

高压液相色谱法同时测定食品中抗坏血酸与异抗坏血酸的含量

张清¹, 李刚^{1,2*}

(1. 吉林农业大学食品与科学工程学院, 长春 130118;
2. 吉林省产品质量监督检验院, 长春 130022)

摘要: **目的** 建立食品中同时测定抗坏血酸和异抗坏血酸含量的高压液相色谱检测方法。**方法** 用乙腈-0.1%磷酸水溶液(90:10, v/v)作流动相和提取液, 以 Venusil HILIC 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 100 Å)分离抗坏血酸和异抗坏血酸。**结果** 抗坏血酸的平均回收率为 96.61%, 异抗坏血酸的平均回收率为 96.53%, 异抗坏血酸和抗坏血酸最低检出浓度分别为 0.35 μg/mL 和 0.42 μg/mL。**结论** 该方法准确、灵敏、精密度高, 适用于食品中抗坏血酸与异抗坏血酸的测定。

关键词: 抗坏血酸; 异抗坏血酸; 高压液相色谱; Venusil HILIC 色谱柱

Simultaneous determination of ascorbic acid and isoascorbic acid in food by high pressure liquid chromatography

ZHANG Qing¹, LI Gang^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Jilin Product Quality Supervision and Inspection Research Institute, Changchun 130022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high pressure liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of the contents of ascorbic acid and isoascorbic acid in food. **Methods** Ascorbic acid and isoascorbic acid were separated using a Venusil HILIC column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 100 Å), taking acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (90:10, v/v) as the mobile phase and extractant. **Results** The average recoveries of ascorbic acid and isoascorbic acid were 96.61% and 96.53%. And their minimum detectable concentration was 0.35 μg/mL and 0.42 μg/mL. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and of precision, and can be used for the determination of ascorbic acid and isoascorbic acid in food.

KEY WORDS: ascorbic acid; isoascorbic acid; high pressure liquid chromatography; Venusil HILIC column

1 引言

抗坏血酸, 即 L-抗坏血酸, 又称 AA, 是重要的人体营养成分。抗坏血酸广泛存在于新鲜的水果, 蔬

菜中^[1,2], 人体不能自身合成, 必须靠摄取获得, 严重缺乏时可引起坏血病^[3]。异抗坏血酸(D-抗坏血酸), 也叫 iso-AA, 是 L-抗坏血酸的光学异构体, 常用做食品抗氧化剂, 具有保鲜保质的作用。它也可参与人

基金项目: 吉质监标函(2011235)

Fund: Supported by Jilin Province Bureau of Quality and Technology Supervision Local Standards Letter (2011235)

*通讯作者: 李刚, 教授, 主要研究方向为食品分析检测。E-mail: lg56k@yahoo.com.cn

*Corresponding author: LI Gang, Professor, Jilin Province Product Quality Supervision Test Institute. No.1088, Nanhu Road, Changchun 130022, China. E-mail: lg56k@yahoo.com.cn

体生理代谢,但其活性只有抗坏血酸的5%,在人体消化过程中可能存在与L-抗坏血酸的竞争作用,从而影响人体对L-抗坏血酸的吸收与生理营养作用的发挥^[4]。目前研究抗坏血酸测定方法的报道较多,主要有荧光法^[5,6]、高压液相色谱法^[7-9]、高压毛细管电泳法^[10-12]、分光光度法^[13,14]、微生物法^[15]等。国家标准GB/T5009.86-2003和GB/T5009.159-2003规定了测定食品中抗坏血酸含量的荧光法、2,4-二硝基苯肼法和分光光度法,这些方法主要的缺点是只能检测总抗坏血酸的含量,而没有区分抗坏血酸和异抗坏血酸^[16,17]。近年来发展了用高压液相色谱法测定维生素C的含量的方法,具有高效、快速、稳定、可靠等特点。由于抗坏血酸和异抗坏血酸极性近似,通常要求柱前衍生后再分离,费时费力,在衍生化阶段抗坏血酸也会被氧化损失;或者在流动相中加入有机胺类离子对试剂,此类试剂价格较贵,对检测灵敏度也有不利影响。

本研究采用Venusil HILIC色谱柱同时分离检测食品中抗坏血酸和异抗坏血酸含量,以期对相关食品中抗坏血酸和异抗坏血酸含量的测定提供新方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent1100液相色谱仪(配置自动进样器、色谱工作站、二元泵、VWD可见波长紫外检测器和DAD二极管阵列检测器、柱温箱,美国Agilent公司);SHP-115电子分析天平(德国梅特勒-托利多公司);一次性无菌注射器(陕西海达医疗器械科技有限公司);HPD-25无油真空泵(天津恒奥科技有限公司);微量台式离心机(美国贝克曼公司);KQ-250DE医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);超纯水(自制)。

乙腈(美国Tedia公司,色谱纯),乙腈(北京化工厂,分析纯),磷酸(北京益利精细化学品有限公司,分析纯)。

抗坏血酸(国药集团化学试剂有限公司,含量99.7%);异抗坏血酸(武汉鑫华远医药化工制造有限公司,含量99.7%)。

2.2 方法

2.2.1 流动相的配制及标准溶液的配制

0.1%磷酸水溶液配制:用吸量管准确量取1 mL 85%磷酸置于1000 mL容量瓶中,加水稀释并定容至刻度。

标准品的配置:准确称取抗坏血酸和异抗坏血酸各100 mg于100 mL容量瓶中,用乙腈-0.1%磷酸水溶液(90:10, v/v),配制1000 μg/mL的标准品液。抗坏血酸标准溶液每次使用前新配。由于抗坏血酸对光不稳定,遇氧易分解,故本实验应避光操作,整个实验均用棕色容量瓶定容^[18]。

2.2.2 样品的处理

抗坏血酸易溶于水,有较强的还原性,在中性或碱性条件下易被氧化。为防止抗坏血酸被氧化^[19],应使其处于酸性条件下。

果汁类样品:准确称取20 g样品,精确至0.001 g,置于50 mL容量瓶中,加流动相乙腈-0.1%磷酸(90:10, v/v)水溶液适量,混匀后,加流动相定容至刻度。试样溶液中含有较高比例的乙腈,有利于降低粘稠度。充分振荡混匀后,取此试样溶液适量,用0.45 μm一次性微孔滤膜过滤至2 mL进样瓶中,待测。

软饮料水溶性样品:准确称取样品5 g,精确至0.001 g,置于50 mL容量瓶中,加0.1%磷酸水溶液适量,振荡溶解后,加流动相定容至刻度。溶液充分振荡混匀后,用0.45 μm一次性微孔滤膜过滤至2 mL进样瓶中,待测。

罐头制品:取有代表性的部分匀浆后,称取样品12.5 g,精确至0.001 g,置于50 mL容量瓶中,加0.1%磷酸水溶液定容至刻度,4000 r/min离心10 min。精确量取上清液10 mL,置于25 mL容量瓶中,加流动相定容至刻度。充分振荡混匀后,用0.45 μm一次性微孔滤膜过滤至2 mL进样瓶中,待测。

婴幼儿奶粉、保健食品水不溶性固体样品:准确称取样品12.5 g,精确至0.001 g,置于250 mL烧杯中,精确加入0.1%磷酸水溶液50 mL,匀浆后,4000 r/min离心10 min。取上清液10 mL,置于25 mL容量瓶中,加流动相定容至刻度。充分振荡混匀后,用0.45 μm一次性微孔滤膜过滤至2 mL进样瓶中,待测。

2.3 色谱条件

Venusil HILIC色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm, 100 Å),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(90:10, v/v),柱温30 °C;检测波长243 nm,流速为1.0 mL/min,进样体积5 μL。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

取配制好的抗坏血酸和异抗坏血酸标准溶液适

量, 分别进样, 用二极管阵列紫外检测器记录色谱图和光谱图(见图 1、图 2), 发现在此色谱条件下抗坏血酸和异抗坏血酸的最大吸收均在 243 nm, 故本实验以 243 nm 作为检测波长。

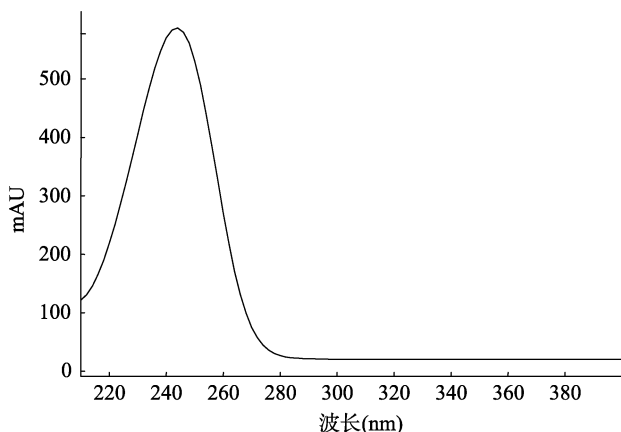


图 1 抗坏血酸的紫外光谱图

Fig. 1 UV spectrogram of ascorbic acid

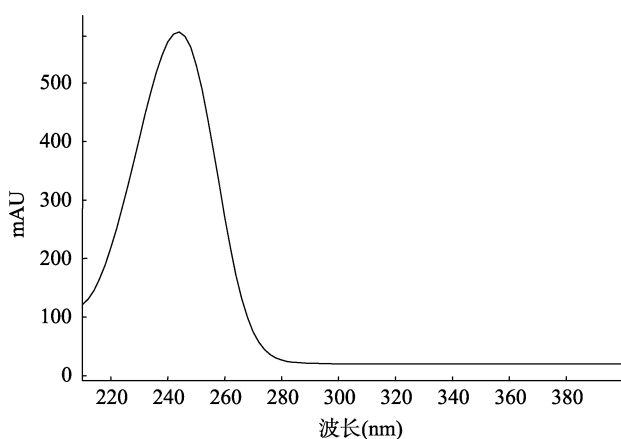


图 2 异抗坏血酸的光谱图

Fig. 2 UV spectrogram of isoascorbic acid

3.2 流动相比例的优化

改变流动相中乙腈比例, 比较不同比例流动相下抗坏血酸和异抗坏血酸的理论塔板数和分离度, 找到抗坏血酸和异抗坏血酸检测的最佳流动相比例。流动相中乙腈比例和保留时间关系见表 1。

根据试验结果, 发现抗坏血酸和异抗坏血酸在 HILIC 色谱柱上的保留规律与一般的 C_{18} 色谱柱不同, 使用乙腈和 0.1% 的磷酸水溶液作为流动相, 当乙腈

的比例大于 80% 时, 抗坏血酸和异抗坏血酸可以得到色谱分离, 且随着流动相中乙腈比例增加, 抗坏血酸和异抗坏血酸的保留时间变长, 分离度也增加, 在乙腈比例为 90% 时有最好的分离效果和检测灵敏度。当乙腈比例大于 95% 以后, 由于水溶性的抗坏血酸和异抗坏血酸在流动相中溶解度降低, 造成色谱峰峰形变差。因此, 确定乙腈和 0.1% 磷酸水溶液的比例为 90:10 作为液相色谱检测方法的流动相。

3.3 HPLC 色谱图对比

抗坏血酸和异抗坏血酸标准品的 HPLC 图和样品饮料中的 HPLC 图见图 3、图 4, 可以看出抗坏血酸和异抗坏血酸标准品和样品的色谱峰一致。

3.4 标准曲线的绘制及相关性

取 2.2.1 配置的标准溶液稀释成 10、30、50、90、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗坏血酸与异抗坏血酸混标溶液。进样量为 5 μL 。所得标准曲线见图 5、图 6。以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得

抗坏血酸的线性回归方程: $Y=14974.96266X-12.3630$ ($R=0.99997$)。

异抗坏血酸线性回归方程: $Y=13166.12X-4.0672$ ($R=0.99995$)。

3.5 稳定性试验

取同一份混标溶液, 分别于 0、6、12、18、24 h 进样 5 μL , 记录色谱图。详细数据见表 2。由表 2 可知, 此溶液在 6 h 内保持稳定, 此后由于样品氧化峰面积逐渐变小, 因此本实验应快速进行。

3.6 精密度实验

称取 2.2.1 配置的混标溶液 10 μL , 连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算抗坏血酸和异抗坏血酸的 RSD(见表 3), 分别为 0.09% 和 0.38%, 可见精密度良好。

3.7 回收率实验

取果汁、软饮料、罐头、婴幼儿奶粉、保健食品 5 种样品, 每种样品各精密称取 10 份, 每个样品做 5 次平行样的测定, 每份 5 g, 每份分别加入抗坏血酸另外 5 份样品作为对照, 分别置于 50 mL 容量瓶中, 和异抗坏血酸 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混标溶液 2、5、10 mL, 加提取液提取, 依法进样, 计算样品添加回收率。详

表1 流动相中乙腈和0.1%磷酸水溶液比例与抗坏血酸/异抗坏血酸保留时间、理论塔板数的关系
Table 1 Relationships of the proportion between acetonitril and 0.1% H₃PO₄ in mobile phase and the retention time, plates of ascorbic acid and isoascorbic acid

乙腈 (% v)	0.1% H ₃ PO ₄ (% v)	抗坏血酸/异抗坏血酸保留时间 t(min)	分离度	抗坏血酸/异抗坏血酸的塔板数(n)
95	5	18.307/12.352	11.31	12636/15232
93	7	13.123/9.686	8.72	13087/13905
90	10	9.672/7.828	6.54	14875/16271
85	15	6.912/6.064	4.05	15398/15495
80	20	5.771/5.27	2.87	15722/16467

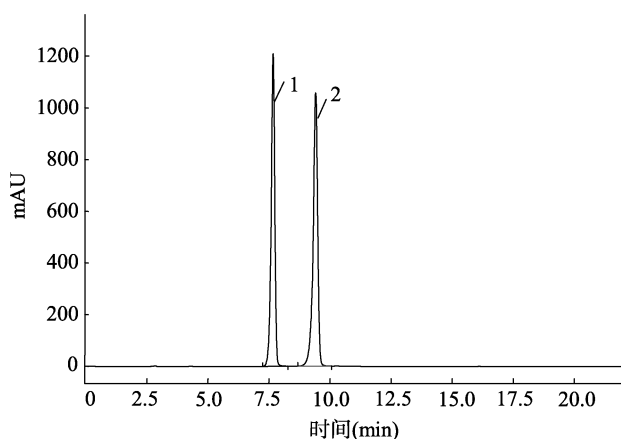


图3 抗坏血酸和异抗坏血酸标准溶液色谱图

1. 异抗坏血酸; 2. 抗坏血酸

Fig. 3 Chromatogram of ascorbic acid and isoascorbic acid standard solution
1. isoascorbic acid; 2. ascorbic acid

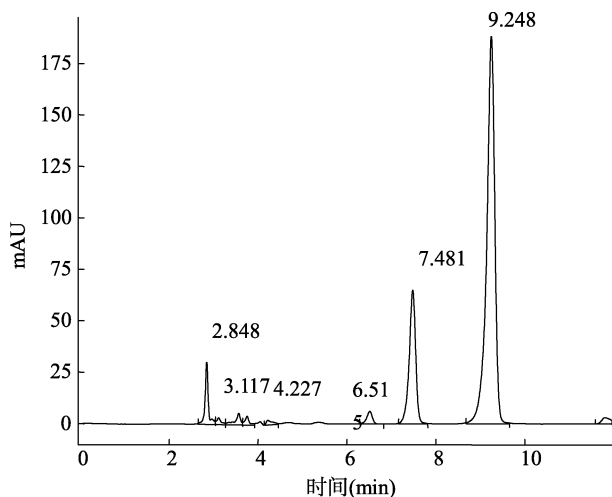


图4 含抗坏血酸和异抗坏血酸的饮料样品液相色谱图

Fig. 4 Chromatogram of liquid samples containing ascorbic acid and isoascorbic acid

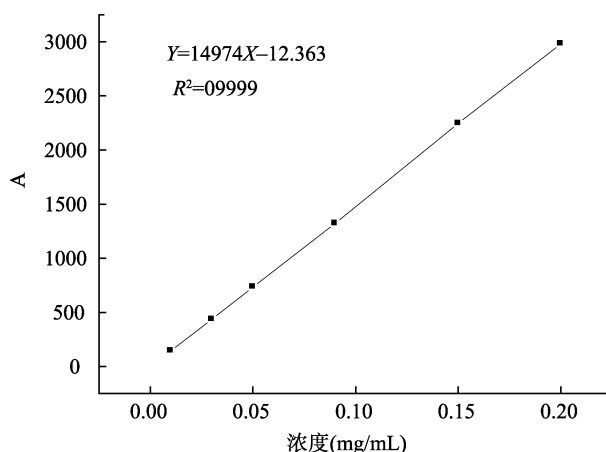


图5 抗坏血酸的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of ascorbic acid

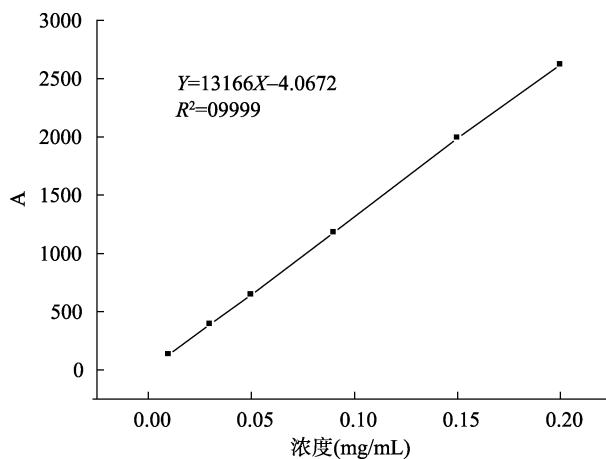


图6 异抗坏血酸的标准曲线

Fig. 6 Standard curve of isoascorbic acid

细数据见表4。由表4可见, 果汁、软饮料、罐头、婴幼儿奶粉、保健食品5种样品的添加回收率均高于80%, 表明此方法测定食品中抗坏血酸和异抗坏血酸具有很好的准确性。

表 2 抗坏血酸和异抗坏血酸的稳定性
Table 2 The stability of Ascorbic acid and isoascorbic acid

放置时间/h	0	6	12	18	24	RSD%
抗坏血酸	14921.9	15140.8	12008.6	12184.7	12052.1	12.2%
异抗坏血酸	13749.3	13696.9	11547.2	10097.3	9941	15.7%

表 3 精密度实验结果
Table 3 Results of precision test

名称	A					average	RSD%
	1	2	3	4	5		
抗坏血酸	14921.9	14896.1	14906.3	14912.5	14928.4	14913.04	0.09
异抗坏血酸	13749.3	13653.4	13769.3	13789.2	13754.3	13743.1	0.38

表 4 抗坏血酸和异抗坏血酸的加样回收率($n=5$)
Table 4 The ascorbic acid and isoascorbic acid sample recoveries ($n=5$)

样品	样品中抗坏血酸的本底值($\mu\text{g/g}$)	样品中异抗坏血酸的本底值($\mu\text{g/g}$)	混标溶液加标量($\mu\text{g/g}$)	加标后样品中		加标后样品中异	
				抗坏血酸的含量($\mu\text{g/g}$)	回收率(%)	抗坏血酸的含量($\mu\text{g/g}$)	回收率(%)
果汁	121	0	40	160.4 \pm 4.1	98.5 \pm 2.5	38.6 \pm 2.1	96.5 \pm 5.3
			100	220.4 \pm 6.2	99.4 \pm 6.2	98.6 \pm 5.6	98.6 \pm 5.6
			200	326.5 \pm 7.2	102.8 \pm 3.6	198.6 \pm 6.7	99.3 \pm 3.4
软饮料	198	0	40	238.3 \pm 5.3	100.8 \pm 1.3	35.6 \pm 1.8	89.0 \pm 4.5
			100	289.6 \pm 4.6	91.6 \pm 4.6	98.3 \pm 2.6	98.3 \pm 2.6
			200	398.6 \pm 6.5	100.3 \pm 3.3	184.2 \pm 7.9	92.1 \pm 4.0
罐头	8.3	0	40	49.3 \pm 2.1	102.5 \pm 5.3	33.9 \pm 1.3	84.8 \pm 3.3
			100	108.6 \pm 4.9	100.3 \pm 4.9	85.4 \pm 4.9	85.4 \pm 4.9
			200	215.0 \pm 7.5	103.3 \pm 3.8	178.9 \pm 8.2	89.5 \pm 4.1
婴幼儿奶粉	14.3	0	40	54.6 \pm 2.4	100.8 \pm 0.6	35.3 \pm 1.6	88.3 \pm 4.0
			100	109.4 \pm 5.6	95.1 \pm 5.6	96.3 \pm 6.5	96.3 \pm 6.5
			200	215.0 \pm 4.5	100.4 \pm 2.3	196.5 \pm 6.7	98.3 \pm 3.4
保健食品	19.5	0	40	55.2 \pm 2.1	89.3 \pm 5.3	34.2 \pm 2.3	85.5 \pm 5.8
			100	111.3 \pm 5.3	91.8 \pm 5.3	85.9 \pm 5.2	85.9 \pm 5.2
			200	203.6 \pm 7.0	102.1 \pm 3.5	185.3 \pm 5.3	92.7 \pm 2.7

4 结论

本文所建立的高压液相色谱法同时测定抗坏血酸和异抗坏血酸, 样品处理简单, 结果准确度高, 重现性好, 且操作简单快速, 可应用于强化食品中抗坏血酸和异抗坏血酸含量的测定, 为抗坏血酸和异抗坏血酸的检测提供参考。

参考文献

- [1] 陆道礼, 李国文, 陈庶来, 等. 草莓汁加工贮藏过程中维生素 C 稳定性的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(6): 121-123.
Lu DL, Li GW, Chen SL, *et al.* Studies on the stability of vitamin c in strawberry juice processing and storage [J]. Food Res Dev, 2004, 25(6): 121-123.
- [2] 姜波, 范圣第, 刘长建. 菠萝中维生素 c 的高效液相色谱分析[J]. 大连民族学院学报, 2003, 5(1): 52-53.
Jiang B, Fan SD, Liu CJ. Determination of vitamin C in pineapple by high performance liquid chromatography [J]. J Dalian Nation Univ, 2003, 5(1): 52-53.
- [3] 郑集, 陈均辉. 普通生物化学(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
Zheng J, Chen JH. General biochemistry (The Third Edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1998.
- [4] 陈忠明. 高效液相色谱法测定食品中维生素 C [J]. 食品科技, 1987, 6(30): 20-22.

- Chen ZM. Determination of Vc in food by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 1987, 6(30): 20-22.
- [5] 龙文清. 丙酮和乙醇双水相萃取、荧光法测定痕量维生素 B2[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(10): 2098-2101.
- Long WQ. Determination of trace vitamin B2 by fluorimetry after aqueous two-phase extraction based on acetone and ethanol [J]. Spectrosc Spectra Anal, 2007, 27(10): 2098-2101.
- [6] 徐焯, 顾鑫荣, 张秀娟, 等. 同步荧光法测定功能饮料中维生素 B2 和 B6 的研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(7): 85-87.
- Xu Y, Gu XR, Zhang XJ, *et al.* Study on determination of vitamin B2 and B6 in functional drink by synchronous fluorometry [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(7): 85-87.
- [7] 张志清, 白琦湛, 琚雯, 等. RP-HPLC 法测定功能性饮料水溶性维生素含量[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 212-215.
- Zhang ZQ, Bai QZ, Jun W, *et al.* RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in functional beverages [J]. Food Sci, 2010, 31(14): 212-215.
- [8] Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Verpoorte R, *et al.* Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction [J]. J Sep Sci, 2004, 27(14): 1181-1188.
- [9] Ciulu M, Solinas S, Floris I, *et al.* RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey [J]. Talanta, 2011, 83(3): 924-929.
- [10] 黄劲松, 陈建兵, 杜先锋, 等. 毛细管电泳测定蘑菇中多种水溶性维生素[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 344-346.
- Huang JS, Chen JB, Du XF, *et al.* Capillary electrophoretic determination of water-soluble vitamins in mushroom powder [J]. Food Sci, 2008, 29(5): 344-346.
- [11] 胡晓琴, 尤慧艳. 荔枝中水溶性维生素的毛细管电泳快速分离分析[J]. 分析试验室, 2010, 29(3): 34-36.
- Hu XQ, You HY. Fast separation and analysis of water-soluble vitamins in lichee by capillary electrophoresis [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(3): 34-36.
- [12] Mazina J, Gorbatoeva J. Sample preparation for CE-DAD analysis of the water soluble vitamins in food products [J]. Procedia Chem, 2010, 2(1): 46-53.
- [13] 张华峰, 张蕾, 杨晓华. 紫外分光光度法测定淫羊藿中维生素的含量[J]. 光谱实验室, 2009, 26(6): 1508-1512.
- Zhang HF, Zhang L, Yang XH. Determination of vitamin C in herba epimedii by ultraviolet spectrophotometry [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2009, 26(6): 1508-1512.
- [14] 黄锁义, 方晓燕, 农世永, 等. 分光光度法测定山楂中维生素 C[J]. 理化检验: 化学分册, 2007, 43(4): 317-319.
- Huang SY, Fang XY, Nong SY, *et al.* Photometric determination of vitamin C in haw [J]. Phys Test Chem Anal, 2007, 43(4): 317-319.
- [15] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. GB/T 5009.154-2003 食品中维生素 B6 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- Institute for Nutrition and Food Safety of the Chinese Center for Disease Control and Prevention. GB/T 5009.154-2003 Determination of vitamin B6 in food [S]. Beijing: China Standard Press, 2004.
- [16] 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].
- [17] GB/T 5009.159-2003. 食品中还原型抗坏血酸的测定[S].
- GB/T 5009.159-2003. Determination of reductive form ascorbic acid in foods [S].
- [18] 高志杰, 李静涛, 饶小思. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定饮料中 Vc 的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 446-447.
- Gao ZJ, Li JT, Rao XS. Study on high performance liquid chromatography-drink Vc diode array detector for detecting method [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(4): 446-447.
- [19] 蒋晔, 刘红菊, 郝晓花. 反相高效液相色谱法同时测定 9 种水溶性维生素[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 339-342.
- Jiang Y, Liu HJ, Hao XH. RP-HPLC determination of nine water-soluble vitamins [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(3): 339-342.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

张清, 在读硕士, 主要研究方向为农产品加工及贮藏工程。

E-mail: zhangqing_88888@163.com

李刚, 教授, 主要研究方向为食品分析检测。

E-mail: lg56k@yahoo.com.cn