

# 高效液相色谱法测定食品中的抗坏血酸

LC-221

**摘要：**本文建立了一种岛津液相色谱仪 LC-20A 测定食品中抗坏血酸的方法。样品按照国标《GB/T 5009.86-2016》处理，经过滤后进样，以 Shim-pack GIST C18-AQ 柱分离，紫外检测器检测，分离度达到 6.5 以上，L(+)- 抗坏血酸、D(+)- 抗坏血酸在 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内线性良好，相关系数  $r>0.9995$ 。对 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准溶液连续 6 次进样，L(+)- 抗坏血酸、D(+)- 抗坏血酸峰面积相对标准偏差分别在 1.69 % 和 1.12 %，仪器精密度良好。仪器的检出限分别为 0.064  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.070  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，L(+)- 抗坏血酸和 D(+)- 抗坏血酸平均回收率为 75.66 % 和 100.31 %。

**关键词：**高效液相色谱仪 食品 抗坏血酸

抗坏血酸 (Ascorbic acid) 为酸性己糖衍生物，是烯醇式己糖内酯，分为 L 型和 D 型，是一种水溶性的还原剂和抗氧化剂，也是人体所需的维生素 C。在食品、保健食品中具有助呈色、防褐变、抗氧化等作用。只要食品生产厂商所使用的抗坏血酸的量和范围，严格控制在国家标准《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-96) 规定的范围之内，是不会对人体健康造

成损害的。

《GB/T 5009.86-2016 食品中抗坏血酸的测定》标准中规定有高效液相色谱法、荧光法、2,6- 二氯靛酚滴定法，本实验主要参照标准中的实验条件，采用岛津 LC-20A 高效液相色谱仪对草莓中的抗坏血酸进行测定，供相关人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 ProminenceLC-20A 高效液相色谱仪，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A Lite

脱气机：DGU-20A 3R

输液泵：LC-20AT

自动进样器：SIL-20AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：SPD-20AV

色谱工作站：Labsolutions Ver 6.72 SP1

### 1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18-AQ 色谱柱 (250 mm L $\times$ 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) ; P/N: 227-30742-08;  
岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相：A：6.8 g 磷酸二氢钾和 0.91 g 十六烷基三甲基溴化铵，用水溶解并定容至 1.00 L；

B：100 % 甲醇，按 A：B=98：2 (V/V) 混合

流速：1.0 mL/min

流速：1 mL/min

柱温：25 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：245 nm

进样量：20  $\mu\text{L}$

洗脱方式：等度洗脱

## ■ 样品制备

### 2.1 标准溶液配制：

L (+)- 抗坏血酸和 D (+)- 抗坏血酸混合标准储备溶液 (1.000 mg/mL) : 准确称取 L (+)- 抗坏血酸标准品 0.01 g (精确至 0.01 mg) , 准确称取 D (+) - 抗坏血酸标准品 0.01 g (精确至 0.01 mg) , 用 20 g/L 的偏磷酸溶液定容至 10 ml。该贮备液在 2 $^{\circ}\text{C}$  ~8 $^{\circ}\text{C}$  避光条件下可保存一周。

将 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准溶液用 20 g/L 的偏磷酸溶液逐级稀释至浓度为 0.5、5、10、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液。

## 2.2 样品前处理方法:

取 100 g 左右草莓样品加入等质量的 20 g/L 的偏磷酸溶液, 经匀质机匀质并混合均匀后, 称取相对于草莓样品约 2 g (精确至 0.0001 g) 混合均匀的匀浆试样于 50 mL 烧杯中, 用 20 g/L 的偏磷酸溶液将试样转移至 50 mL 容量瓶中, 震荡溶解并定容。摇匀, 全部转移至 50 mL 离心管中, 超声提取 5 min 后, 于 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜, 滤液待测。

准确吸取 20 mL 上述离心后的上清液于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 40 g/L 的半胱氨酸溶液, 用 100 g/L 磷酸三钠溶液调节 pH 至 7.2, 以 200 次/min 振荡 5 min。再用磷酸调节 pH 至 2.8, 用水将试液全部转移至 50 mL 容量瓶中, 并定容至刻度。混匀后取此试液过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜后待。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 标准样品的色谱图

浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准样品的色谱如图 1 所示, L(+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸标准样品信息如表 1 所示。

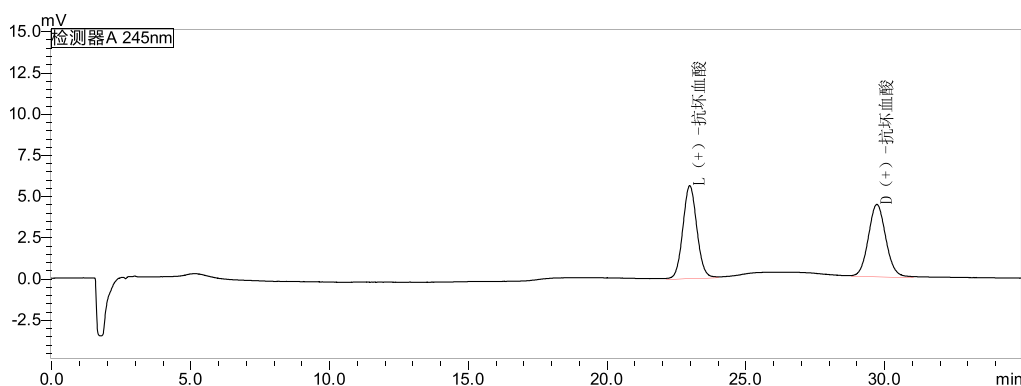


图 1 5  $\mu\text{g/mL}$  混合标准溶液色谱图

表 1 L (+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸标准溶液 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 色谱图参数

化合物名	保留时间	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	面积	分离度	理论塔板数
L(+)-抗坏血酸	23.01	5.00	193304	--	10128
D(+)-抗坏血酸	29.76	5.00	186515	6.58	10961

### 3.2 线性关系、检出限与定量限

将浓度为 0.5、5、10、25、50  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 2 所示。L(+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸在浓度范围内校准曲线线性良好。线性方程、线性范围相关系数见表 2 所示。

以  $S/N=3$  为检出限,  $S/N=10$  为定量限, 测得 L(+)-抗坏血酸和 D(+)-抗坏血酸的检出限与定量限如表 2 所示。

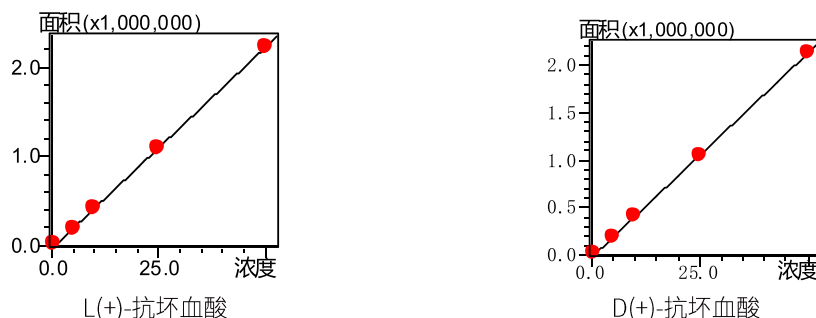


图 2 标准品标准曲线

表 2 L(+)- 抗坏血酸和 D(+)- 抗坏血酸的校准曲线参数与检出限、定量限

名称	校准曲线	相关系数 r	检出限 (µg/mL)	定量限 (µg/mL)
L(+)- 抗坏血酸	$Y=(44997.7)X-(25994.3)$	0.9999	0.064	0.21
D(+)- 抗坏血酸	$Y=(42991.1)X-(22851.3)$	0.9999	0.070	0.23

### 3.3 精密度实验

对浓度为 0.5 µg/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，L(+)- 抗坏血酸的峰面积和保留时间相对标准偏差分别是 1.69 %，0.14% 和 D(+)- 抗坏血酸的峰面积和保留时间相对标准偏差分别是 1.12 %，0.13% 之间，仪器精密度良好，结果见表 3。

表 3 L (+) - 抗坏血酸和 D(+)- 抗坏血酸标准溶液 (0.5µg/mL) 峰面积和保留时间重复性结果 (n=6)

	L(+)- 抗坏血酸		D(+)- 抗坏血酸	
	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
1	12942	23.06	11706	29.80
2	12633	23.07	11683	29.82
3	12808	23.13	11465	29.87
4	12424	23.09	11709	29.85
5	12460	23.10	11415	29.87
6	12468	23.03	11644	29.80
RSD (%)	1.69	0.14	1.12	0.13

### 3.4 回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，同时在此样品中添加浓度为 6 mg/100 g 的混合标准溶液，按 2.2 前处理方法处理 3 个平行加标样品，图 3 为草莓样品的色谱图，图 4 为加标样品色谱图，加标回收率结果见表 4。

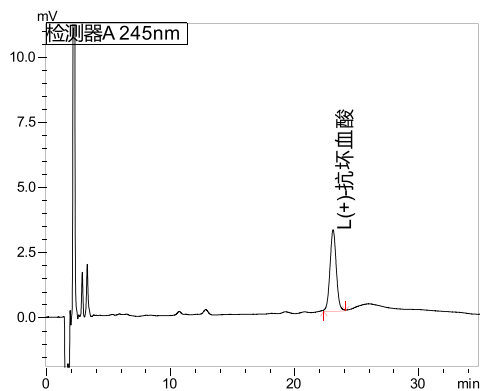


图 3 草莓样品色谱图

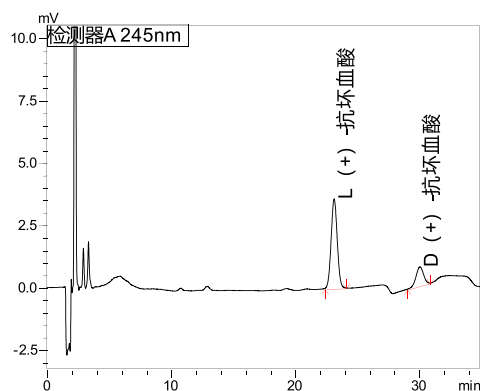


图 4 加标样品色谱图

表 4 L(+)- 抗坏血酸和 D(+)- 抗坏血酸的回收率

名称	样品中含量 (mg/100 g)	加标量 (mg/100 g)	加标样品中测得总量 (mg/100 g)			平均回收率 (%)
			样品 1	样品 2	样品 3	
L(+)- 抗坏血酸	28.67	6.00	33.41	33.29	32.94	75.66
D(+)- 抗坏血酸	0.00	6.00	6.08	6.23	6.01	101.77

## ■ 结论

本文采用岛津 LC-20A 高效液相色谱系统，参考《GB/T 5009.86-2016 食品中抗坏血酸的测定》中规定的检测方法，建立了一种测定草莓中抗坏血酸的方法。该方法检测灵敏度高，重复性好，系统精密度良好。实验表明，该方法满足标准中的各项规定，可用于食品中抗坏血酸的检测。

岛津应用云

