

高效液相色谱法测定功能性食品中维生素C的含量

乔海燕^{1*}, 李欢¹, 郭兴辉², 王雪敏³

(1. 辽宁石油化工大学化学化工与环境学部, 抚顺 113001; 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003;
3. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定功能性食品中维生素C的含量。**方法** 采用 Venusil XBP C₁₈(L)柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)为色谱柱, 0.1%的草酸溶液为流动相, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 25 °C, 检测波长为 245 nm, 样品经 L-半胱氨酸-三乙胺溶液还原后, 测定维生素C的含量, 进样量 20 μL。**结果** 维生素C在 2.056~30.84 μg/mL 浓度范围内呈良好线性关系($r=0.9999$), 定量限为 0.03726 μg/mL, 检出限为 0.01242 μg/mL, 回收率为 99.89%, RSD 为 0.31% ($n=6$); 样品经 L-半胱氨酸-三乙胺溶液还原后稳定性、重复性好。**结论** 本方法简便快捷、适用范围广、准确度高、精密度好, 可广泛用于功能性食品中维生素C含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 功能性食品; 维生素C

Determination of vitamin C in functional food by high performance liquid chromatography

QIAO Hai-Yan^{1*}, LI Huan¹, GUO Xing-Hui², WANG Xue-Min³

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Environmental Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China; 2. Henan Institute of Drug and Food Control, Zhengzhou 450003, China; 3. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of high performance liquid chromatography(HPLC) for the determination of vitamin C in functional food. **Methods** A Venusil XBP C₁₈ (L) column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with 0.1% oxalic acid solution as mobile phase; the flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the detection wavelength was set at 245 nm. After reduction by L-cysteine-triethylamine solution, samples were determined with the injection volume of 20 μL. **Results** Vitamin C had a good linear relationship in the range of 2.056~30.84 μg/mL (the correlation index $r=0.9999$), the quantitative limit was 0.03726 μg/mL, the detection limit was 0.01242 μg/mL, the average recovery was 99.89%, and RSD was 0.3% ($n=6$). The stability and reproducibility of samples were ideal after reduction with L-cysteine-triethylamine solution. **Conclusion** The method is simple, applicable, accurate and precise, which can be widely used for the determination of vitamin C in functional foods.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; functional food; vitamin C

1 引言

到目前为止, 世界上对“功能性食品(Functional Food)”还没有形成共识。此概念最早出现于 1962 年日本厚

生省的一份文件中, 1989 年曾明确定义:“功能性食品是指具有与机体防御、机体节律调节、疾病防治、健康恢复等有关的功能因子, 经设计加工, 对机体有明显调节功能的食品”^[1,2]。维生素类是国际上功能性食品功能因子研究活

*通讯作者: 乔海燕, 讲师, 主要研究方向为应用化学。E-mail: hyqiao2002@126.com

*Corresponding author: Qiao Hai-Yan, Lecturer, College of Chemistry, Chemical Engineering and Environmental Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China, E-mail: hyqiao2002@126.com.

跃的8大领域之一^[3-5]。

维生素C又称L-抗坏血酸,是一种重要的水溶性维生素,具有广泛的生化作用,对生命活动过程中的很多生理代谢具有极其重要的影响^[6]。人体如果缺乏维生素C将引起疾病的发生,甚至导致坏血病、心脏及肝脏损伤等疾病。而人体内不能合成维生素C,必须从食品中摄取^[7]。由于维生素C的医用价值很高,又是一种理想的食品添加剂,广泛存在于市售的功能性食品中,因此对其含量测定具有重要意义^[8-14]。为更好地避免功能性食品中复杂成分的干扰,本研究建立了高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定功能性食品中维生素C含量的方法学,并对市面上常见的8种功能食品中的维生素C含量进行了测定。

2 仪器与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);

维生素C标准对照品(分析纯,纯度不低于99.7%,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号100425-201504); L-半胱氨酸(BR生化试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司); 草酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司); 实验用水(娃哈哈饮用纯净水,娃哈哈集团有限公司); 三乙胺(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司)。

2.2 材料

从市场上采购8种功能性食品(见表1)作为待分析试样。

2.3 试验方法

2.3.1 溶液配制

还原溶液:称取L-半胱氨酸还原剂约400.0 mg,置于100 mL容量瓶中,加1 mL三乙胺,用水超声溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

0.1%草酸:称取约1.0 g草酸,加水溶解并定容至1000 mL容量瓶中,用0.45 μm滤膜过滤后使用。

对照品溶液:精密称定10.0 mg维生素C置于50 mL容量瓶中,加20 mL还原溶液,超声5 min使其溶解,以0.1%草酸溶液稀释至刻度,摇匀得母液(浓度为205.6 μg/mL);精密量取5 mL母液,置于100 mL容量瓶中,用0.1%草酸稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

空白溶液:精密量取1 mL还原溶液置于50 mL容量瓶中,用0.1%草酸稀释至刻度,摇匀,即得空白溶液。

2.3.2 色谱条件

色谱柱: Venusil XBP C₁₈ (L), 4.6×250 mm, 5 μm, ; 流动相: 0.1%草酸; 检测波长: 245 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 20 μL。

2.3.3 样品前处理

取咀嚼片样品10片或取胶囊10粒,磨成粉末,混匀。称取样品适量,置100 mL容量瓶中,加40 mL还原溶液,超声溶解5 min,再置暗处反应5 min,然后以0.1%草酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

3 结果

3.1 色谱条件优化

曾分别使用 Venusil XBP C₁₈(2)(4.6×250 mm, 5 μm)、Eclipse XDB-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm)和 Venusil MP C₁₈(2)(4.6×250 mm, 5 μm) 3种色谱柱,以0.1%草酸为流动相进行试验,结果表明, Venusil MP C₁₈(2)和 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱对样品基本不保留,另考虑到 Venusil XBP C₁₈(2)色谱柱固定相耐水性较差而更换 Venusil XBP C₁₈(L)色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm),以0.1%草酸为流动相进行试验,样品保留时间约为7 min,理论板数较高,峰对称性良好,与相邻峰的分度度符合要求,故选择 Venusil XBP C₁₈(L)色谱柱进行试验。

表1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	品名	规格	形态、色泽	生产厂家
1	养生堂天然维生素C咀嚼片	127.5 g(850 mg×150片)	片剂、淡黄色	海南养生堂药业有限公司
2	养生堂天然维生素C咀嚼片	76.5 g(850 mg×90片)	片剂、淡黄色	海南养生堂药业有限公司
3	盘龙云牌利眠丽容胶囊	45 g(500 mg×90片)	胶囊内粉末、棕褐色	云南盘龙云海药业有限公司
4	艾兰得牌蓓美维生素EC含片	48 g(600 mg×80片)	片剂、白色或间有黄色点	江苏艾兰得有限营养品公司
5	富莱欣牌香杞维C咀嚼片	80 g(800 mg×100片)	片剂、棕褐色	南宁富莱欣生物科技有限公司
6	联合邦利牌胶原蛋白片	48 g(800 mg×60片)	包衣呈粉红色、片衣呈粉红色,色泽均匀	广州联存医药科技有限公司
7	联合邦利牌胶原蛋白片	48 g(800 mg×60片)	包衣呈粉红色、片衣呈粉红色,色泽均匀	广州联存医药科技有限公司
8	美澳健胶原蛋白维C片	36g(800 mg×60片)	片芯呈红色、色泽均匀	广州市美澳健生物科技有限公司

3.2 样品前处理优化

由于维生素 C 具有较强还原性, 很容易被氧化, 故选择以 *L*-半胱氨酸-三乙胺为还原溶液, 将测定溶液中所有氧化型维生素 C 转化为还原型维生素 C; 同时, 维生素 C 在酸性溶液中稳定, 故本实验采用 0.1% 草酸为提取溶剂和色谱流动相, 从而保持样品溶液稳定, 确保实验准确可行。

分别取空白溶液、对照溶液和供试品溶液, 依次进样测定, 记录色谱图见图 1。从图 1 中可见维生素 C 的保留时间为 6.991 min; 按维生素 C 峰计算得理论塔板数为 18797, 分离度为 0.95, 对称因子为 1.07。

3.3 线性范围

分别取一定量的对照品母液, 通过逐级稀释配成浓度为 2.056、4.112、10.28、20.56 和 30.84 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列标准溶液, 按 2.3.2 项下色谱条件进行检测, 记录色谱图及峰面积, 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 回归方程为: $A = -23.3341 + 72.4691C$, 相关系数 r 为 0.9999 (图 2)。结果表明维生素 C 在 2.056~30.84 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 呈现良好的线性关系, 定量限为 0.03726 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 0.01242 $\mu\text{g/mL}$ 。

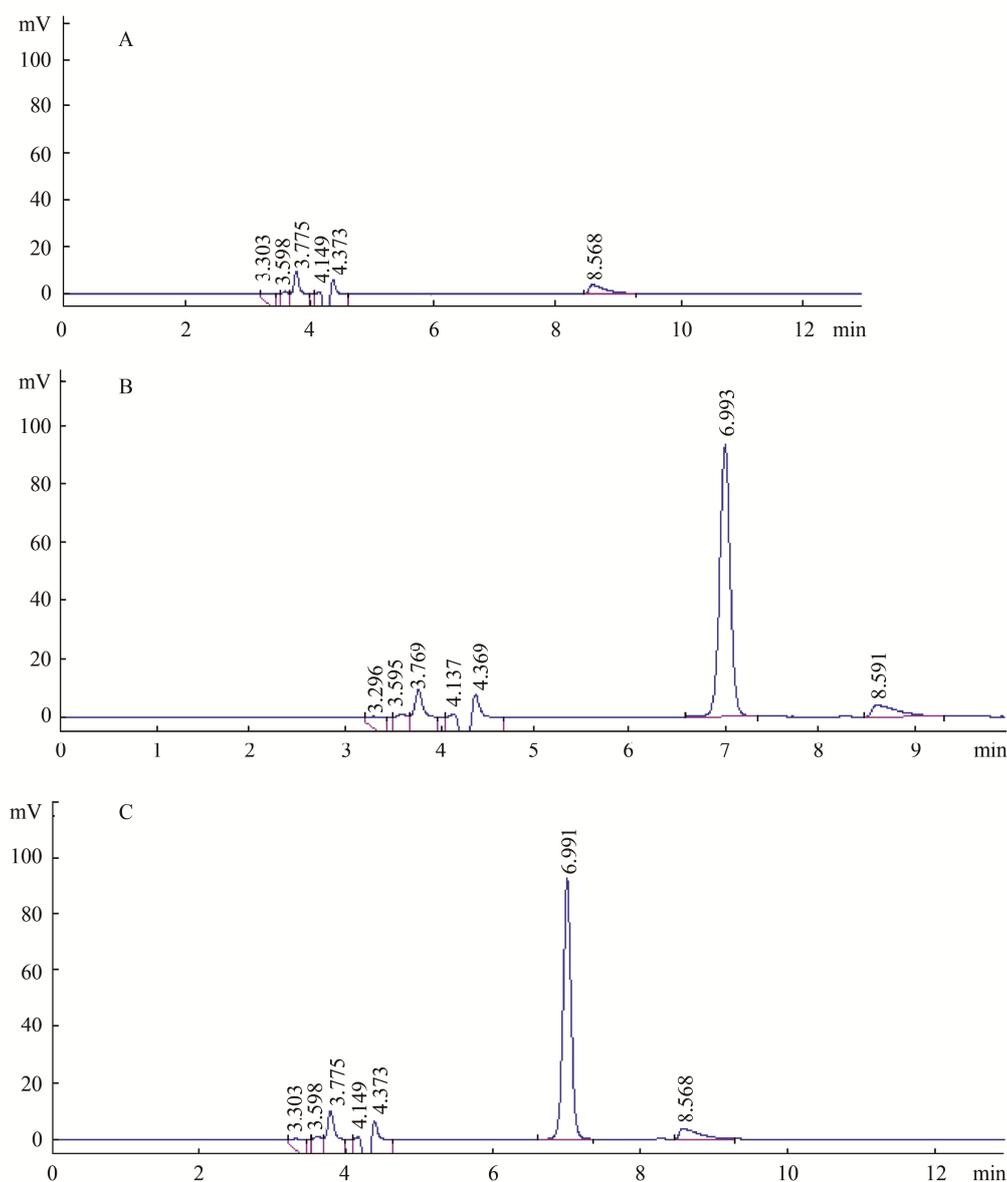


图 1 空白、对照品和供试品溶液的 HPLC 色谱图

A.空白; B.对照品; C.供试品

Fig. 1 HPLC chromatogram of blank, standard and sample solution

A.Blank; B.standard; C.sample

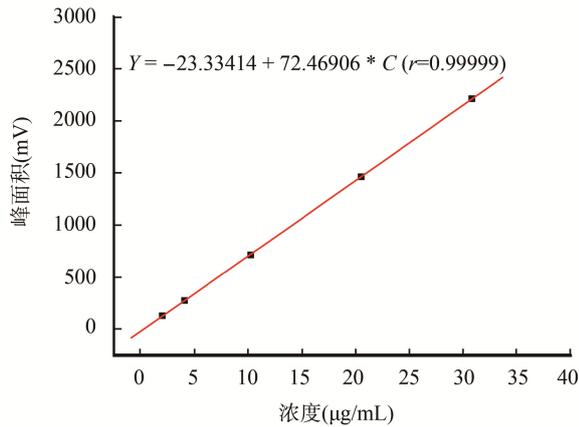


图 2 维生素 C 浓度与峰面积关系

Fig. 2 The relationship between the concentration of vitamin C and peak area

3.4 稳定性试验

取供试品溶液, 分别于 0、2、4、6 和 8 h 后按 2.3.2 项的色谱条件测定, 计算 RSD 值为 0.055%, 表明溶液稳定性良好。结果如表 2 所示。

表 2 稳定性试验结果
Table 1 Results of stability test

进样时间(h)	维生素 C 浓度(µg/mL)	RSD(%)
0	20.54	
2	20.54	
4	20.53	0.055
6	20.54	
8	20.56	

3.5 精密度试验

精密吸取浓度为 20.56 µg/mL 维生素 C 对照品溶液重复进样 5 次, 计算 RSD 值为 0.054%, 表明仪器精密度良

表 3 精密度试验结果
Table 3 Results of precision test

进样次数	维生素 C 对照品浓度(µg/mL)	测得浓度(µg/mL)	RSD(%) n=5
1	20.56	20.54	
2	20.56	20.54	
3	20.56	20.53	0.054
4	20.56	20.54	
5	20.56	20.56	

好。结果如表 3 所示。

3.6 重复性试验

按照本实验拟定的方法, 取同一批样品 5 份进行测定, 测得供试品中维生素 C 含量的 RSD 为 0.16%。表明此方法重复性良好。结果如表 4 所示。

3.7 样品测定

3.7.1 计算校正因子

精密称取维生素 C 对照品约 10 mg, 按照对照品溶液制备方法制备成对照品溶液, 按上述色谱条件测定, 并按公式(1)计算校正因子。结果见表 5。

$$f = \frac{C}{A} \quad (1)$$

式中, C 代表标准(对照品)溶液的浓度, µg/mL; A 代表标准(对照品)溶液的峰面积; f 代表校正因子。

3.7.2 样品测定

取 8 种待分析试样, 每种各取 2 份, 按照 2.3.3 方法制备成供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 依据公式(2)以外标法定量计算维生素 C 的含量, 结果见表 6。

$$X = \frac{A_1 \times f \times V}{m \times 1000} \quad (2)$$

式中, X 代表样品中维生素 C 的含量, mg/g; A_1 代表样品峰面积; f 代表校正因子; V 代表样品定容体积, mL; m 代表样品质量, g。

3.8 回收率试验

精密称取已知含量的样品粉末(62.0720 mg/g)约 0.12 g 共 6 份分别置于 100 mL 容量瓶中, 加入已配好的还原溶液 20 mL, 再分别精密量取 0.1% 草酸溶液配制的维生素 C 对照品溶液(0.2056 mg/mL)10、15 和 20 mL 3 个水平各 2 份, 依次加入容量瓶中, 加入 0.1% 草酸溶液定容至刻度, 摇匀, 以下按供试品溶液制备的方法制备成回收率试验溶液。按上述色谱条件各取 20 µL 注入高效液相色谱仪, 分别测定维生素 C 的峰面积, 计算回收率(见表 7)。由表 7 可以看出, 维生素 C 的平均回收率为 99.89%, RSD 为 0.31%, 表明该方法可行。

表 4 重复性试验结果
Table 4 Results of repeatability test

供试品量(g)	峰面积	维生素 C 测定含量(mg/g)	RSD(%) _{n=5}
0.3226	1393.38	124.0648	0.16
0.3290	1423.48	124.2794	
0.3254	1402.82	123.8306	
0.3298	1426.06	124.2026	
0.3336	1426.06	124.3428	

表 5 校正因子计算结果
Table 5 Results of correction factor

称样量(g)	浓度(μg/mL)	峰面积	校正因子	平均校正因子
0.01028	10.28	715.78	0.014361	0.014363
0.01031	10.31	717.72	0.014365	

表 6 供试品中维生素 C 含量测定
Table 6 Determination of vitamin C in samples

样品编号	称样量(g)	峰面积	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	结果(mg/g)
1-1	0.1536	664.34	62.1173	62.1101	62.11
1-2	0.1642	710.02	62.1028		
2-1	0.1598	691.11	62.1132	62.1073	62.11
2-2	0.1636	707.41	62.1014		
3-1	0.0701	625.12	128.0734	128.2170	128.22
3-2	0.0706	630.99	128.3605		
4-1	0.2655	703.10	38.0335	38.0351	38.04
4-2	0.2622	694.42	38.0367		
5-1	0.1638	887.72	77.8351	78.3108	78.31
5-2	0.1687	925.45	78.7864		
6-1	0.1598	794.60	71.4143	71.4195	71.42
6-2	0.1600	795.71	71.4247		
7-1	0.1641	816.39	71.4501	71.4490	71.45
7-2	0.1587	789.50	71.4478		
8-1	0.1223	654.99	76.9169	76.9203	76.92
8-2	0.1407	753.60	76.9237		

表 7 回收率结果
Table 7 Results of recoveries

样品编号	样品称样量(g)	样品中维生素 C 的含量(mg)	维生素 C 的加入量(mg)	维生素 C 的测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.1232	7.6473	2.056	9.6969	99.69	99.89	0.31
2	0.1256	7.8754	2.056	9.9347	100.16		
3	0.1273	7.9018	3.084	10.9972	100.37		
4	0.1249	7.7528	3.084	10.8306	99.80		
5	0.1238	7.6845	4.112	11.7798	99.60		
6	0.1275	7.9142	4.112	12.0139	99.70		

3.9 与碘量法的结果比较

取 1、4 号样品作为试验代表对象,考察了用碘量法测定样品中维生素 C 含量时溶液颜色变化,实验结果表明样品中辅料对其测定有颜色的干扰,会影响滴定终点判断,从而影响测定结果准确性。同时, L-半胱氨酸-三乙胺还原溶液的加入,也解决了维生素 C 在较长时间内不稳定存在的问题。较之碘量法,高效液相色谱法测定功能性食品中维生素 C 含量具有简便快捷、灵敏度高、重现性好等优点。

4 结论

本研究测定的样品成分复杂,干扰组分较多,色谱柱条件的选择及样品的处理方法会对实验结果产生较大影响。本研究选用 Venusil XBP C₁₈(L) (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱,解决了 HPLC 法测定维生素 C 时因固定相耐水性较差,样品在柱子上不保留问题;另一方面由于维生素 C 具有较强还原性,很容易被氧化,本法中选用 L-半胱氨酸-三乙胺作为维生素 C 的还原溶液,可将溶液中所有氧化型维生素 C 定量转化为还原型维生素 C;同时维生素 C 在酸性溶液中稳定,本实验采用 0.1% 草酸为提取溶剂和色谱流动相,从而保持样品溶液长时间稳定,确保实验准确。本研究还将高效液相色谱法和《中国药典》^[15] 中维生素 C 测量方法-碘量法测定结果进行比较,结果表明,高效液相色谱法测定功能性食品中维生素 C 含量具有简便快捷、灵敏度高、重现性好等优点,此法突破了碘量法中辅料对其颜色的干扰,也突破了维生素 C 在较长时间不稳定的现象,而且增大了检测的适用范围。选取市售 8 种功能性食品作为供试样品进行分析,结果表明此法可广泛应用于功能性食品中维生素 C 含量的测定。

参考文献

- [1] P. M. Verschuren. Functional foods: scientific and global perspectives [J]. *Bri J Nutri*, 2002, 88(2): 125-130.
- [2] Korhonen H. Technology options for new nutritional concepts [J]. *Int J Dairy Technol*, 2002, 55(2): 79-88.
- [3] Hasler CM. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion [J]. *Food Technol*, 1998, 52(2): 57-62.
- [4] Sanders ME. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria [J]. *Int Dairy J*, 1998, 8(5-6): 341-347.
- [5] Michael H, Mellentin J. The functional foods revolution: healthy people, healthy profits? [M]. London: Earthscan Publications Ltd, 2001.
- [6] Davey MW, Montagu MV, Inzé D, *et al.* Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7): 825-860.
- [7] Hampl JS, Taylor CA, Johnston CS. Intakes of vitamin C, vegetables and fruits: Which schoolchildren are at risk [J]. *J Am Coll of Nutr*, 1999, 18(6): 582-590.
- [8] Novakova L, Solich P. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids [J]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27(10): 942-958.
- [9] 金鹏飞, 夏路风, 李铮, 等. 高效液相色谱同时测定多维元素片中的维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 C、烟酰胺和泛酸[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(9): 1606-1610.
- [10] Jin PF, Xia LF, Li Z, *et al.* Simultaneous determination of vitamin B₁, vitamin B₆, vitamin C, niacinamide and pantothenic acid in vitamins with minerals tablets by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(9): 1606-1610.
- [11] Farajzadeh MA, Nagizadeh SJ. A simple and reliable spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations [J]. *Anal Chem*, 2003, 8(10): 927-932.
- [12] Adriana MM, André RB, Wilson JY, *et al.* Velasco Validation of HPLC stability-indicating method for vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants [J]. *Talanta*, 2007, 71(2): 639-643.
- [13] 扶庆权. HPLC 法测定草莓、蓝莓和黑莓中维生素 C 的含量[J]. *食品工业*, 2015, 36(11): 283-285.
- [14] Fu QQ. Determination of Vitamin C in strawberry, blueberry and blackberry by HPLC [J]. *Food Ind*, 2015, 36(11): 283-285.
- [15] 周涛, 江维克, 艾强, 等. 贵州刺梨中总维生素 C 及还原型维生素 C 含量检测方法的建立与比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 37-40.
- [16] Zhou T, Jiang WK, Ai Q, *et al.* HPLC determination of reduced and total vitamin C for *Rosa roxburghii* *tatt.* in Guizhou province [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2010, 16(9): 37-40.
- [17] 李玉明, 张少华. 猕猴桃中维生素 C 的 HPLC 分析[J]. *计算机与应用化学*, 2011, 28(4): 458-460.
- [18] Li YM, Zhang SH. Determination of vitamin C in the Chinese gooseberry by HPLC [J]. *Comput Appl Chem*, 2011, 28(4): 458-460.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the people's Republic of China* [S].

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



乔海燕, 博士, 讲师, 主要研究方向为应用化学。

E-mail: hyqiao2002@126.com