

果蔬中叶酸的提取分离及测定方法研究

郭秀珠, 黄品湖*, 雷海清, 项秀珠
(浙江省科学院亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005)

摘 要: 本文研究了果蔬中叶酸的提取分离方法, 对提取液、吸附剂及洗脱液设计了正交试验, 结果是用热沸偏磷酸提取, 活性炭吸附, 3% 氨-70% 乙醇液洗脱, 达到提取分离较完全之目的; 并用荧光法测定叶酸含量, 该方法回收率在 95% 以上, 相对偏差小于 2.5%, 结果满意。

关键词: 叶酸; 荧光法; 提取分离; 吸附剂

Study on the Extraction Purifying and Measuring Method of the Folic Acid in Fruits and Vegetables

GUO Xiu-zhu, HUANG Pin-hu*, LEI Hai-qing, XIANG Xiu-zhu
(Institute of Subtropical Crops, Zhejiang Academy of Sciences, Wenzhou 325005, China)

Abstract: In this paper, the extracting and purifying technology of the folic acid in fruits and vegetables was studied. We designed the orthogonal test for the solvent, developing agent and sorbent. The results showed: extracted with hot boiling metaphosphoric acid, absorbed with active carbon, developed with the mixture solution of 3% ammonia and 70% anhydrous alcohol, the conclusion gained the ends of extraction and purifying comparative completeness. And we measured the content of folic acid with the fluorescence spectrophotometer. The recovery ratio was beyond 95%, the relative deviation was below 2.5%. The results was satisfied

Key words folic acid; fluorescence analysis; extraction; purifying; sorbent

中图分类号: O652.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)03-0183-03

叶酸又名维生素 M 或维生素 B₁₂, 学名为 N-[对-(2-氨基-4-羟基-6-甲胺蝶啶)-一苯甲酰基]-谷氨酸。是人体红细胞发育成长不可缺少的因子之一。它有助于核酸的形成, 促进食欲, 刺激胃酸分泌, 预防食品中毒, 它广泛存在于果品、蔬菜之中。但由于果蔬中普遍含有色素、脂质、蛋白质、维生素、叶绿素等多种成分, 所以给叶酸的提取分离带来一定的困难。叶酸含量的测定通常都用分光光度法, 但分光光度法灵敏度不高, 故给测定结果带来一定的误差。所以寻求一种新的测定方法显得非常重要。本文以正交实验设计方法考察了提取分离条件对叶酸提取量的影响。详细研究了果蔬中叶酸的提取分离和测定方法。目前未见用热沸

偏磷酸提取, 荧光法测定果蔬中叶酸含量的报道。此法其灵敏度高, 稳定性好, 结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试果蔬材料 卷心菜、菠菜、苹果、梨、甜橙等。

1.1.2 试剂 叶酸、氨水、乙醇、偏磷酸、醋酸、高锰酸钾、双氧水等均为分析纯; 活性炭(取定量的 CP 活性炭加入 10 倍其重量的 10% 苯胺溶液, 加热煮沸 1h, 过滤, 再用去离子水洗涤 5~6 次, 于 30~40℃ 下干燥

收稿日期: 2005-02-25

*通讯作者

作者简介: 郭秀珠(1965-), 女, 实验师, 研究方向为食品分析、果蔬营养。

[7] 董杰, 王开运, 姜兴印, 等. 家蝇(*Musca domestica* Vicina L.) 头部乙酰胆碱酯酶检测农药残留最佳条件研究[J]. 农药学报, 2003, 5(1): 93-96.

[8] Carlo M, Mascini M, Pepe A, et al. Screening of food samples for carbamate and organophosphate pesticides using an electrochemical bioassay [J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 651-656.

备用。

1.1.3 仪器 日本日立F-2000荧光分析仪、水浴锅等。

1.2 方法

1.2.1 叶酸的提取及分离

为了得到最佳的提取分离方法,我们对提取液、吸附剂及洗脱液三个因素水平进行了三因素三水平的正交试验,具体见表1。

表1 正交实验设计的因素与水平
Table 1 Factor and level of orthogonal design method

水平	因素		
	A 提取液	B 吸附剂	C 洗脱剂
1	40% 偏磷酸(1)	硅胶(1)	1% 氨-70% 乙醇(1)
2	0.1mol/L 磷酸二氢钾-0.1mol/L 磷酸(2)	硅藻土(2)	2% 氨-70% 乙醇(2)
3	0.1mol/L 氢氧化钠(3)	活性炭(3)	3% 氨-70% 乙醇(3)

1.2.2 叶酸的提取

准确称取切碎的卷心菜叶10g与少量石英砂一起研磨,磨细后用表1中的三种提取液分别将样品全部转入150ml锥形瓶中,在沸水上保温45min,冷却后,定容100ml,并摇匀过滤备用。

1.2.3 叶酸的分离

吸取上述滤液50ml于锥形瓶中,分别加入表1中的三种吸附剂混合均匀,加热煮沸5min,用3号筒型玻璃漏斗真空过滤,弃去滤液,再用60~70℃表1中的三种洗脱液洗滤渣3~4次,洗脱液的总量约70ml,并将其在水浴上蒸发浓缩至10ml左右。冷却后加25%醋酸15滴左右,直至pH3为止。

1.2.4 叶酸的氧化与提纯

在上述试液中再逐滴加入4%高锰酸钾溶液,至试液中高锰酸钾的浅红色不褪为止,将混合液静置10min,此时溶液稍显棕色,但仍保持浅红色。再逐滴向试液中滴加3%过氧化氢溶液至试液颜色褪去为止。最后滴加1%氨水5滴左右,使其pH4~4.5,将溶液定容到25ml,并过滤。

1.2.5 样品测定

以365nm为激发波长,470nm为检测波长,将过滤得到的清液及试剂空白溶液同时测定荧光强度,并将样品读数减去空白读数,即样品测定值。实验结果见表2。

1.2.6 标准工作曲线

准确称取已在棕色干燥器中干燥一周的分析纯叶酸0.1g用少量40%偏磷酸溶解,定容100ml,再配制0~10μg/ml系列标准液,从1.2.4开始与样品同样处理后,测定其荧光强度,并绘制标准工作曲线,其相关系数(R)=0.999。

表2 正交实验结果及分析

Table 2 Result and analysis of orthogonal design method

实验号	因素			叶酸含量(μg/g)
	A	B	C	
1	1	1	1	13.6
2	1	2	2	14.2
3	1	3	3	15.6
4	2	1	2	12.2
5	2	2	3	13.6
6	2	3	1	13.2
7	3	1	3	12.9
8	3	2	1	11.2
9	3	3	2	12.4
K ₁	43.4	38.7	38.0	
K ₂	39.0	39.0	38.8	
K ₃	36.5	41.2	42.1	
R ₁	14.5	12.9	12.7	
R ₂	13.0	13.0	12.9	
R ₃	12.2	13.7	14.0	
R	2.30	0.8	1.3	

2 结果与讨论

2.1 从表2可以看出,三种考察因素对叶酸的提取量都有影响,影响主次顺序为提取液、洗脱液、吸附剂。根据以上试验结果与分析,最佳提取分离条件为A₁B₃C₃。我们用标准样作回收率试验,并按本实验方法测定标样的叶酸含量,结果是其它组合回收率均在80%以下,说明叶酸不能完全分离,只有A₁B₃C₃组合其回收率在95%以上,说明它能达到分离完全之目的。

2.2 不同果蔬品种中的叶酸含量及回收率测定

为了探讨此法对其他果蔬的适用情况,我们按上述A₁B₃C₃组合方法分别测定了六个果蔬品种的叶酸含量,同时在另一份提取液中加入5μg标准叶酸,测定其回收率,重复三次,每次均进行平衡测定,详见表3。

表3 不同果蔬品种叶酸含量及回收率测定结果表

Table 3 Content and recovery of folacin in various fruits and vegetables

检测项目	品种名称					
	卷心菜	菠菜	豌豆	苹果	雪梨	脐橙
叶酸含量(μg/g)	15.6	16.6	10.5	24.0	14.8	12.4
相对误差(%)	1.82	2.10	2.42	1.75	1.96	2.23
回收率(%)	98.73	96.25	97.84	99.38	98.21	100.49

注:样品按鲜样计算,果品取果肉作实验。

由表可知,其结果相对误差小于2.5%,回收率在96%以上,获得满意的结果。

因此用热沸偏磷酸提取,活性炭吸附,3%氨-70%乙醇液洗脱分离并应用荧光法测定果蔬中叶酸含量,方法简便,灵敏度高,稳定性好,结果令人满意,在食品加工业和优良品系选育中都有着广泛的应用价值。

参考文献:

低压离子色谱分离 - 次黄嘌呤增敏化学 发光联用检测亚硫酸盐

沈 祥, 周光明*, 游水英, 黄 成, 王 莉, 高智席
(西南师范大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘 要: 本文发现次黄嘌呤对高锰酸钾-鲁米诺- SO_3^{2-} 体系化学发光有增敏作用。结合低压离子色谱(LPIC)快速分离测定 SO_3^{2-} , 并用于实际样品中 SO_3^{2-} 含量测定。在优化条件下, SO_3^{2-} 浓度与化学发光强度在 $5 \times 10^{-8} \sim 4.8 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 范围内成正比($r = 0.9977$), 检出限 $3.2 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, 选定 SO_3^{2-} 浓度为 $5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$, 进行5次平行测定, RSD为3.25%。

关键词: 低压离子色谱; 化学发光; 亚硫酸盐

Sulfite Determination by Low Pressure Ion Chromatography with Chemiluminescence Sensitized by Hypoxanthine

SHEN Xiang, ZHOU Guang-ming*, YOU Shui-ying, HUANG Cheng, WANG Li, GAO Zhi-xi
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest China Normal
Univeristy, Chongqing 400715, China)

Abstract: Sulfite concentration is detected by low pressure ion chromatography (LPIC) with chemiluminescence due to the fact that hypoxanthine can sensitize the depression effect of sulfite on luminol- KMnO_4 chemiluminescence reaction. The liner range of sulfite concentration under optimal conditions is $5 \times 10^{-8} \sim 4.8 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ ($r=0.9977$) with a detection limit of $3.2 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, and RSD as 3.25% by assaying $5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ for five times. This simple, rapid and sensitive method is successfully applied to sulfite determination in food samples.

Key words sulfite; low pressure ion chromatography; chemiluminescence

中图分类号: 0657

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)03-0185-04

亚硫酸盐因其脱水、杀菌、防腐、抗氧化作用而作为防腐剂和漂白剂添加于食品、饮料^[1]。制糖业作为澄清剂改善白糖色值, 提高糖分的抽出和渗出浓度^[2,3]。研究发现, 哮喘, 过敏反应和低血压与高剂量摄入亚硫酸盐有关^[4]。它还是染色体断裂剂和基因毒性因子, 长期低浓度接触有引起人体细胞遗传物质损害的潜在危险

^[5]。因此, 对亚硫酸盐含量的检测是十分有必要的。已有的检测方法有离子色谱法^[6], 高效液相色谱-荧光法^[7,8], 毛细管电泳法^[9], 电化学法^[10,11], 酶法^[12], 微生物传感器法^[13], 化学发光^[14~19]。其中, 化学发光法灵敏度高, 操作简单, 但易受干扰。我们发现亚硫酸盐对鲁米诺-高锰酸钾的化学发光反应有抑制, 次黄嘌呤

收稿日期: 2005-06-29

*通讯作者

基金项目: 重庆自然科学基金(CSTC-2004BB7087)

作者简介: 沈祥(1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事色谱与发光研究。

[1] 王金凤. 木耳多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 143-146.

[2] 何照范, 等. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 194-195.

[3] 陈国珍, 等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 143.

[4] 王钦德, 扬坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 中国农业出版社.