刘若男,王凤丽,等.不同蒸制功率对西兰花营养品质的影响[J].食品与发酵工业, 2021, 47(19): 161-167.
- [7] MEGÍAS-PÉREZ R, GAMBOA-SANTOS J, SORIA A C, et al. Survey of quality indicators in commercial dehydrated fruits[J]. Food Chemistry, 2014, 150(9): 41-48.
- [8] FRANKE A A, CUSTER L J, ARAKAKI C, et al. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17(1): 1-35.
- [9] SILVA M A, ALBUQUERQUE T G, OLIVEIRA M B P P, et al. Vitamin C evaluation in foods for infants and young children by a rapid and accurate analytical method[J]. Food Chemistry, 2018, 267(9): 83-90.
- [10] 刘志聪,王路,朱友冲. HPLC测定潮州柑果肉中维生素C[J].光谱实验室, 2011, 28(4): 2038-2041.
- [11] ODRIOZOLA-SERRANO I, HERNÁNDEZ-JOVER T, MARTÍN-BELLOSO O, et al. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits[J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1151-1158.
- [12] PÉREZ A G, OLÍAS R, ESPADA J, et al. Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other Fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3545-3549.
- [13] GAMBOA-SANTOS J, SORIA A C, PÉREZ-MATEOS M, et al. Vitamin C content and sensorial properties of dehydrated carrots blanched conventionally or by ultrasound[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 782-788.
- [14] TARRAGO-TRANI M T, PHILLIPS K M, COTTY M. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 26(1-2): 12-25.
- [15] KIM Y, KIM M G. HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma[J]. Translational and Clinical Pharmacology, 2016, 24(1): 37-42.

《食品科技》

开户银行: 农业银行北京南三环支行

账号: 11200601040010053

户名: 北京市粮食科学研究院有限公司