

萝卜红色素的高效液相色谱法测定

游 辉¹, 欧阳杰², 武彦文¹, 杨 寅¹, 汪 雨¹, 陈舜琮¹

(1. 国产科学仪器应用示范中心, 北京 100089; 2 北京林业大学 生物科学与技术学院
食品科学与工程系, 北京 100083)

摘 要: 建立了高效液相色谱法测定萝卜红色素中天竺葵-3-O-葡萄糖苷含量的方法。样品用甲醇溶解, 净化后用高效液相色谱分析。结果显示, 选择合适的流动相可以获得较好的分离效果。实验采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm × 5 μm), 乙腈-5% 甲酸溶液 (体积比 24:76) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 紫外检测波长为 525 nm, 进样量为 10 μL。实验表明, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷在 0.01~0.10 g/L 范围内线性关系良好, $r=0.999$ 平均加标回收率为 97%~100%, 检出限为 0.0025 g/L。方法灵敏、准确、样品处理简单, 适用于萝卜红色素中花色苷含量的测定。

关键词: 萝卜红; 天竺葵-3-O-葡萄糖苷; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72 O629.13 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)03-0310-03

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.03.021

High Performance Liquid Chromatography Determination of Pelargonidin-3-O-glucoside in Radish Red

YOU Hui¹, OUYANG Jie², WU Yan-wen¹, YANG Yin¹, WANG Yu¹, CHEN Shun-cong¹

(1 Application & Demonstration Center for Homegrown Scientific Instruments Beijing 100089, China

2 Department of Food Science and Engineering College of Biological Sciences and Technology,

Beijing Forestry University Beijing 100083, China)

Abstract A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for determination of pelargonidin-3-O-glucoside in Radish Red samples. The sample was dissolved in methanol and separated by a Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm × 5 μm) column using acetonitrile-5% formic acid (24:76 by volume) as a mobile phase with flow rate of 1.0 mL/min at column temperature of 25℃. The UV detection wavelength was set at 525 nm. A good linearity was obtained in the range of 0.01-0.10 g/L with correlation coefficient of 0.999. The average spiked recoveries of pelargonidin-3-O-glucoside was 97% - 100%. The limit of detection for the method was 0.0025 g/L. The results indicated that the method was simple, sensitive and accurate, and could be applied in the determination of pelargonidin-3-O-glucoside in Radish Red.

Key words Radish Red; pelargonidin-3-O-glucoside; high performance liquid chromatography (HPLC)

花色苷类色素作为六大类天然植物色素之一, 广泛存在于自然界的多种植物中。其中食用天然色素中的萝卜红、高粱红、紫甘薯色素、葡萄皮色素均属于花色苷类色素^[1-3]。由于花色苷具有消炎、抗肿瘤、清除氧自由基、抑制脂蛋白氧化和血小板聚集的功能, 从而逐渐成为倍受推崇的食用天然色素^[4-9]。由于花色苷类色素的成分极为复杂多样, 目前这类色素的质量标准仍采用分光光度计测定色素色价, 无法满足人们对色素主体成分的分析要求^[10-13]。为此, 本文首次利用高效液相色谱 (HPLC) 法对食用天然色素萝卜红中的天竺葵-3-O-葡萄糖苷进行定量分析, 旨在为萝卜红色素的生产及应用提供科学依据。

收稿日期: 2009-12-10 修回日期: 2010-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701107); 科技部创新方法工作专项资助项目 (2008M041400, 2009M033200)

第一作者: 游 辉 (1981-), 男, 河南洛阳人, 硕士

通讯作者: 武彦文, Tel: 010-68438903, E-mail: wuyanwen8@gmail.com

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

萝卜红色素(北京金晔生物技术有限公司); 天竺葵-3-O-葡萄糖苷标准品(纯度大于 9%, Sigma 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 甲酸(分析纯, 北京化工厂); 超纯水(电阻率 18.2 MΩ·cm)。FL2200-2 型高效液相色谱仪(UV 检测器)购自浙江福立分析仪器有限公司。

1.2 色谱条件

液相色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm); 流动相: 乙腈 - 5% 甲酸溶液(体积比 24 : 76); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 紫外检测波长: 525 nm。

1.3 标准品与样品溶液的制备

称取天竺葵-3-O-葡萄糖苷标准品 5.0 mg 用甲醇溶解并定容于 5 mL 容量瓶中, 得 1.0 g/L 标准品储备液, 低温保存, 备用。

取一定量萝卜红色素样品, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, 得待测样品溶液, 低温保存, 备用。

1.4 测定方法

分别吸取 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 天竺葵-3-O-葡萄糖苷标准品储备液, 用甲醇定容于 5 mL 容量瓶中配成系列不同质量浓度的标准溶液, 在优化测定条件下进行色谱分析, 根据峰面积绘制标准曲线。

样品测定: 取经 0.45 μm 微孔膜过滤的萝卜红色素溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 比较样品与标准品的高效液相色谱图, 根据组分保留时间进行定性分析, 与标准样品的峰面积及标准工作曲线比较进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

采用多组洗脱溶剂体系(乙腈-甲醇、乙腈-水、甲醇-水)分离样品, 并考察了 pH 值对样品分离度的影响。由于天竺葵-3-O-葡萄糖苷中的酚羟基在水溶液中易发生电离, 极性增强, 在固定相表面形成双重保留机理, 色谱峰拖尾严重, 定量分析误差较大。因此选择在流动相中加入甲酸调节 pH 值。当甲酸体积分数为 10%、9%、7%、5%、3% 时, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷色谱峰对应的保留时间分别为 2.32、2.67、2.97、3.60、4.91 min。结合峰形和保留时间, 确定甲酸体积分数为 5%, 此时流动相的 pH 值不小于 3。在此色谱条件下, 可以明显改善色谱峰的峰形。

以乙腈-甲醇为流动相, 在不加酸的情况下, 色谱峰较宽, 样品未完全分离导致保留时间较短且峰形不佳。流动相为甲醇-水时, 甲醇的洗脱能力不强, 保留时间延长, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷与其他组分的峰重叠, 分离效果差, 峰形不对称, 基线明显漂移。流动相为乙腈-水时, 随着流动相中甲酸水溶液比例的增加, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷峰拖尾和峰形不对称问题得到改善, 可获得理想的保留时间和分离效果。结果表明: 以乙腈-5% 甲酸溶液(24 : 76)为流动相获得了较优的色谱分离效果。

图 1 为优化条件下, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷标样及萝卜红色素样品的高效液相色谱图。

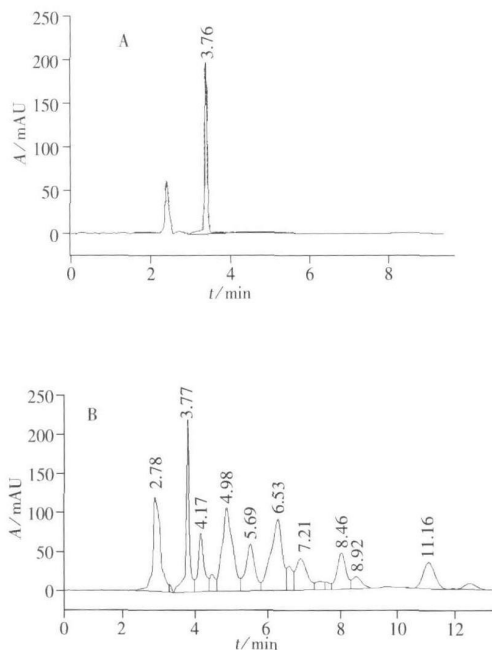


图 1 天竺葵-3-O-葡萄糖苷标样(A)及萝卜红色素样品(B)的高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of peargonidin-3-O-glucoside standard(A) and Radish Red(B)

2.2 线性方程、线性范围及检出限

在优化条件下测定对照品系列标准溶液, 以峰面积 Y 为纵坐标, 质量浓度 X (g/L) 为横坐标, 计算标准曲线方程、线性范围和检出限。线性回归方程为 $Y = 8.61 \times 10^{-8} X - 0.0048$, 相关系数 $r = 0.999$ 。实验表明, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷在 0.01~0.10 g/L 范围内呈良好的线性关系。将标准溶液逐级稀释进样, 测其峰高响应值及基线噪音强度, 以 3 倍信噪比计算检出限为 0.0025 g/L。

2.3 方法回收率、精密度及稳定性

吸取已知含量的萝卜红色素样品溶液, 加入一定量的标准对照品溶液进行测定, 回收率见表 1。平均加标回收率为 97%~100%, 相对标准偏差为 1.2% ($n = 6$), 方法的准确度和精密度均可满足测定要求。

表 1 天竺葵-3-O-葡萄糖苷在萝卜红色素样品中的加标回收率
Table 1 Spiked recoveries of pelargonidin-3-O-glucoside in Radish Red sample

Sample No.	Original ρ_0 / (mg·L ⁻¹)	Added ρ_A / (mg·L ⁻¹)	Found ρ_F / (mg·L ⁻¹)	Recovery R / %	RSD s_r / %
1	68.74	20.00	87.99	99	1.2
2	68.29	20.00	86.81	98	
3	67.94	20.00	87.65	100	
4	68.06	20.00	86.24	98	
5	67.87	20.00	85.29	97	

取相同的萝卜红色素样品溶液在“1.2”条件下进样 10 μ L, 每 2 h 进样 1 次, 共进样 5 次, 测得天竺葵-3-O-葡萄糖苷的含量逐渐下降。其原因主要是由于萝卜红色素样品溶液暴露在室温条件下, 天竺葵-3-O-葡萄糖苷被氧化造成其含量逐渐减少^[14-15]。因此, 在花色苷的检测过程中, 应尽量保证天竺葵-3-O-葡萄糖苷标准溶液与待测样品溶液现做现配, 并在低于 -16 $^{\circ}$ C 条件下保存。

3 结论

本文建立了萝卜红色素中天竺葵-3-O-葡萄糖苷含量的高效液相色谱检测方法。通过对实验条件的优化, 确定了色谱条件。测定结果表明, 该方法的灵敏度和精确度可以满足实际样品检测需要, 适用于萝卜红色素中花色苷含量的测定。

参考文献:

- [1] 尤新. 天然食用色素和功能 [J]. 中国食品添加剂, 2002, 54(5): 1-3
- [2] 武彦文, 吕晓玲, 张泽生, 等. 一种优质的食用天然色素——萝卜红色素——萝卜红色素——萝卜红色素的性质研究 [J]. 天津轻工业学院学报, 2001, 36(3): 24-27
- [3] 孙建霞, 张燕, 孙志健, 等. 花色苷的资源分布以及定性定量分析方法研究进展 [J]. 食品科学, 2009, 30(5): 263-268
- [4] 刘邻渭. 食品化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 116-121
- [5] HERTOOG M G L, HOLIMAN P C H, KATAN M. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in Netherlands [J]. Nutr Cancer, 1993, 20(1): 21-29
- [6] 吕晓玲. 涪陵红萝卜花色苷的初步鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 1985, (6): 19-25
- [7] 霍琳琳. 桑椹红色素的提取纯化及结构初步鉴定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006
- [8] 任玉林, 李华, 郗贵德, 等. 天然食用色素花色苷 [J]. 食品科学, 1995, 16(7): 22-27
- [9] 吕晓玲, 曹东旭, 张泽生, 等. 天然萝卜红色素的抗脂质过氧化功能 [J]. 食品科学, 2001, 21(5): 19-21
- [10] ANNAMARYJU D S. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation [J]. Photochemistry, 1997, 45(4): 671-674
- [11] MAZZA G, MINATIE W. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains [M]. San Diego: Academic Press, 1982
- [12] 庞志申. 花色苷研究概况 [J]. 北京农业科学, 2000, 18(5): 37-42
- [13] MARKAKIS. Anthocyanins as food colors [M]. New York: Academic Press, 1982
- [14] YOU DM K A, MARTIN A, JOSEPH J A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(1): 51-60
- [15] WANG Hong, CAO Guohua, PRIOR R L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins [J]. J Agric Food Chem, 1997, (2): 304-309