

高效液相色谱法快速分析红松、云杉针叶中的维生素 C

刘海玲 杜英君 杨志勇 (中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

High effective liquid chromatographic analysis of vitamin C in *Pinus koraiensis* and *Picea koraiensis* leaves Liu Hailing, Du Yingjun and Yang Zhiyong (*Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015*). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 1994, 5(4): 442-443

This paper introduces a high effective liquid chromatographic method for analysing vitamin C in needles of coniferous trees. The minimum detection limit is 5.0×10^{-8} g, average recovery rate is 89.2-91.8%, and variation coefficient is less than 5%.

Key words High effective liquid chromatography, *Pinus koraiensis*, *Picea koraiensis*, Vitamin C.

1 引言

红松苗越冬伤害是一种光氧化伤害。这种伤害与低温下强光诱导自由基过剩积累有关,而 Vc 对各种自由基具有清除作用^[2,3]。因此,研究红松、云杉针叶体中的 Vc 浓度对探求红松苗越冬伤害及机理有十分重要的意义。本文采用反相 C₁₈ 烷基键合相色谱柱有效分离,紫外检测器检测,测定红松、云杉针叶中的 Vc 含量,现将分析结果报道如下。

2 材料与方法

2.1 样品制备

将红松及云杉针叶清洗干净,用滤纸吸掉多余水分。剪碎,准确称取 50mg 样品,加入 2ml 0.05mol 磷酸缓冲溶液 (pH 7.8),在研钵中研磨,匀浆液在 7500r/min 下离心 7min,吸取一定量的上清液直接进行 HPLC 分析。

2.2 色谱分析

2.2.1 色谱条件 日立胶 3056 (ODS) 色谱柱, $\Phi 4 \times 250$ mm (自装),流动相为 0.5% 磷酸二氢铵,用 HCl 调 pH 至 2.5,流速为 $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 254nm,灵敏度为 0.08AUFS。

2.2.2 定性定量 样品中 Vc 采用色谱保留时间比较法定性,外标法测定其含量。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

为了使 Vc 在色谱上有适当的保留值,选择 pH 为 2.5 时的 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 为流动相,如图 1 所示, Vc 峰只需 4min 就可流出,并可与杂质峰完全分开, 10min 内可完成一个样品的分析。流动相的 pH 值对 Vc 的分离起重要作用,当 pH 在 2.0 - 3.0, Vc 峰的容量因子 (K') 较为理想,如果 pH 增大, Vc 在流动相的稳定性降低,而且峰脱尾现象愈来愈严重,但当 pH 接近 2.0 时,键合相的硅胶和烷基化合物之间形成的化学键会被解离^[1,4],

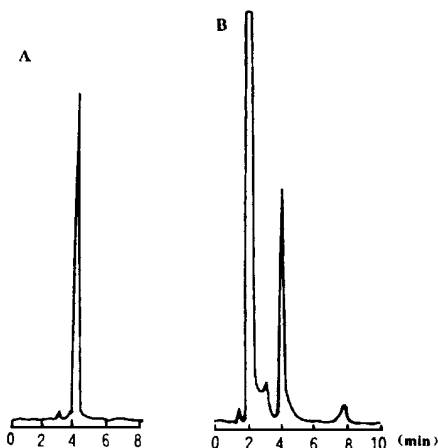


图 1 维生素 C 的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of vitamin C.

A: 标准 Vc 色谱图 Chromatogram of standard vitamin C, B: 红松针叶 Vc 色谱图 Chromatogram of vitamin C in *Pinus koraiensis* needles

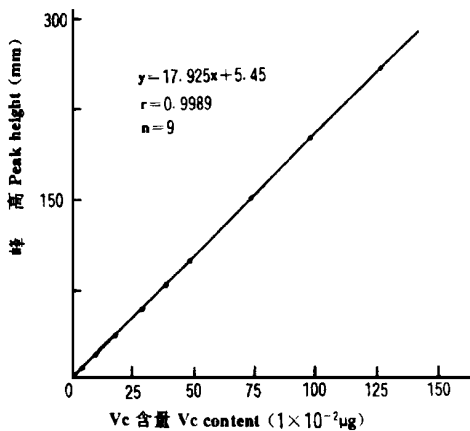


图2 Vc 含量和色谱峰高的关系
Fig 2 Relationship between Vc content and peak height

表 1 Vc 回收率测定结果(n= 5)

Table 1 Detected result of Vc recovery (n= 5)										
	1	2	3	4	5	\bar{X}	本底(mg) Background	加入量(mg) Addition	回收率(%) Recovery	变异系数(%) Variation coefficient
红 松 <i>P inus koraiensis</i>	1. 792	1. 762	1. 775	1. 630	1. 601	1. 712	0. 820	1. 000	89. 2	4. 67
云 杉 <i>P icea koraiensis</i>	1. 687	1. 537	1. 573	1. 592	1. 611	1. 600	0. 682	1. 000	91. 8	3. 12

表 2 红松、云杉针叶中 Vc 的测定结果(mg · g⁻¹)
(1989. 10)

Table 2 Detected result of Vc in *Pinus koraiensis* and *Picea koraiensis* (1989. 10)

Vc 含量 Vc content	云 杉 <i>Picea koraiensis</i>		红 松 <i>Pinus koraiensis</i>	
	全光苗 Solar exposed	遮荫苗 Shaded	全光苗 Solar exposed	遮荫苗 Shaded
	0.524	0.658	0.403	0.153

3.4 实际样品的测定

按照本方法分析了大量的红松、云杉样品, 表 2 为 1989 年 10 月的一个分析实例。从表 2 可看出, 云杉全光苗及遮荫苗 Vc 含量均高于红松全光苗及遮荫苗, 从两种苗木对低温强光下的光氧化伤害来看, 云杉苗抗性强于红松, 这可能与其 Vc 含量高能清除自由基有关。

因此选择流动相的 pH 为 2.5 时最佳。

3.2 线性范围和最小检出量

配制 $5 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 的 Vc 标准溶液, 进样 1 - 25 μl 所得色谱峰高对 Vc 含量绘图(图 2), Vc 含量与峰高为直线关系。当信噪比为 2:1 时, Vc 的最小检出量为 $5 \times 10^{-8} \text{g}$ 。

3.3 回收率

向红松和云杉针叶样品中添加一定量的 Vc 标准品, 按上述方法测定 Vc 含量, 同时测定样品本底, 计算回收率(表 1)。在分析过程中, 只要操作迅速, 注意避免 Vc 氧化, 用 0.05mol 的磷酸缓冲液提取样品可得到 89.2% - 91.8% 的平均回收率, 且变异系数 < 5%。

4 结 论

用高效液相色谱法分离测定红松、云杉针叶中的 Vc, 样品预处理简单, 试剂消耗少, 分析速度快, 灵敏度高, 结果可靠, 并可应用于其它植物样品中 Vc 含量测定。

致谢 承蒙靳月华副研究员审阅, 谨此致谢。

参考文献

[1] 李连朝等. 1986. 用反相高效液相色谱法测定食物、药物和生理体液中的维生素 C. 色谱, 4(6): 334 - 338.
[2] 陶大立等. 1992. 越冬针叶有机自由基产额对低温和光照的反应. 应用生态学报, 3(2): 120- 124.
[3] 靳月华等. 1990. 红松越冬针叶的电子自旋共振 (ESR) 波谱. 应用生态学报, 1(2): 172- 176.
[4] Horvath, C. 1980. High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives. Academic Press, New York, Vol. 2, p. 162.