

高效液相色谱测定食品中抗坏血酸含量的方法优化

崔玲君¹, 孙海新¹, 李洁², 赵美丽¹, 周延培¹

(1. 山东世通检测评价技术服务有限公司, 山东青岛 266000)

(2. 青岛即墨市段泊岚动物卫生与产品质量监督站, 山东即墨 266200)

摘要: 本文通过对样品提取方式、提取剂、流动相等条件进行改进和优化, 建立了一种同步测定食品中 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的方法。针对果蔬样品, 采用液氮冷冻研磨进行预处理, 相比机械匀浆, 可以显著提高提取率, 减少化学试剂用量, 简化前处理操作。为保护 L-抗坏血酸不被氧化, 在偏磷酸提取液中加入 0.019 mol/L 硫代硫酸钠作为保护剂, 结果表明, 实验无需避光操作, 提取物可在 4 °C 24 h 内保持性质稳定; 采用磷酸二氢钾-癸胺缓冲盐混合溶液作为流动相, 可以使不同构型抗坏血酸在较高浓度时依然达到基线分离。抗坏血酸在 0.5 mg/L~200 mg/L 范围内呈良好线性关系, 检出限为 0.04 mg/100 g。样品回收率为 99.7%~107.3%, 相对标准偏差为 3.80%。对于准确测定食品中活性抗坏血酸的组分含量、建立标准化操作规程具有重要意义。

关键词: 抗坏血酸; 同步测定; 高效液相色谱; 食品

文章编号: 1673-9078(2018)04-258-263

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.038

Determination of Ascorbic Acid Content in Food by the Optimized HPLC

Method

CUI Ling-jun¹, SUN Hai-xin¹, LI Jie², ZHAO Mei-li¹, ZHOU Yan-pei¹

(1. Shandong seatone Detection Evaluation Co.Ltd., Qingdao 266000, China)

(2. Qingdao Jimo Duanbolan Animal Health and Product Quality Supervision Station, Jimo 266200, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of L-ascorbic acid, D-ascorbic acid and dehydroascorbic acid in food was established in this paper by optimizing and improving the sample extraction, extraction agent and mobile phase. Compared with mechanical homogenate, the liquid nitrogen freeze-grinding pretreatment could significantly improve the extraction rate, reduce the dosage of chemical reagents and simplify the pretreatment process for fruit and vegetable samples. 0.019 mol/L sodium thiosulfate was added as a protective agent in the metaphosphoric acid to protect L-ascorbic acid from being oxidized. The results showed that the experiment did not be protected from light, and the extract remained stable within 24 h at 4 °C. The baseline separation for different configurations of ascorbic acid in high concentration could be achieved by using potassium dihydrogen potassium-decylamine as the buffer solution. Ascorbic acid showed a good linear relationship in the range of 0.5 mg/L to 200 mg/L and the detection limit was 0.04 mg/100g. The average recoveries were 99.7%~107.3% and the relative standard deviation was 3.80% (n=5). Consequently, it was of great significance to establish a standardized operating procedure for accurately determining the content of active ascorbic acid in food.

Key words: ascorbic acid; synchronous determination; HPLC; food

L-抗坏血酸(又称维生素 C), 是人体每日膳食推荐供应量最大的一种维生素^[1], 它能够广泛参与机体内的各种氧化还原反应, 对人体新陈代谢及生命活动

收稿日期: 2017-11-06

基金项目: 山东省泰山产业领军人才工程项目(鲁政办发[2016]190号); 青岛市“人才特区”项目(2016); 山东半岛国家自主创新示范区发展建设资金项目(鲁科字[2017]41号)

作者简介: 崔玲君(1988-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 食品检测技术研究与开发

通讯作者: 孙海新(1978-), 男, 博士, 工程技术应用研究员, 研究方向: 食品安全与质量控制

具有重要的影响。然而人体自身不能合成抗坏血酸, 只能从食物中摄取^[2]。因此准确测定食品中抗坏血酸的含量, 对于评价食品的营养价值和食品质量控制具有重要意义。目前常见的抗坏血酸测定方法有滴定法^[3]、电化学法^[4,5]、毛细管电泳法^[6]、紫外光度法^[7]、荧光法^[3,8]、原子吸收光谱法^[9]以及液相色谱法^[10,11]等, 以上方法均具有各自的优越性, 但是由于 L-抗坏血酸极不稳定, 遇空气中氧、热、光、碱性物质, 特别是在有氧化酶及痕量铜等金属离子存在时, 易被氧化成为脱氢型抗坏血酸, 因此保护 L-抗坏血酸不被氧化是各检测方法的技术关键。另外, L-抗坏血酸的光学异

构体-D-抗坏血酸,也常被用作食品添加剂,但其抗氧化活性只有L-抗坏血酸的5%^[12]。因此,要准确测定食品中活性抗坏血酸的含量,即需要将不同构型的抗坏血酸区分测定,以上研究大都没有区分测定不同构型的抗坏血酸,而是测定抗坏血酸的总量。目前,国内外对液相色谱法测定不同构型的抗坏血酸含量已经开展了广泛研究,其中克服提取物稳定性差,抗坏血酸同分异构体化学性质相似,色谱分离不佳,前处理步骤繁琐等问题^[13],成为标准化食品检测机构的行业技术瓶颈。针对上述问题,本文从样品预处理、提取剂选择、色谱条件等方面进行了探索优化,建立了一种L-抗坏血酸、D-抗坏血酸和脱氢抗坏血酸同步测定方法,对于准确测定食品中活性抗坏血酸的组分含量、建立标准化操作规程具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

G1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦;D-500 均质乳化机,德国维根斯;XW-80A 漩涡混合器,上海沪西分析仪器厂有限公司;液氮,青岛城阳长松气体有限公司;研钵,北京金志业仪器设备有限公司;YCFS20-1000-S 聚能式超声波振动棒,杭州远成超声波科技有限公司;CF15RXII 高速冷冻离心机,日本日立;CP225D 电子天平,德国赛多利斯;MTN-5800

氮吹仪,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;FE20+LE427 pH 计,瑞士梅特勒-托利多。

1.2 试剂

L-抗坏血酸标准品、D-抗坏血酸标准品(≥99%,Sigma);偏磷酸、硫代硫酸钠、磷酸二氢钾、草酸、磷酸、磷酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);癸胺(分析纯,Sigma);L-半胱氨酸(分析纯,上海埃彼化学试剂有限公司);实验用水为GB/T 6682 规定的一级水。

1.3 实验方法

1.3.1 HPLC 色谱条件

Agilent(SB-C18, 4.6×250 mm, 5 μm)反相色谱柱;流动相为磷酸二氢钾-癸胺混合溶液,浓度分别为0.025 mol/L、4.3 mmol/L, pH=2.7;检测波长 245 nm(抗坏血酸在 244 nm~265 nm 有最大吸收峰^[14]);流速 0.7 mL/min;柱温 27 °C;进样量 10 μL。

1.3.2 标准曲线的绘制

用偏磷酸-硫代硫酸钠混合溶液(浓度分别为0.25 mol/L、0.019 mol/L),将混合标准品储备液适当稀释,配制成系列混合标准品工作液,在 1.3.1 节所述色谱条件下,采用外标法对系列标准溶液的峰面积(y)和相应的质量浓度(x)进行线性回归计算,见表 1。

表 1 L-抗坏血酸和 D-抗坏血酸的线性方程

Table 1 Regression equations of L-ascorbic acid and D-ascorbic acid

组分	线性方程	相关系数(r)	检出限/(mg/100 g)	定量限/(mg/100 g)
L-AA	$y = 46.83x + 1.86$	0.9999	0.04	0.14
D-AA	$y = 58.69x - 8.36$	0.9999	0.04	0.14

1.3.3 样品前处理

A 液制备:称取 2~3 g 样品(精确至 0.001 g)置于具塞离心管中,加入 0.25 mol/L 偏磷酸和 0.019 mol/L 硫代硫酸钠混合提取液,涡旋溶解并定容至 25 mL。摇匀,冰浴超声 3 s、间歇 5 s, 90~100 个循环;0 °C、9000 r/min 离心 5 min,吸取部分上清液,经 0.22 μm 水相膜过滤后转移至棕色瓶中,用于测定 L-抗坏血酸和 D-抗坏血酸含量;

B 液制备:取 10 mL A 液,离心后收集上清液于具塞离心管中,加入 5 mL 现配 0.177 mol/L 的 L-半胱氨酸溶液,用磷酸三钠溶液调节 pH 至 7.0~7.2,常温振荡 5 min。

再用磷酸调节 pH 至 2.5~2.8,用高纯水定容至 25 mL。摇匀,经 0.22 μm 水相膜过滤后转移至棕色瓶中,用于测定 L-抗坏血酸的总量。

1.4 结果计算与数据处理

按下式计算试样中抗坏血酸的含量:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m \times 1000} \times F \times 100$$

式中: X 为试样中抗坏血酸含量, (mg/100 g); C 为样液中抗坏血酸的质量浓度, (mg/L); C₀ 为样品空白液中抗坏血酸的质量浓度, (mg/L); V 为试样的最后定容体积, (mL); m 为实际检测试样质量, (g); 1000, 100 均为换算系数(由 mg/L 换算成 mg/mL 的换算因子); F 为稀释倍数(发生还原步骤为 2.5)。

L-抗坏血酸、D-抗坏血酸的含量直接由上式计算得出;脱氢抗坏血酸含量由 B 液中测得的 L-抗坏血酸总量与 A 液中测得的 L-抗坏血酸含量之差计算得到。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。采用 SPSS 软件对数据进行显著性

检验。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 流动相的选择

考察磷酸二氢钾和癸胺的浓度对两种抗坏血酸峰形和分离效果的影响,不同浓度组成时的 HPLC 图见图 1。由图中 a、b 和 c 可知,随着癸胺浓度的提高,分离度有所提高,癸胺有增加 D-抗坏血酸保留时间的作用^[12]。当磷酸二氢钾-癸胺缓冲盐溶液浓度分别为 0.05 mol/L、 8.6×10^{-3} mol/L 时分离度最佳,但太高的缓冲盐浓度会缩短色谱柱使用寿命,因此,将磷酸二氢钾-癸胺浓度同时减半,即浓度分别为 0.025 mol/L、 4.3×10^{-3} mol/L 时,分离效果最好,峰形尖锐、对称(见图 1d)。出峰顺序依次为 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸,故选择该浓度的缓冲盐作流动相。

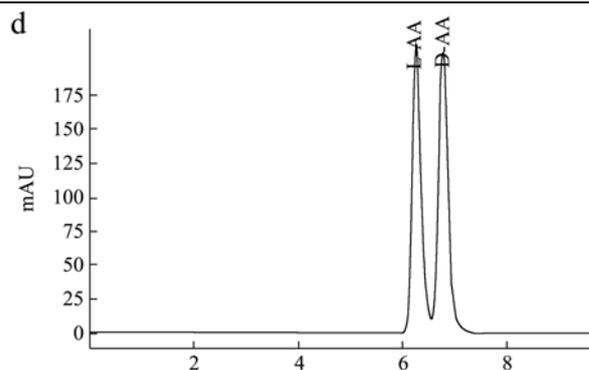
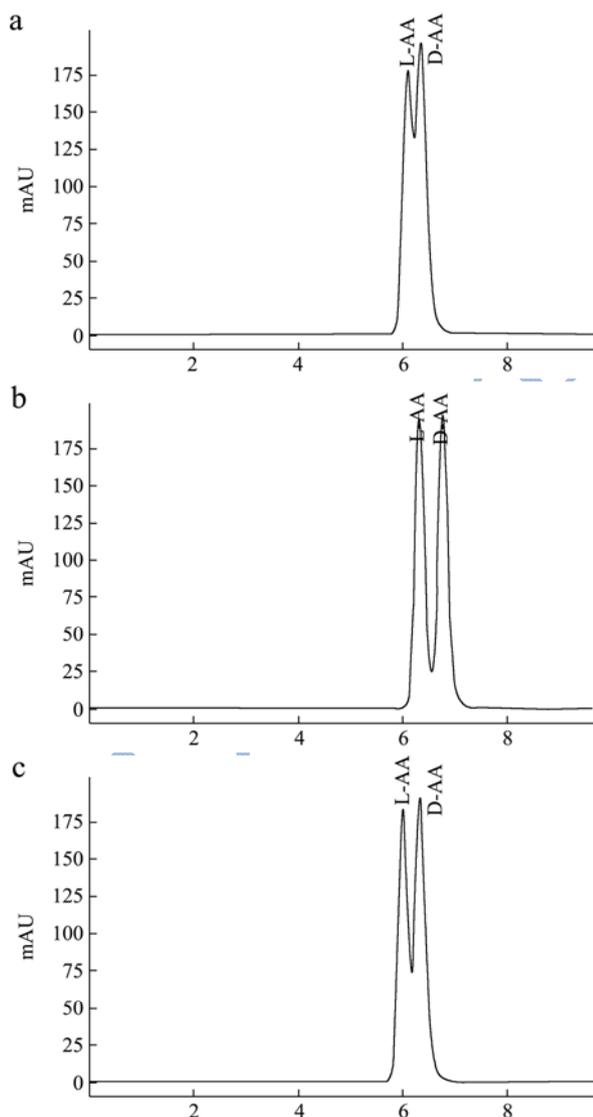


图 1 标准溶液在不同流动相配比时的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of standard solution at different mobile phase ratios

注: KH_2PO_4 -Decylamine: a: $0.05-5.8 \times 10^{-3}$ mol/L, b: $0.05-8.6 \times 10^{-3}$ mol/L, c: $0.05-11.6 \times 10^{-3}$ mol/L, d: 0.025×10^{-3} mol/L。

2.1.2 破碎处理方式对提取效果的影响

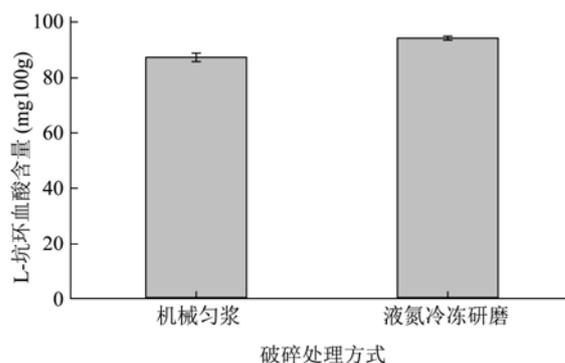


图 2 破碎处理方式对提取效果的影响

Fig.2 Effect of crushing treatment on the extraction efficiency

针对果蔬样品的前处理,对比了机械匀浆^[15]和液氮冷冻研磨两种破碎方法对提取效果的影响(见图 2)。机械匀浆:取 100 g 左右样品,加入等质量的提取液,经均质机均质并混合均匀,然后取 4~6 g (精确至 0.001 g) 匀浆试样,用于测试。液氮冷冻研磨:称取 2~3 g (精确至 0.001 g) 样品置于研钵中,加入适量液氮,迅速研磨至细粉,然后加入提取液混匀,全部转移至离心管中用于测试。由图 2 可知,猕猴桃果实经机械匀浆后 L-抗坏血酸获得量为 87.30 mg/100 g,经液氮冷冻研磨获得量为 94.20 mg/100 g,两者相差 6.90 mg/100 g,经 t 检验,两者在 95%置信区间内存在显著性差异。二者比较,以液氮冷冻研磨提取效果更好。并且使用液氮研磨还有以下优势:样品用量少,便于进行加标回收实验。

2.1.3 提取剂的选择

抗坏血酸具有较强的还原性,容易受到光照、温度、金属离子和贮存条件等的影响^[16],但在酸性条件

下相对稳定^[17], 因此选取了 0.10 mol/L 草酸、0.10 mol/L 磷酸、0.25 mol/L 偏磷酸作为提取剂, 使用羊乳粉样品, 分别做三水平添加回收实验, 结果显示用 0.25 mol/L 偏磷酸作为提取液回收率高, 且不同添加水平之间的相对标准偏差小, 见表 2。因此实验选取 0.25 mol/L 偏磷酸作为提取液。

按外标法计算, 测得此乳粉中只含有 L-抗坏血酸, 含量为 81.50 mg/100 g, 不含 D-抗坏血酸, 该乳粉标签显示维生素 C 平均含量为 87.29 mg/100 g, 测定值为示值的 93.4%。食品营养强化剂使用标准中规定, 维生素 C 的使用量为 30 mg/100 g~100 mg/100 g^[18], 此乳粉符合标准。

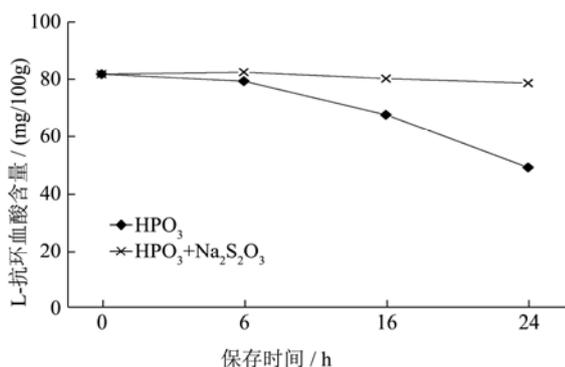


图 3 硫代硫酸钠对提取物稳定性的影响

Fig.3 Effect of Na₂S₂O₃ on the stability of extractive

稳定性实验: 对比偏磷酸提取液和含硫代硫酸钠保护剂的偏磷酸提取液, 提取的样品稳定性。分别在 4 °C 下放置 0 h、6 h、16 h、24 h, 依次测定其抗坏血酸含量 (见图 3), 显然, 随着放置时间的延长, 偏磷酸提取的样品抗坏血酸含量呈下降趋势, 24 h 后减少 40%, 可见 0.25 mol/L 偏磷酸提取液提取的样品性质

表 2 提取液对回收率的影响 (n=5)

Table 2 Effect of extraction solution on the recoveries of ascorbic acid (n=5)

提取剂	本底值(mg/100 g)	添加水平/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)	平均回收率/%	相对标准偏差 RSD%
草酸	81.50	8.2	91.11	80.12	6.89
		82.6	155.00	77.30	
		162.4	239.70	90.40	
磷酸	81.50	8.2	89.02	79.70	6.52
		82.6	160.27	92.00	
		162.4	244.89	89.60	
偏磷酸	81.50	8.2	90.30	107.30*	3.80
		82.6	163.90	99.70*	
		162.4	249.50	103.40*	

注: *, p<0.05, 存在显著性差异。

2.2 方法应用-山楂饮料中抗坏血酸含量测定

称取 2~3 g 样品 (精确至 0.001 g) 置于具塞离心

不稳定。而当在偏磷酸提取液中加入 0.019 mol/L 硫代硫酸钠时, 样品提取物可以在 24 h 内保持稳定, 相对标准偏差 RSD<2%, 无显著性差异 (见图 3), 且实验过程无需避光, 说明加入硫代硫酸钠保护剂, 可以克服批量检验周期长所导致抗坏血酸氧化的问题, 这与李野^[19]研究结果吻合。

2.1.4 氮吹除氧对抗坏血酸提取效果的影响

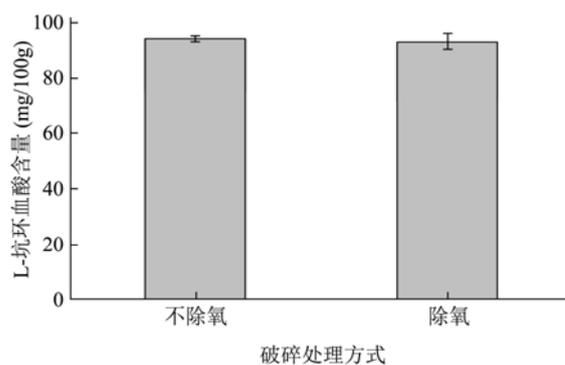


图 4 氮吹除氧对抗坏血酸提取效果的影响

Fig.4 Effect of the treatment (with or without nitrogen) on the extraction of ascorbic acid

研究表明, 在充足的氮气条件下, 可以有效避免抗坏血酸的损失^[20]。上述 1.3.3 步骤中, 将提取得到的样品溶液氮吹 10 min, 以排除试液和离心管中的氧气, 测定结果见图 4, 猕猴桃样品溶液氮吹除氧得到抗坏血酸含量为 93.01 mg/100 g, 不除氧测得 94.20 mg/100 g, 两者无显著差异; 且除氧操作使得结果相对标准偏差大, 可能是在氮吹除氧过程中, 氮吹管接触试液导致样品损失, 引入操作误差。综上, 只需将提取液预先氮吹除氧, 样品溶液无需再次除氧。

管中, 加入 1 g C18 填料用于吸附样品中的杂质, 其他操作均按照 1.3.3 节进行, 色谱图见图 5, 色谱峰峰型对称, 两种抗坏血酸分离度高, 有一个非目标化合

物峰,无干扰。此饮料中同时含有 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸,不含脱氢抗坏血酸。根据外标法计算,L-抗坏血酸、D-抗坏血酸含量分别为 0.93 mg/100 g、1.64 mg/100 g。其中 L-抗坏血酸既是营养物质又是抗氧化剂,D-抗坏血酸有保色的作用,抗氧化作用不大。即该饮料中有生理活性的抗坏血酸含量不到 40%。

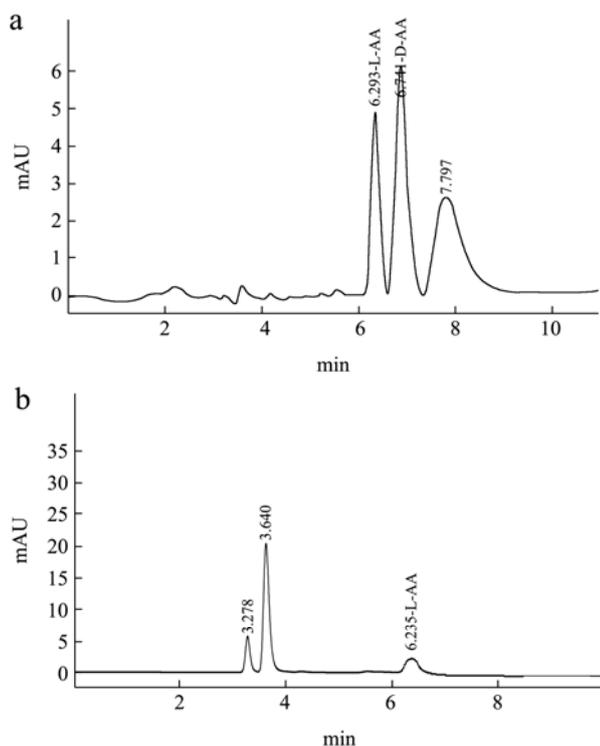


图5 山楂饮料的高效液相色谱图

Fig.5 HPLC of hawthorn beverages

注: a-A液、b-B液。

3 结论

3.1 本文通过对流动相、破碎方法、提取剂的探索优化,建立了一种同步测定食品中 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的方法。该方法可以区分测定不同构型的抗坏血酸,前处理操作简单高效、样品性质稳定,适用于水果、蔬菜、果汁和乳粉等样品中抗坏血酸含量的测定,应用范围广泛。为食品检测行业建立标准化操作规程、准确测定食品中各种抗坏血酸组分的含量及客观评价食品的营养价值提供了技术支持。

3.2 该方法需要将脱氢抗坏血酸还原成 L-抗坏血酸,然后计算得到脱氢抗坏血酸的含量,今后研究的关键应该是脱氢抗坏血酸不经过还原而与 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸同步测定,这是具有挑战性的。最佳的解决方案可能是使用通用型探测器通过检测物理化学性质而同步测定不同的抗坏血酸。比如,带电气溶胶检测(CAD)可以分别测定不同物质的性质。另外,液相色谱-质谱联用同步测定 L-抗坏血酸、D-抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的报道并不多见,这些工作需要在今后的技术方法开发中进一步探索。

参考文献

- [1] 曾翔云.维生素 C 的生理功能与膳食保障[J].中国食物与营养,2005,4:52-54
ZENG Xiang-yun. Physiological function and dietary suppression of Vitamin C [J]. Food and Nutrition in China, 2005, 4: 52-54
- [2] 王海佳.紫外分光光度法研究维生素 C 的稳定性及蔬果和果汁中含量的测定[D].太原:山西医科大学,2015
WANG Hai-jia. Study the stability of Vitamin C by ultraviolet spectrophotometry and determination of the contents in several kinds of fruits, vegetables and juices [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015
- [3] GB/T 5009.86-2003,蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定(荧光法和 2,4-二硝基苯肼法)[S]
GB/T 5009.86-2003, Determination of total ascorbic acid in fruits, vegetables and derived products-fluorometric method and colorimetric method [S]
- [4] 谢志方.氢氧化钠两点电位滴定法测定维生素 C 含量[J].广州化工,2011,39(15):125-127
XIE Zhi-fang. Determination of Vitamin C by the method of two-point potentiometric titration with sodium hydroxide [J]. Guangzhou Chemical Industry and Technology, 2011, 39(15): 125-127
- [5] 胡溪育,冯珍鸽,王力.水果中抗坏血酸的电化学检测[J].食品研究与开发,2012,33(3):109-112
HU Xi-yu, FENG Zhen-ge, WANG Li. Electrochemical detection of ascorbic acid in fruits [J]. Food Research and Development, 2012, 33(3): 109-112
- [6] Wang J, Chatrathi MP, Tian BM, et al. Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(11): 2514-2518
- [7] 开启余.紫外分光光度法测定 Vc 银翘片中维生素 C 含量[J].福建分析测试,2015,3:35-37
KAI Qi-yu. Ultraviolet spectrophotometric method determination of the content of the Vitamin C in the Vc fructus forsythiae flakes [J]. Fujian Analysis and Testing, 2015, 3: 35-37
- [8] 熊晓燕,刘一.荧光法测定保健食品 C 蜂胶胶囊中维生素 C 含量[J].预防医学情报杂志,2013,29(14):293-294
XIONG Xiao-yan, LIU Yi. Fluorescence method to

- determine the Vitamin C content in Vitamin C in Bee propolis capsules [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2013, 29(14): 293-294
- [9] 莫超群,张六龄,蒋召涛,等.间接原子吸收法测定饮料蔬果中维生素 C[J].*化学研究与应用*,2011,23(8):1099-1103
MO Chao-qun, ZHANG Liu-ling, JIANG Zhao-tao, et al. Indirect determination of ascorbic(Vc) in drinks, fruit and vegetable by atomic absorption spectrometry [J]. *Chemical Research and Application*, 2011, 23(8): 1099-1103
- [10] Clark Z D, Frank E L. Development and implementation of an HPLC-ECD method for analysis of Vitamin C in plasma using single column and automatic alternating dual column regeneration [J]. *Practical Laboratory Medicine*, 2016, 6: 25-37
- [11] Gazdik Z, Zitka O, Petrlova J, et al. Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection [J]. *Sensors*, 2008, 8(11): 7097-7112
- [12] Fontannaz P, Kiliç T, Heudi O. HPLC-UV determination of total Vitamin C in a wide range of fortified food products [J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(4): 626-631
- [13] Nováková L, Solich P, Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(10): 942-958
- [14] Song WO, Beecher GR, Eitenmiller RR. Modern analytical methodologies in fat and water-soluble vitamins(chemical analysis series) [Z]. New York, USA: John Wiley and Sons, 2000
- [15] GB 5009.86-2016,食品中抗坏血酸的测定[S]
GB 5009.86-2016, Determination of Ascorbic Acid in Food [S]
- [16] Antonelli ML, D'ascenzov G, Laganà, A, et al. Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination [J]. *Talanta*, 2002, 58(5): 961-967
- [17] 张嘉嘉,孙鹏,周道顺,等.高效测定柿叶中维生素 C 的反相液相色谱法[J].*计算机与应用化学*,2013,30(11):1379-1382
ZHANG Jia-jia, SUN Peng, ZHOU Dao-shun, et al. High efficiency determination of Vitamin C in persimmon leaf by reversed phase liquid chromatography [J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2013, 30(11): 1379-1382
- [18] GB 14880-2012,食品营养强化剂使用标准[S]
GB 14880-2012, Standard for the Use of Food Fortification Enhancers [S]
- [19] 李野,尹利辉,高尚,等.食品和药品中维生素 C 含量测定方法的研究进展[J].*药物分析杂志*,2016,36(5):756-764
LI Ye, YIN Li-hui, GAO Shang, et al. Research progress of Vitamin C content determination in food and drug [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(5): 756-764
- [20] Eduardo G, Carmen L, Belen G. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(5): 587-592