

直接溶剂萃取/高压液相色谱检测杏中的 β -胡萝卜素

魏明^{1,2}, 周林燕², 宋洪波¹, 张乐^{1,2}, 彭春红^{1,2}, 李亚茹²,
曹珍珍², 李淑荣^{2,3*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;
3. 北京农业职业学院, 北京 102442)

摘要: **目的** 建立快速测定杏中 β -胡萝卜素的分析方法。 **方法** 应用直接溶剂萃取/高压液相色谱法测定三种杏中 β -胡萝卜素含量。5 g 杏与 30 mL 蒸馏水混匀, 再滤去水分, 加入 100 mL 石油醚: 2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT)(9.9 : 0.1, v/v), 搅拌提取 1 min, 提取液过滤转移至分液漏斗, 提取重复 3 次, 将提取液中的有机相旋转蒸干, 用流动相乙腈: 二氯甲烷: 甲醇(7 : 2 : 1, v/v/v)清洗烧瓶并收集, 浓缩至 1 mL, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后取 20 μ L 进样。 **结果** 该方法检出限为 0.088 mg/kg, 定量限为 0.23 mg/kg。 β -胡萝卜素在 1~50 mg/L 内线性关系良好($R^2 = 0.9996$), 平均加标回收率为 95.59%。样品前处理仅需 20~25 min。采用该方法对三种北方杏中的 β -胡萝卜素进行检测, 黄杏中 β -胡萝卜素含量较高。 **结论** 该方法简便、快捷、准确, 适用于杏中 β -胡萝卜素的快速检测。

关键词: 杏; β -胡萝卜素; 直接溶剂萃取; 高压液相色谱

Determination of β -carotene in apricots by direct solvent extraction and high pressure liquid chromatography

WEI Ming^{1,2}, ZHOU Lin-Yan², SONG Hong-Bo¹, ZHANG Le^{1,2}, PENG Chun-Hong^{1,2},
LI Ya-Ru², CAO Zhen-Zhen², LI Shu-Rong^{2,3*}

(1. Department of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Beijing 100193, China; 3. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid determination method of β -carotene in the apricot. **Methods** A high pressure liquid chromatography (HPLC) method was developed for determining β -carotene in three apricots. About 5 g of apricots was homogenized with 30 mL distilled water, then filtered the water and blended with 100 mL petroleum: 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (9.9:0.1, v/v) ether using a blender for 1 min. The extraction solvent was carefully passed through filter paper as it was transferred to a 500 mL separating funnel. And the procedures were repeated for three times. Then the organic layer was collected into a round-bottom

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2011BAD27B01)

Fund: Supported by the National Science and Technology Supported Program during the Twelfth Five-year Plan Period for the Agricultural Field (2011BAD27B01)

*通讯作者: 李淑荣, 研究员, 主要研究方向为农产品贮藏加工品质控制技术。E-mail: shurongl@hotmail.com

*Corresponding author: LI Shu-Rong, Senior Researcher, Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences No.2 Yuan Ming Yuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: shurongl@hotmail.com

flask and evaporated to dryness by a rotary evaporator. The round-bottom flask was washed with acetonitrile: dichloromethane: methanol (7: 2: 1, v/v/v), concentrated to 1 mL and then followed by filtration through 0.45 μm membrane filters (millipore). A 20 μL aliquot of the resulting solution was then assayed by HPLC. **Results** The limit of detection and quantitation was 0.088 mg/kg and 0.23 mg/kg, respectively. The developed method exhibited good linearity over the range from 1 to 50 mg/L with a correlation coefficient of 0.9996, and the average recovery was 95.59%. The operation time for sample preparation was about 20 to 25 min. The method was used to detect β -carotene in three apricots and the contents in yellow apricot was proved to be highest. **Conclusion** The method is convenient, fast, accurate and is suitable for the rapid determination of β -carotene in apricots.

KEY WORDS: apricots; β -carotene; direct solvent extraction; high pressure liquid chromatography

1 引言

β -胡萝卜素是橘红色或橘黄色水果蔬菜中常见的一种类胡萝卜素,可在生物体内转化为视黄醇类物质,从而发挥维生素A的生理功能,是人体重要的维生素A源^[1-4]。 β -胡萝卜素具有抗氧化功能,可以清除机体内活性氧自由基,抑制过氧化物生成,对心血管疾病、某些肿瘤、光敏性疾病、白内障及衰老等的发生发展具有一定的预防、延缓、和辅助治疗作用,还能提高机体的免疫功能,是维护人体健康不可或缺的营养素^[5-7]。

杏,蔷薇科李属植物,原产于我国,在我国种植面积较大,是 β -胡萝卜素的最佳来源之一^[8-12],其潜在的健康价值及综合利用价值极大。目前 β -胡萝卜素检测方法主要有HPLC法。国标(GB/T 5009.83-2003)^[13]用石油醚或石油醚:丙酮(80:20, v/v)为提取剂,氧化铝柱子净化后测定,前处理时间长,HPLC分析时间长且未给出检测限和定量限。孙健等^[14]用正己烷:丙酮:乙醇(6:3:1, v/v/v)对甘薯样品振荡提取,甲醇与甲醇:异丙醇(40:60, v/v)梯度洗脱分离样品中的 β -胡萝卜素,前处理时间也较长,分离条件复杂且HPLC分析时间也较长。本研究考虑到杏中基质影响及 β -胡萝卜素溶解性,采用直接溶剂萃取法(direct solvent extraction, DSE),并对色谱条件进行优化,建立了一种快速简便、准确可靠的方法测定杏中 β -胡萝卜素。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

RE-2000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);

Mettler AE240 型电子天平(美国梅特勒托利多仪器有限公司);榨汁机(JYL-C020 九阳公司);新鲜杏(黄杏,大红杏,大白杏)(北京美廉美超市); β -胡萝卜素标准品(美国Sigma公司);色谱纯乙腈、甲醇、二氯甲烷(美国Dikma公司),分析纯石油醚(30~60 $^{\circ}\text{C}$)(中国国药化学试剂有限公司)。

1200 型高压液相色谱仪,1200 型可变波长紫外检测器(美国Agilent公司)。

2.2 样品前处理

5 g 杏与 30 mL 蒸馏水混合后用榨汁机搅拌 1 min,过滤去除水分,然后加入 100 mL 石油醚:BHT(9.9:0.1, v/v)后搅拌 1 min,静置 1 min 后继续搅拌 1 min,静置 1 min 后上清液转移至 500 mL 的分液漏斗中,残渣用上述方法重复提取直至残渣无色。合并提取液转入分液漏斗,蒸馏水洗去水溶性组分,石油醚层用无水 Na_2SO_4 干燥,旋转蒸发浓缩至干,用乙腈:二氯甲烷:甲醇(7:2:1, v/v/v)清洗并收集,氮吹浓缩至 1 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后取 20 μL 进样。

2.3 标准储备液的配置

精确称取 β -胡萝卜素标准品 1 mg,加流动相溶解,于 5 mL 棕色容量瓶中定容至刻度,作为标准储备液(200 mg/L)于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.4 HPLC 分析

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相 1:甲醇:乙腈(9:1, v/v);流动相 2:乙腈:二氯甲烷:甲醇(7:2:1, v/v/v);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min;等度洗脱;进样量:20 μL ;检测波长:450 nm。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理方法

食品中胡萝卜素的测定(GB/T 5009.83-2003)^[13]用石油醚或石油醚:丙酮(80:20, v/v)提取 β -胡萝卜素, 提取后氧化铝柱子净化后 HPLC 分析, 此过程约 4 h。由于杏中含有较多的小分子糖类物质, 影响 β -胡萝卜素提取, β -胡萝卜素不溶于水, 易溶于有机溶剂^[15]。本研究用蒸馏水浸泡去除糖等水溶性成分后, 采用石油醚提取 β -胡萝卜素, 提取液无需过柱子, 直接浓缩并使用微孔滤膜过滤后即可进行 HPLC 分析, 仅需 20~25 min, 缩短了前处理时间。另外由于 β -胡萝卜素不稳定、易氧化, 在石油醚中加入少量 BHT, 抑制 β -胡萝卜素在提取过程中的氧化。结果表明用蒸馏水浸泡去除糖等水溶性成分, 经石油醚提取后 HPLC 分析, 杂质干扰小, 分离效果较好(图 1)。

3.2 HPLC 流动相选择

分别分析了乙腈、甲醇、二氯甲烷为分离杏中 β -胡萝卜素的流动相, 结果表明, 采用国标中的流动相条件: 甲醇:乙腈(9:1, v/v)时, 出峰时间(Rt)约为 40 min(图 1A)。甲醇与乙腈的极性相对较强, 在其溶液中加入少量的弱极性溶剂二氯甲烷, 流动相条件: 乙腈:二氯甲烷:甲醇(7:2:1, v/v)时, Rt 提前至 12 min, 可有效缩短 β -胡萝卜素出峰时间(图 1B)。故选用乙腈:二氯甲烷:甲醇(7:2:1, v/v)作为检测 β -胡萝卜素的流动相。

3.3 线性范围和检测限

采用外标法, 用流动相准确配置浓度梯度为: 1、5、10、20、30、40、50 mg/L 的 β -胡萝卜素标准溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标制作标准曲线, 结果表明 β -胡萝卜素在 1~50 mg/L 浓度范围内线性关系良好(如图 2)。回归方程为: $Y = 28.5914X - 11.6951$, 相关系数 $R^2 = 0.9996$, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.31%。通过向样品中添加 β -胡萝卜素来考察方法的检出限, 选择信噪比 $S/N \geq 3$ 时为检出限, $S/N \geq 10$ 时为定量限。本方法的最低检出限是 0.088 mg/kg, 定量限为 0.23 mg/kg, 这与郑群雄等^[1]的研究结果接近。

3.4 精密度与重复性实验

分别取 5、20、40 mg/L 三种不同浓度的 β -胡

萝卜素标准溶液, 连续自动进样 5 次, 测得峰面积值, 计算不同浓度 β -胡萝卜素的日内精密度 RSD, 分别为 1.23%、1.27%、1.45%; 连续 3 天进样, 每天进样 5 次, 以每天测得的峰面积平均值计算日间精密度 RSD, 分别为 4.61%、5.02%、6.73%。

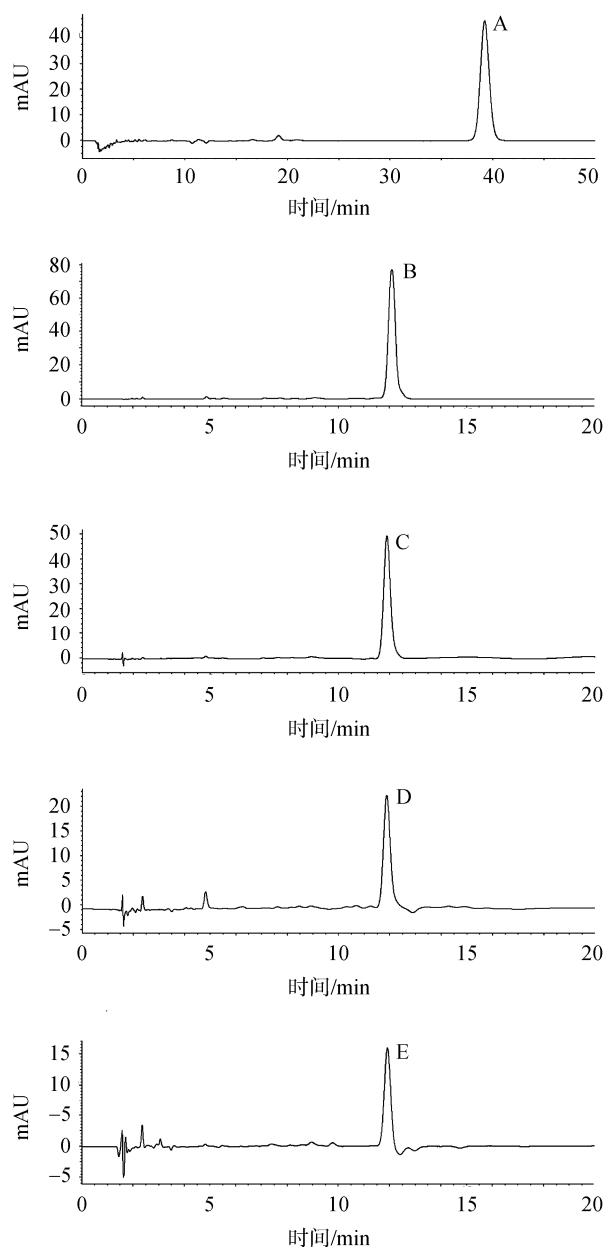


图 1 β -胡萝卜素标准品和杏样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of β -carotene standard and some apricot samples

注: A: 标准品(流动相 1); B: 标准品(流动相 2);

C: 黄杏; D: 大红杏; E: 大白杏

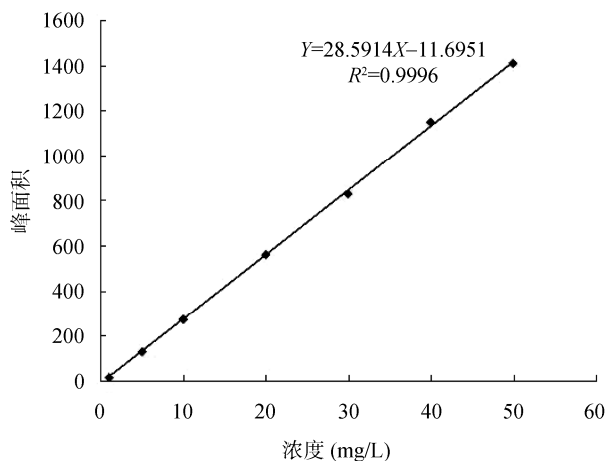


图 2 β -胡萝卜素标准曲线
Fig. 2 Standard Curve of β -carotene

重复取 5 g 杏样品 5 次, 样品经前处理, HPLC 分析, 记录峰面积, 每次都从取样开始至测定完成。结果表明样品处理的 RSD 为 1.38%, 说明此方法的重复性良好。

3.5 回收率实验

称取滤去水分后的黄杏样品 5 份, 分别加入一定量的 β -胡萝卜素储备液, 依照 1.2 节操作方法制备加标回收样品溶液, 通过标准曲线计算加标后的样品浓度, 确定此方法的回收率。由表 1 可见, 样品的加标回收率为 93.16%~98.83%, 平均回收率为 95.59%, RSD 为 2.37%。表明该方法准确度高, 能满足分析要求。

表 1 加标回收试验
Table 1 Recoveries of the measured results

样品中 含量/(μg)	加入量/ (μg)	测定值/ (μg)	回收率/ (%)	平均 回收率/ (%)	RSD/ (%)
102.32	73.92	168.66	95.70		
105.25	93.95	185.59	93.16		
103.83	102.99	200.26	96.82	95.59	2.37
108.72	118.01	224.09	98.83		
110.96	120.34	216.16	93.45		

3.6 样品测定

应用上述方法测定我国北方黄杏、大红杏、大白杏三种日常食用杏中的 β -胡萝卜素含量, 色谱图如

图 1, 结果如表 2 所示。经测定, 黄杏 β -胡萝卜素含量较高, 达 6.68 ± 0.31 mg/kg。因此就品种所含 β -胡萝卜素而言, 黄杏比大红杏和大白杏品种的含量更高。

表 2 3 种杏 β -胡萝卜素含量的测定($n=3$)
Table 2 Determination results of β -carotene in 3 apricots ($n=3$)

样品	β -胡萝卜素含量/(mg/kg)
黄杏	6.68 ± 0.31
大红杏	3.20 ± 0.26
大白杏	2.01 ± 0.25

4 结 论

此研究建立的检测杏中 β -胡萝卜素方法更加简单快捷, 灵敏度高, 精密度、回收率好。该方法对筛选高营养价值的杏品种以及研究杏中 β -胡萝卜素在贮藏过程中的含量变化具有重要意义, 值得推广。

参考文献

[1] 郑群雄, 杜美霞, 徐小强, 等. 高效液相色谱法测定 15 种蔬菜中的 β -胡萝卜素[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 238–241.
Zheng QX, Du MX, Xu XQ, *et al.* Determination of β -Carotene in 15 Vegetables by High Performance Liquid Chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(14): 238–241.

[2] 于平, 励建荣. 微波辅助溶剂提取钝顶螺旋藻中 β -胡萝卜素的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 80–83.
Yu P, Li JR. Studies on the Microwave-assistant solvent extraction of β -Carotene from Spirulina Platensis [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2008, 8(2): 80–83.

[3] Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health [J]. Pharmacol Res, 2007, 55(3): 207–216.

[4] Tang G, Hu Y, Yin S, *et al.* β -Carotene in Golden Rice is as good as β -carotene in oil at providing vitamin A to children [J]. Am J Clinl Nutr, 2012, 96(3): 658–664.

[5] Harari A, Harats D, Marko D, *et al.* Supplementation with 9-cis β -carotene-rich alga Dunaliella improves hyperglycemia and adipose tissue inflammation in diabetic mice[J]. J Appl Phycol, 2013: 1–7.

[6] Fleshman M K, Riedl K M, Novotny J A, *et al.* An LC/MS method for d8- β -carotene and d4-retinyl esters: β -carotene absorption and its conversion to vitamin A in humans[J]. J Lipid Res, 2012, 53(4): 820–827.

[7] 秦宏伟, 杨红花, 史春余, 等. 甘薯中 β -胡萝卜素提取工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 123–126.

- Qin HW, Yang HH, Shi CY, *et al.* Study on extraction technology for β -carotene from sweet potatoes [J]. Food Sci, 2007, 28(1): 123–126.
- [8] Driver J. Development and Commercialization of Apricot of Central Asian Origin [J]. J Am Pomol Soc, 2012, 66(3): 118–121.
- [9] Wei M, Zhou L, Song H, *et al.* Electron beam irradiation of sun-dried apricots for quality maintenance[J]. Radiat Phys Chem, 2013.
- [10] Jiménez AM, Martínez TM., Ega I, *et al.* Effect of industrial processing and storage on antioxidant activity of apricot(*Prunus armeniaca* v. *bulida*) [J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(1), 125–134.
- [11] 王春艳, 田金强, 王强. 杏贮藏加工技术研究进展[J]. 果树学报, 2010, 27(6): 995–1001.
Wang CY, Tian JQ, Wang Q. Research progress of apricot storage and processing technology [J]. J Fruit Sci, 2010, 27(6): 995–1001.
- [12] 颜少宾, 张舒艳, 马瑞娟, 等. 杏果肉中类胡萝卜素的提取方法研究[J]. 江西农业学报, 2011, 23(9): 159–161.
Yan SB, Zhang YY, Ma RJ, *et al.* Study on extraction method of carotenoid from apricot fruit[J]. J Jiangxi Agric Sci, 2011, 23(9): 159–161.
- [13] GB/T 5009.83-2003 食品中胡萝卜素的测定 高效液相色谱法 [S].
GB/T 5009.83-2003 Determination of carotene in foods -high performance liquid chromatography [S].
- [14] 孙健, 彭宏祥, 董新红, 等. 甘薯中 β -胡萝卜素 HPLC 测定方法分析[J]. 食品科技, 2009, 34(1): 36–239.
Sun J, Peng HX, Dong XH, *et al.* HPLC analysis method on β -carotene in sweet potato [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(1): 36–239.
- [15] 陈敏, 李赫, 马文平, 等. 反相高效液相色谱法测定枸杞中类胡萝卜素及酯类化合物[J]. 分析化学, 2006, 34(Z1): 27–30.
Chen M, Li H, Ma WP, *et al.* Determination of carotenoids and carotenoid esters composition in fructus lycii by reversed phased high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(Z1): 27–30.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



魏明, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学, 食品贮藏保鲜原理与应用。
E-mail: weiming229@126.com



李淑荣, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品贮藏加工品质控制技术。
E-mail: shurongl@hotmail.com