

# 高效液相色谱法测定保健食品中抗坏血酸 同分异构体含量

喻俊磊, 赵淑娟, 周晓晴, 兰 伟, 匡佩琳\*

(江西省食品检验检测研究院, 南昌 330000)

**摘要: 目的** 建立一种同时分离和测定保健食品中抗坏血酸同分异构体含量的高效液相色谱法。**方法** 样品经 20 g/L 的偏磷酸溶液超声提取, 选用资生堂 CAPCELL PAK C<sub>18</sub> ADME 亲水色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 以 2.3 g/L 磷酸二氢铵水溶液(pH 值 2.0±0.1)为流动相, 等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 245 nm。**结果** 该方法能很好的分离 L(+)-抗坏血酸和 D(-)-抗坏血酸, 2 种抗坏血酸在 1.0~50.0 μg/mL 范围呈现良好的线性关系, 加标回收率分别为 99.69%和 100.34%, 检出限均为 0.05 μg/mL。**结论** 该方法简单、快速、准确, 适用于保健食品中抗坏血酸同分异构体含量的测定。

**关键词:** 保健食品; 抗坏血酸; 高效液相色谱法

## Determination of ascorbate acid isomers in health foods by high performance liquid chromatography

YU Jun-Lei, ZHAO Shu-Juan, ZHOU Xiao-Qin, LAN Wei, KUANG Pei-Lin\*

(Jiangxi Institute for Food Control, Nanchang 330000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous separation and determination of ascorbate acid isomers in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was ultrasonically extracted with 20 g/L metaphosphoric acid solution, and separated by Shiseido CAPCELL PAK C<sub>18</sub> ADME hydrophilic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at the flow rate of 1.0 mL/min by isocratic elution using 2.3 g/L ammonium dihydrogen phosphate aqueous solution (pH 2.0±0.1) as mobile phase. The detection wavelength was 245 nm. **Results** The method could separate L(+)-ascorbic acid and D(-)-ascorbic acid well. The 2 ascorbic acids showed a good linear relationship in the range of 1.0~50.0 μg/mL. The recoveries were 99.69% and 100.34%, respectively. The detection limit was 0.05 μg/mL. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of ascorbic acid isomers in health food.

**KEY WORDS:** health food; ascorbic acid; high performance liquid chromatography

## 1 引言

抗坏血酸是一种具有抗氧化性质的有机化合物, 又称为“维生素 C”, 是一种水溶性维生素, 有 L-型和 D-型 2

种形式, 天然中主要以 L(+)-抗坏血酸(L-VC)形式存在, 是保健食品中常见的一种功效成分。目前测定抗坏血酸的方法有滴定法(药典)<sup>[1-3]</sup>、荧光法<sup>[4-7]</sup>和高效液相色谱法<sup>[8-16]</sup>等。滴定法虽操作简单, 时间短, 但不稳定, 灵敏度较差,

\*通讯作者: 匡佩琳, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: 1228613920@qq.com

\*Corresponding author: KUANG Pei-Lin, Professor, Food Inspection and Testing Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330001, China. E-mail: 1228613920@qq.com

特别是有颜色的样品,颜色背景干扰大,导致数据误差较大;荧光法需要衍生前处理,操作步骤复杂,试剂和样品溶液稳定性差,样品测定时间长,造成结果的不准确性;此外,滴定法和荧光法都只是测定样品中抗坏血酸的总量,无法确定保健食品原料添加的是 *L*(+)-抗坏血酸还是 *D*(-)-抗坏血酸(*D*-VC)。而国家食品药品监督管理局发布的《营养素补充剂原料目录》(2016年第205号公告)中明确规定 *D*(-)-抗坏血酸不能用于保健食品中<sup>[17]</sup>。2016年8月31日,国家颁布实施的 GB 5009.86-2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》中增加了高效液相色谱法<sup>[7]</sup>。相比较而言,高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)操作简单快速,数据稳定。由于抗坏血酸的亲水性极强,在普通反相色谱中无保留,国家标准<sup>[7]</sup>中采用普通反相色谱,  $C_{18}$  柱,离子对试剂做流动相测定抗坏血酸的组成和含量,但在日常检测中发现标准中的实验条件对 *L*-型和 *D*-型分离不是很好,影响准确定量,而且离子对试剂易损伤色谱柱,这大大限制了 HPLC 在测定抗坏血酸方面的广泛应用,但目前关于不同剂型保健食品中抗坏血酸同分异构体的分离检测研究相对较少。因此有必要针对保健食品中抗坏血酸的组成和含量进行研究,建立通用、专属、准确且操作简单的检测方法,以更好的控制保健食品的质量。

本文使用资生堂 CAPCELL PAK  $C_{18}$  ADME 亲水色谱柱结合高效液相色谱法,实现对保健食品中抗坏血酸同分异构体含量的测定,该方法操作快速简便,灵敏度高,专属性强,为相关企业准确测定保健食品中抗坏血酸的含量提供参考。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 试剂与仪器

Waters 2695A 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器,美国 Waters 公司); Quintix 213-1CN 电子天平(瑞士梅特勒公司); KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); PHS-3C pH 计(仪电科学仪器公司); Sorvall ST8 离心机(美国 Thermo scientific 公司)。

*L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸标准品(纯度均为 99.4%,德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 偏磷酸、磷酸二氢铵、磷酸(分析纯,国药集团); 实验所用水均为自制高纯水。

实验所用样品咀嚼片、含片、口服液、泡腾片,均购买于当地市场。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的制备

分别精密称取 50 mg *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸标准品,于 50 mL 棕色容量瓶中,用 20 g/L 偏磷酸溶解并定容到刻度,配制成浓度为 1.0 mg/mL 储备液。再分别吸

取上述供试标准储备液 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mL 置于 10 mL 的棕色容量瓶中,加 20 g/L 的偏磷酸溶液稀释并定容至刻度,摇匀备用。

#### 2.2.2 供试溶液的制备

针对不同剂型(咀嚼片、含片、泡腾片、口服液)样品,视样品中抗坏血酸含量高低,准确称取 1.0 g 样品于 50 mL 具塞离心管中,用 20 g/L 偏磷酸溶液超声提取 10 min,放置到室温后,倒入 50 mL 的棕色容量瓶中,用 20 g/L 偏磷酸溶液定容到刻度,摇匀,过 0.22  $\mu$ m 的滤膜,待上机测定。

#### 2.2.3 色谱测定条件

CAPCELL PAK  $C_{18}$  ADME 亲水色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 2.3 g/L 磷酸二氢铵水溶液(用磷酸调 pH 2.0 $\pm$ 0.1); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 进样量: 10  $\mu$ L; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 245 nm; 等度洗脱。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱柱的选择

本试验中选用 2 根不同的色谱柱,分别为资生堂 CAPCELL PAK  $C_{18}$  ADME(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m)和安捷伦 ZORBAX  $C_{18}$ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m)柱进行试验,考察不同色谱柱对色谱分离的影响,其色谱图见图 1。资生堂 CAPCELL PAK  $C_{18}$  ADME 色谱柱,在 2.2.3 的色谱条件下,抗坏血酸的 2 种同分异构体能够实现有效分离(图 1B)。因此本实验中采用资生堂 CAPCELL PAK  $C_{18}$  ADME 色谱柱,而且在流动相 pH 为 2.0 的条件下,用 100% 的 2.3 g/L 磷酸二氢铵水溶液(pH=2)能够达到很好的分离效果,样品中无杂质峰干扰(图 2)。

### 3.2 方法学考察

#### 3.2.1 线性范围

取 2.2.1 中 *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸标准品溶液,在 2.2.3 色谱条件下,用高效液相色谱仪测定,记录色谱图,以峰面积(*Y*)为纵坐标,浓度(*X*)为横坐标,进行回归分析。结果表明, *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸相关系数  $r^2$  均在 0.9999。抗坏血酸的 2 种同分异构体在 1.0~50.0  $\mu$ g/mL 的浓度范围内,均呈现良好的线性关系。

#### 3.2.2 精密度

取 2.2.1 中标准溶液第 5 点(50.0  $\mu$ g/mL)重复进样 6 次,记录峰面积,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值。结果表明, *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸的 RSD 值分别为 0.0010% 和 0.0008%(如表 1)。

#### 3.2.3 加样回收率实验

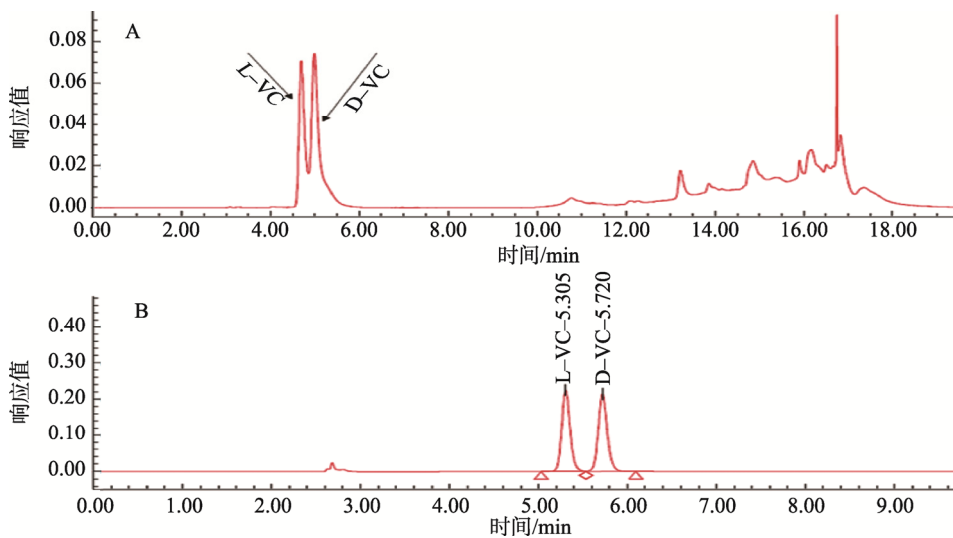
精密称取已知含量的供试品 6 份,分别加入浓度为 1.0 mg/mL 的标准品溶液 5 mL,按照 2.2.2 处理,按 2.2.3 色谱条件测定。如表 2,不同剂型和不同含量范围的供试样品中 *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸的平均回收率分别为 99.69% 和 100.34%,方法准确度较高。

3.2.4 方法检出限

取 2.2.1 中标准溶液最低点(1.0  $\mu\text{g/mL}$ )进样, 以信噪比为 3 计算出 *L*(+)-抗坏血酸和 *D*(-)-抗坏血酸的检出限均为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 样品中抗坏血酸含量分析

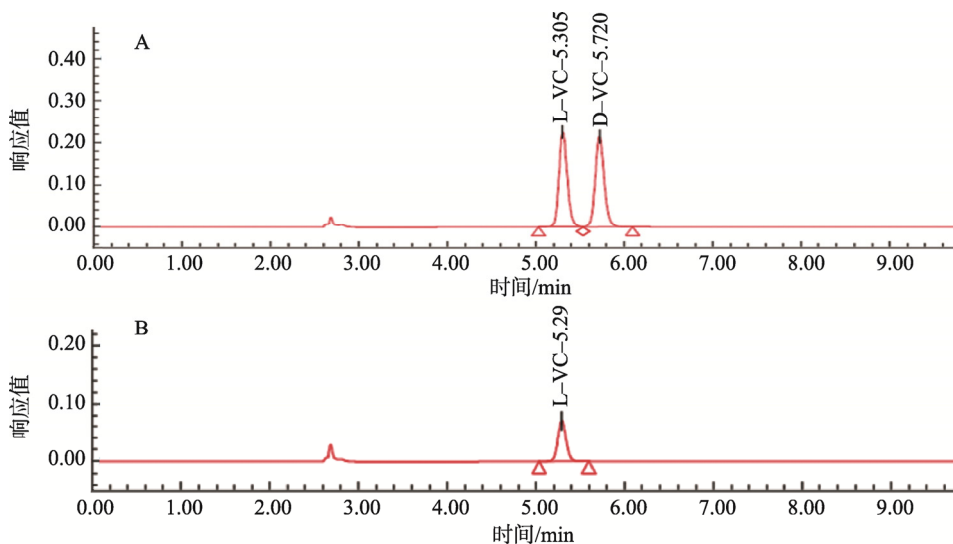
取不同剂型的保健食品 15 批次, 按照 2.2.2 供试品溶液制备方法, 以 2.2.3 的色谱条件测定。结果见表 3。



注: A-安捷伦 ZORBAX SB-Aq 柱, B-资生堂 CAPCELL PAK C18 ADME 柱

图 1 不同色谱柱对抗坏血酸的分离效果

Fig.1 Separation of ascorbic acid by different chromatographic columns



注: A 为抗坏血酸标准品, B 为供试样品

图 2 资生堂 CAPCELL PAK C18 ADME 柱色谱图

Fig.2 Chromatogram of Shiseido CAPCELL PAK C18 ADME hydrophilic column

表 1 精密度试验结果  
Table 1 Precision test results

物质	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD%
<i>L</i> (+)-抗坏血酸	1388232	1388240	1388232	1388199	1388238	1388219	0.0010
<i>D</i> (-)-抗坏血酸	1340252	1340229	1340251	1340252	1340258	1340261	0.0008

表 2 加样回收率试验结果

Table 2 Test results of recovery rates of standard addition

成分	序号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
L(+)-抗坏血酸	回收 1	3.04	5.00	8.00	99.23	99.69	0.54
	回收 2	3.03	5.00	7.99	99.18		
	回收 3	3.01	5.00	7.98	99.50		
	回收 4	3.05	5.00	8.03	99.60		
	回收 5	3.00	5.00	8.00	100.00		
	回收 6	3.04	5.00	8.07	100.60		
D(-)-抗坏血酸	回收 1	0.00	5.00	5.006	100.12	100.34	0.44
	回收 2	0.00	5.00	5.0105	100.21		
	回收 3	0.00	5.00	5.0045	100.09		
	回收 4	0.00	5.00		101.20		
	回收 5	0.00	5.00		100.40		
	回收 6	0.00	5.00		100.00		

表 3 不同剂型的保健食品检测结果

Table 3 Test results of health food in different dosage forms

样品编号	样品名称	L(+)-抗坏血酸含量 (mg/100 g)	D(-)-抗坏血酸含量 (mg/100 g)	标示含量/(mg/100 g)
1	*奇牌维 C 咀嚼片	$3.23 \times 10^3$	ND	2400~5400
2	*通喜牌铁锌钙硒多种维生素咀嚼片	$2.72 \times 10^3$	ND	1618.8~3642.3
3	*合维生素咀嚼片	$1.86 \times 10^3$	ND	1004~2259
4	*鑫牌维生素 C 加钙咀嚼片	$2.8 \times 10^3$	ND	1500~3300
5	*佰龄牌维生素 C 咀嚼片	$1.1 \times 10^4$	ND	8000~16000
6	维 C 钙咀嚼片	$3.18 \times 10^3$	ND	1727.2~4561.2
7	*露牌多种维生素矿物质口服液	127	ND	92~207
8	*邦牌善维口服液	306	ND	163.2~367.2
9	*家顺牌钙铁锌维生素 C 口服液	144	ND	108~324
10	*天牌维生素 C 泡腾片	$8.4 \times 10^3$	ND	7825~17606
11	*媛春牌胶原蛋白维 C 片	$4.5 \times 10^3$	ND	3380~6330
12	*方同康宝牌维生素 C 含片(儿童型)	$5.3 \times 10^3$	ND	4000~6000
13	*玉康牌维生素 C 维生素 E 含片	$5.38 \times 10^3$	ND	3347~7530
14	*方同康宝牌维生素 C 含片(无糖中老年型)	$1.61 \times 10^4$	ND	12307~23076
15	*佰年®维生素 C 含片	$1.24 \times 10^3$	ND	6500~12500

注: ND 表示未检出。

#### 4 结论

抗坏血酸具有极强的亲水性, 在一般的反向色谱柱上保留差, 2 种同分异构体分离度较差, 故本研究选用资生堂 CAPCELL PAK C<sub>18</sub> ADME 亲水色谱柱, 能很好的分离抗坏血酸的 2 种同分异构体, 达到准确定量的目的。抗坏

血酸的 2 种同分异构体在 1.0 ~50.0 μg/mL 的浓度范围内, 均呈现良好的线性关系, L(+)-抗坏血酸和 D(-)-抗坏血酸的平均回收率分别为 99.69%和 100.34%, 方法准确度较高, 满足实验要求, 因此本研究建立的方法简便、快速、准确, 适用于不同剂型保健品中 L(+)-抗坏血酸和 D(-)-抗坏血酸的分离检测。

## 参考文献

- [1] 刘平, 李强, 金庆中, 等. 保健食品及营养素补充剂中维生素 C 稳定性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 137-141.  
Liu P, Li Q, Jin QZ, *et al.* The stability of vitamin C in health food and nutrition supplements [J]. *Chin J Food Hyg*, 2011, 23(2): 137-141.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.  
Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part II)* [M]. Beijing: Chinese Medicine Publishing House, 2010.
- [3] 贺澎, 王文丽. 维生素 C 片 3 种含量测定方法的比较[J]. 中国药品标准, 2018, 19(2): 112-114.  
He P, Wang WL. Comparison of three methods for determination of Vitamin C tablets [J]. *Drug Stand Chin*, 2018, 19(2): 112-114.
- [4] GB 5413.18-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 C 的测定[S].  
GB 5413.18-2010 National food safety standard-Determination of vitamin C in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [5] 刘彬, 赵惠新. 维生素 C 含量测定方法综述及其比较[J]. 课程教育研究, 2018, 42: 178-179.  
Liu B, Zhao HX. Review and comparison of methods for determination of vitamin C content [J]. *Course Educ Res*, 2018, 42: 178-179.
- [6] 熊晓燕, 刘一. 荧光法测定保健食品维 C 蜂胶胶囊中维生素 C 含量[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(4): 292-294.  
Xiong XY, Liu Y. Fluorescence method to determine the vitamin c content in vitamin C bee propolis capsules [J]. *J Prev Med Inf*, 2013, 29(4): 292-294.
- [7] GB 5009.86-2016 食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定[S].  
GB 5009.86-2016 National food safety standard-Determination of ascorbic acid in food [S].
- [8] 雍莉, 黎源倩, 李敏, 等. 高效液相色谱法快速测定保健食品和果蔬中的 VitC[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 247-248.  
Yong L, Li YQ, Li M, *et al.* Rapid determination of vitamin C in healthy foods fruits and vegetables by high performance liquid chromatography [J]. *Mod Prev Med*, 2005, 32(3): 247-248.
- [9] 吴昊, 刘燕, 李晓明, 等. 亲水高效液相色谱法测定饮料中的维生素 C 含量[J]. 中国食品添加剂, 2015, 11: 169-172.  
Wu H, Liu Y, Li XM, *et al.* Determination of vitamin C content in soft drinks by hydrophilic interaction chromatography [J]. *Chin Food Add*, 2015, 11: 169-172.
- [10] 刘成浩, 张蓉, 郭国庆, 等. HPLC 法测定保健食品中抗坏血酸的组成及稳定性[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(18): 172-176.  
Liu CH, Zhang R, Wu GQ, *et al.* The analysis of composition and stability of ascorbic acid in health food by HPLC [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(18): 172-176.
- [11] 王少敏, 陆继伟, 毛丹, 等. 亲水色谱-高效液相色谱法测定保健品中维生素 C 的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(2): 197-201.  
Wang SM, Lu JW, Mao D, *et al.* Determination of vitamin C in health care products by HILIC-HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(2): 197-201.
- [12] 陈静, 魏晓亮, 陈雅琴. 高效液相色谱法测定多维矿物质片中维生素 C 的含量[J]. 辽宁化工, 2017, 46(10): 1039-1041.  
Chen J, Wei XL, Chen YQ. Content determination of vitamin C in multivitamin mineral tablets by HPLC [J]. *Liaoning Chem Ind*, 2017, 46(10): 1039-1041.
- [13] 张培, 冯慧予. 高效液相色谱法测定保健食品和饮料中维生素 C[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(4): 311-313.  
Zhang P, Feng HY. Determination of vitamin C in health foods and drinks by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Food Hyg*, 2008, 20(4): 311-313.
- [14] 张洁, 翟志雷, 张伟, 等. HPLC 法同时测定维生素 C 咀嚼片中维生素 C 和糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1534-1536.  
Zhang J, Zhai ZL, Zhang W, *et al.* Simultaneous determination of vitamin C and sugar in chewable vitamin C by HPLC [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 25(10): 1534-1536.
- [15] 李小娟, 杨润. 反相高效液相色谱法测定保健食品中维生素 C[J]. 江苏预防医学, 2004, 15(1): 60-61.  
Li XJ, Yang R. Determination of vitamin C in health foods by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Jiangsu Prev Med*, 2004, 15(1): 60-61.
- [16] 张伟清, 林媚, 王天玉, 等. HPLC 法测定柑桔维生素 C 含量的优化及其应用[J]. 中国南方果树, 2018, 47(3): 30-33.  
Zhang WQ, Lin M, Wang TY, *et al.* Optimization and application of determination of vitamin C in citrus by high performance liquid chromatography [J]. *South Chin Fruit Tree*, 2018, 47(3): 30-33.
- [17] 2016 年第 205 号公告保健食品原料目录(一)[EB/OL]. [2017-12-12]. <https://wenku.baidu.com/view/54d6a829a7c30c22590102020740be1e650e cca2.html>  
Announcement No. 205 of 2016 health food raw materials catalogue (1) [EB/OL]. [2017-12-12]. <https://wenku.baidu.com/view/54d6a829a7c30c22590102020740be1e650e cca2.html>

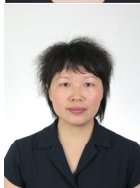
(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



喻俊磊, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 410231868@qq.com



匡佩琳, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测。

E-mail: 1228613920@qq.com